(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202391023 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.08.17

(22) Дата подачи заявки
2021.11.12

(51) Int. Cl. ***A61K 9/127*** (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(54) ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ, КОДИРУЮЩИЕ РЕГУЛЯТОР ТРАНСМЕМБРАННОЙ ПРОВОДИМОСТИ ПРИ МУКОВИСЦИДОЗЕ, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МУКОВИСЦИДОЗА

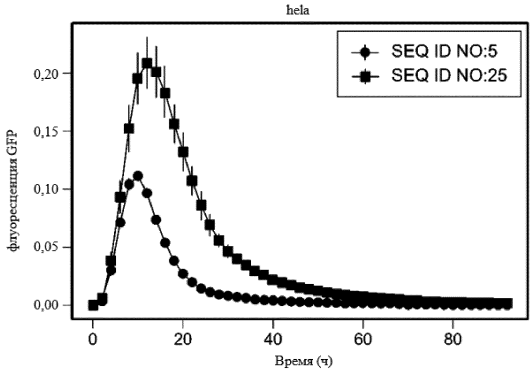
(31) **63/113,715**
(32) **2020.11.13**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/059231**
(87) **WO 2022/104131 2022.05.19**

(71) Заявитель:
МОДЕРНАТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Сун Джин К., Рейд Дэвид, Бикнелл Алисия Энн, Кадет Пирес Ана, Хркач Джеффри (US)

(74) Представитель:
Билык А.В., Поликарпов А.В., Соколова М.В., Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Дмитриев А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Данное изобретение относится к средствам доставки, содержащим молекулы полезной нагрузки, например мРНК или терапевтические средства для редактирования генов, для лечения муковисцидоза (МВ). Терапевтические средства на основе нуклеиновых кислот (например, мРНК) для применения в изобретении при введении in vivo кодируют регулятор трансмембранный проводимости при муковисцидозе (CFTR). Терапевтические средства на основе нуклеиновых кислот (например, мРНК) по данному изобретению повышают и/или восстанавливают недостаточные уровни экспрессии и/или активности CFTR у субъектов. Терапевтические средства на основе нуклеиновых кислот (например, мРНК) по данному изобретению дополнительно уменьшают аномальное накопление аммиака, связанное с недостаточной активностью CFTR у субъектов.



202391023 A1

202391023 A1

ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ, КОДИРУЮЩИЕ РЕГУЛЯТОР ТРАНСМЕМБРАННОЙ ПРОВОДИМОСТИ ПРИ МУКОВИСЦИДОЗЕ, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МУКОВИСЦИДОЗА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США № 63/113 715, поданной 13 ноября 2020 г., содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Данная заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронной виде в формате ASCII и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия ASCII, созданная 10 ноября 2021 г., называется 45817-0093WO1_SL.txt и имеет размер 88545 байт.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Муковисцидоз («МВ») представляет собой аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся аномальным накоплением липкой и густой слизи у пациентов. МВ также известен как муковисцидоз поджелудочной железы, фиброкистозная болезнь поджелудочной железы или мусковисцидоз. Слизь является важной биологической жидкостью, которая смазывает и защищает легкие, репродуктивную систему, пищеварительную систему и другие органы. Однако у пациентов с МВ вырабатывается густая и липкая слизь, которая уменьшает размер дыхательных путей, что приводит к хроническому кашлю, одышке, воспалению, бактериальным инфекциям, фиброзу и кистам в легких. Кроме того, у большинства пациентов с МВ слизь блокирует протоки в поджелудочной железе, что препятствует высвобождению инсулина и пищеварительных ферментов, что приводит к диарее, недостаточности питания, плохому росту и потере массы тела. Gershman A.J. et al., Cleve Clin J Med. 73: 1065-1074 (2006). По оценкам, частота распространенности МВ составляет 1 на 2500-3500 рожденных в европеоидной расе, но значительно реже встречается в других популяциях. Ratjen F. et al., Lancet 361: 681-689 (2003).

[0004] Основным геном, связанным с муковисцидозом, является регулятор

трансмембранной проводимости при муковисцидозе («CFTR»; англ.: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) (NM_000492, NP_000483; XM_011515751, XP_011514053; XM_011515752, XP_011514054; XM_011515753, XP_011514055; XM_011515754, XP_011514056; также упоминается как АТФ-связывающая кассета подсемейства С, член 7 («ABCC7»; англ.: ATP-Binding Cassette Sub-Family C, Member 7)). CFTR представляет собой фермент (EC 3.6.3.49), который играет критическую роль в транспортных путях и функционирует как хлорид-ионный канал. Отсутствие функционального CFTR препятствует выведению ионов хлора и приводит к увеличению абсорбции ионов натрия. Welsh, M. J. et al., J. Clin. Invest. 80: 1523-1526 (1987). Это заставляет воду перемещаться из слизи в клетки, в результате чего слизь становится более вязкой. CFTR локализуется в цитоплазме, эндосомах, внеклеточном пространстве и плазматической мембране клеток. Белок состоит из 1480 аминокислот. Полная или частичная потеря функции CFTR приводит к образованию густой и липкой слизи, вызывающей затрудненное дыхание, проблемы с пищеварением и сокращение продолжительности жизни.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В данном изобретении предложены средства доставки, содержащие молекулы полезной нагрузки, например, матричную РНК (мРНК) или терапевтические средства редактирования генов для лечения муковисцидоза (МВ). Терапевтические средства на основе нуклеиновых кислот по изобретению особенно хорошо подходят для лечения МВ, поскольку технология обеспечивает адресную доставку, например, внутриклеточную доставку мРНК или другой молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид регулятора трансмембранной проводимости при муковисцидозе (CFTR), с последующим синтезом *de novo* функционального полипептида CFTR в клетках-мишенях. В одном варианте осуществления в данном изобретении предложено включение модифицированных нуклеотидов в терапевтические мРНК для (1) минимизации нежелательной иммунной активации (например, врожденного иммунного ответа, связанного с введением in vivo чужеродных нуклеиновых кислот) и (2) оптимизации эффективности трансляции мРНК в белок. Примерные аспекты изобретения включают комбинацию модификации нуклеотидов для снижения врожденного иммунного ответа и оптимизации последовательности, в частности, в пределах открытой рамки считывания (ОРС) терапевтических мРНК, кодирующих полипептид CFTR, для усиления экспрессии белка.

[0006] В дополнительных вариантах осуществления технология терапевтических средств на основе мРНК по данному изобретению также включает доставку мРНК, кодирующей полипептид CFTR, с помощью системы доставки на основе липидных наночастиц (ЛНЧ). В данном изобретении представлены ионизируемые ЛНЧ на основе липидов, которые обладают улучшенными свойствами в сочетании с мРНК, кодирующей полипептид CFTR, и при введении in vivo, таком как, клеточное поглощение, внутриклеточный транспорт и/или эндосомальное высвобождение или эндосомальный выход.

[0007] В некоторых аспектах данное изобретение относится к композициям и составам для доставки, содержащим полинуклеотид, например, рибонуклеиновую кислоту (РНК), например, мРНК, кодирующую полипептид CFTR, например, другие молекулы нуклеиновой кислоты или полезные нагрузки, которые могут индуцировать/повышать экспрессию полипептид CFTR, и способам лечения МВ у субъекта-человека, нуждающегося в этом, путем их введения.

[0008] Данное изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей полезную нагрузку, инкапсулированную в липидные наночастицы, например, молекулу нуклеиновой кислоты, такую как мРНК, которая содержит ОРС, кодирующую полипептид CFTR, при этом композиция пригодна для введения субъекту-человеку, нуждающемуся в лечении МВ.

[0009] В некоторых аспектах в данном изобретении предложена мРНК, содержащая ОРС, кодирующую полипептид CFTR SEQ ID NO: 1, при этом ОРС по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99 % или на 100% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 142. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 5'-нетранслируемую область (UTR), содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 5'-UTR, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 3'-UTR, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 45.

[0010] В некоторых аспектах в данном изобретении предложена мРНК, содержащая 5'-UTR, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 28, и ОРС, кодирующую полипептид CFTR SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления 5'-UTR содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления 5'-UTR содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления мРНК

содержит 3'-UTR, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 45.

[0011] В некоторых аспектах в данном изобретении предложена мРНК, содержащая 3'-UTR, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 45, и ОРС, кодирующую полипептид CFTR SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 5'-UTR, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 5'-UTR, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24 или 25.

[0012] В некоторых вариантах осуществления вышеуказанная мРНК содержит 5'-концевой кэп, содержащий m^7G-ppp-Gm-AG.

[0013] В некоторых вариантах осуществления вышеуказанная мРНК содержит область поли-А, содержащую А100-UCUAG-A20-инвертированный дезокситимидин (SEQ ID NO: 211).

[0014] В некоторых вариантах осуществления вышеуказанная мРНК содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 153.

[0015] В некоторых аспектах в данном изобретении предложена мРНК, содержащая:

(i) 5'-концевой кэп, содержащий m^7G-ppp-Gm-AG;

(ii) 5'-UTR, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 25;

(iii) ОРС, кодирующую полипептид CFTR SEQ ID NO: 1, при этом ОРС содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 142;

(iv) 3'-UTR, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты 45; и

(v) область поли-А, содержащую А100-UCUAG-A20-инвертированный дезокситимидин (SEQ ID NO: 211).

[0016] В некоторых вариантах осуществления вышеуказанная мРНК содержит по меньшей мере одно химически модифицированное азотистое основание, сахар, остов или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления все урацилы мРНК представляют собой N1-метилпсевдоурацилы.

[0017] В некоторых аспектах в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая любую из вышеуказанных мРНК. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый эксципиент.

[0018] В некоторых аспектах в данном изобретении предложена липидная наночастица, содержащая любую из вышеуказанных мРНК. В определенных вариантах осуществления липидная наночастица содержит:

ядро липидной наночастицы, содержащее:

(i) ионизируемый липид,

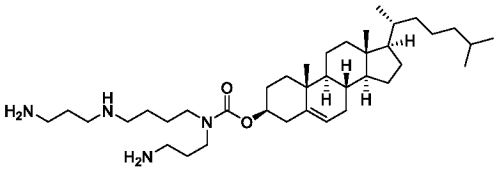
(ii) фосфолипид,

(iii) структурный липид и

(iv) ПЭГ-липид и

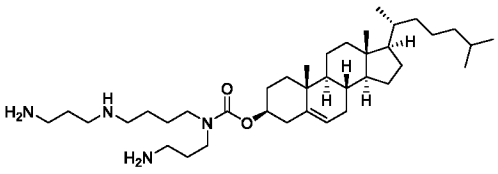
при этом мРНК инкапсулирована внутри ядра и

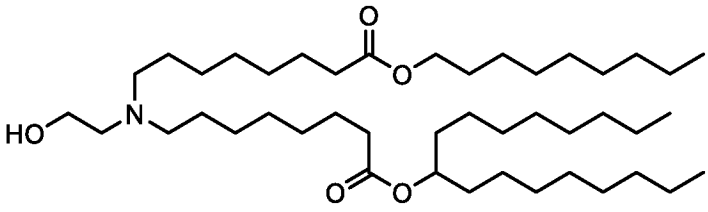
при этом ядро липидной наночастицы было приведено в контакт с катионным агентом. В некоторых вариантах осуществления катионный агент представляет собой GL-67:



(GL-67) или его соль.

[0019] В некоторых аспектах в данном изобретении предложена липидная наночастица, содержащая:

(i)  (GL-67) или его соль;

(ii)  (Соединение II) или его соль; и

(iii) мРНК, кодирующую полипептид CFTR. В некоторых вариантах осуществления полипептид CFTR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.

[0020] В некоторых аспектах в данном изобретении предложена липидная наночастица, содержащая любую из вышеуказанных мРНК. В определенных вариантах осуществления липидная наночастица содержит:

ядро липидной наночастицы, содержащее:

(i) ионизируемый липид,

(ii) фосфолипид,

(iii) структурный липид и

(iv) ПЭГ-липид и

(v) катионный агент, например, стеринамин.

[0021] В некоторых аспектах в данном изобретении предложена липидная наночастица, содержащая любую из вышеуказанных мРНК. В определенных вариантах осуществления липидная наночастица содержит:

ядро липидной наночастицы, содержащее:

(i) ионизируемый липид,

(ii) фосфолипид,

(iii) структурный липид и

(iv) ПЭГ-липид и

(v) GL-67 или его соль.

[0022] В некоторых аспектах в данном изобретении предложен способ получения наночастицы, включающий приведение ядра липидной наночастицы в контакт с катионным агентом, при этом липидная наночастица содержит:

(a) ядро липидной наночастицы, содержащее:

(i) ионизируемый липид,

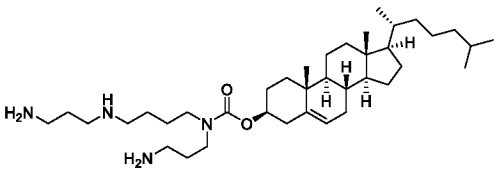
(ii) фосфолипид,

(iii) структурный липид и

(iv) ПЭГ-липид и

(b) любую из вышеуказанных мРНК.

[0023] В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного процесса приведение ядра липидной наночастицы в контакт с катионным агентом включает растворение катионного агента в неионном эксципиенте. В некоторых вариантах осуществления неионный эксципиент представляет собой гидроксистеарат макрогола 15 (HS 15). В некоторых вариантах осуществления катионный агент представляет собой стеринамин. В некоторых вариантах осуществления стеринамин представляет собой GL-67:



(GL-67) или его соль.

[0024] В некоторых аспектах в данном изобретении предложена наночастица, полученная с помощью вышеуказанного процесса.

[0025] В некоторых аспектах в данном изобретении предложен способ лечения или профилактики муковисцидоза у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающий введение субъекту любой из вышеуказанных мРНК, вышеуказанной фармацевтической композиции, любой из вышеуказанных липидных наночастиц

или любой из вышеуказанных наночастиц. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют в дыхательные пути или легкие субъекта.

[0026] В некоторых аспектах в данном изобретении предложен способ профилактики/улучшения состояния при муковисцидозе у субъекта-человека, имеющего вызывающие муковисцидоз мутации в обеих копиях гена CFTR, включающий введение субъекту любой из вышеуказанных мРНК, вышеуказанной фармацевтической композиции, любой из вышеуказанных липидных наночастиц или любой из вышеуказанных наночастиц. В некоторых вариантах осуществления мутации, вызывающие муковисцидоз, выбраны из группы, состоящей из G542X, W1282X, R553X, F508del, N1303K, I507del, G551D, S549N, D1152H, R347P и R117H. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют в дыхательные пути или легкие субъекта.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0027] **Фиг. 1A** представляет собой график, показывающий флуоресценцию GFP во времени для клеток HeLa, трансфицированных мРНК, кодирующей зеленый флуоресцентный белок (GFP), и 5'-UTR, содержащей нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 25.

[0028] **Фиг. 1B** представляет собой график, показывающий люминесценцию люциферазы светлячка в образцах печени мышей, которым вводили мРНК, кодирующую люциферазу светлячка (ffLuc), и имеющую 5'-UTR, содержащую нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 25.

[0029] **Фиг. 1C** представляет собой график, показывающий перенос хлоридов (поток) в клетках бронхиального эпителия человека с муковисцидозом (CF-HBE), которым вводили 6 мкг мРНК CFTR-01 или CFTR-06, составленных в ЛНЧ-01, ФСБ или контролей.

[0030] **Фиг. 2** представляет собой график, показывающий перенос хлоридов (поток) в клетках CF-HBE, которым вводили 6 мкг мРНК CFTR-01, CFTR-07 или CFTR-08, составленных в ЛНЧ-01, ФСБ или контролей.

[0031] **Фиг. 3A** представляет собой график, показывающий изменение зеленой флуоресценции во времени в клетках HeLa, трансфицированных мРНК, кодирующей GFP и имеющих хвост полиА A100 (SEQ ID NO: 127) или idT-защищенный хвост полиА A100-UCUAG-A20 (SEQ ID NO: 211).

[0032] **На Фиг. 3B** представляет собой график, показывающий общий поток в образцах от мышей, которым вводили ФСБ или мРНК, кодирующую люциферазу

светлячка и имеющую хвост полиА A100 (A100) (SEQ ID NO: 127) или idT-защищенный хвост полиА A100-UCUAG-A20 (idT) (SEQ ID NO: 211).

[0033] **Фиг. 3C** представляет собой график, показывающий перенос хлоридов (поток) в клетках CF-HBE, которым вводили мРНК, кодирующую CFTR и имеющих защищенный (CFTR-09) или незащищенный (CFTR-01) хвост полиА. мРНК были составлены в ЛНЧ-01. «A100» описан как SEQ ID NO: 127.

[0034] **Фиг. 4A** представляет собой график, показывающий перенос хлоридов в клетках CF-HBE, которым вводили указанные количества CFTR-01, CFTR-02 и CFTR-03, составленных в ЛНЧ-01, через 18 часов после введения в раунде 8. Легенда к **Фиг. 4A** представлена на **Фиг. 4B**.

[0035] **Фиг. 4B** представляет собой график, показывающий перенос хлоридов в клетках CF-HBE через 18, 48, 72 и 96 часов после введения 8 мкг CFTR-01, CFTR-02 или CFTR-03, составленных в ЛНЧ-01 в раунде 8.

[0036] **Фиг. 5A** представляет собой график, показывающий кратность изменения активности CFTR в клетках CF-HBE через 18 часов после введения CFTR-01, CFTR-02 или CFTR-03 по сравнению с активностью CFTR в клетках CF-HBE через 18 часов после введения CFTR- 01. мРНК были составлены в ЛНЧ-01. Звездочки представляют среднее значение кратности разницы (относительно CFTR-01) для всех доз и раундов. Каждая точка представляет активность CFTR при определенной дозе и раунде.

[0037] **Фиг. 5B** представляет собой график, показывающий кратность изменения площади под кривой (AUC) активности CFTR в клетках CF-HBE между 18 и 96 часами после введения CFTR-01, CFTR-02 или CFTR-03 относительно активности CFTR в клетках CF-HBE между 18 и 96 часами после введения CFTR-01. мРНК были составлены в ЛНЧ-01. Звездочки представляют среднее значение кратности разницы (относительно CFTR-01) для всех доз и раундов. Каждая точка представляет активность CFTR при определенной дозе и раунде.

[0038] **Фиг. 5C** представляет собой график, показывающий кратность изменения экспрессии белка CFTR в клетках CF-HBE через 18 часов после введения CFTR-01, CFTR-02 или CFTR-03 по сравнению с экспрессией белка CFTR в клетках CF-HBE через 18 часов после введения CFTR-01. мРНК были составлены в ЛНЧ-01. Звездочки представляют среднее значение кратности разницы (относительно CFTR-01) для всех доз и раундов. Каждая точка представляет активность CFTR при определенной дозе и раунде.

[0039] **Фиг. 5D** представляет собой график, показывающий кратность изменения

площади под кривой экспрессии белка CFTR в клетках CF-HBE между 18 и 96 часами после введения CFTR-01, CFTR-02 или CFTR-03 по сравнению с экспрессией белка CFTR в клетках CF-HBE между 18 и 96 часами после введения CFTR-01. мРНК были составлены в ЛНЧ-01. Звездочки представляют среднее значение кратности разницы (относительно CFTR-01) для всех доз и раундов. Каждая точка представляет активность CFTR при определенной дозе и раунде.

[0040] **Фиг. 6A** представляет собой график, показывающий кратность разницы в активности CFTR в клетках CF-HBE через 18 часов после введения одного из CFTR-01-CFTR-05 по сравнению с активностью CFTR в клетках CF-HBE через 18 часов после введения CFTR-01. мРНК составили в ЛНЧ-01. Звездочки представляют среднее значение кратности разницы (относительно CFTR-01) для всех доз и раундов. Каждая точка представляет активность CFTR при определенной дозе и раунде.

[0041] **Фиг. 6B** представляет собой график, показывающий кратность изменения площади под кривой активности CFTR в клетках CF-HBE между 48 и 96 часами после введения для того же эксперимента, что и на **Фиг. 6A**. Звездочки представляют среднее значение кратности разницы (относительно CFTR-01) для всех доз и раундов. Каждая точка представляет активность CFTR при определенной дозе и раунде.

[0042] **Фиг. 6C** представляет собой график, показывающий кратность разницы площади под кривой экспрессии белка CFTR в клетках CF-HBE между 18 и 96 часами после введения одного из CFTR-01-CFTR-05 по сравнению с экспрессией CFTR в клетках CF-HBE. Клетки CF-HBE между 18 и 96 часами после введения CFTR-01. мРНК составляли в ЛНЧ-01. Звездочки представляют среднее значение кратности разницы (относительно CFTR-01) для всех доз и раундов. Каждая точка представляет активность CFTR при определенной дозе и раунде.

[0043] **Фиг. 7A** представляет собой график, показывающий целостность мРНК (определяемую с помощью RPIP-ВЭЖХ, представленную в процентах от основного пика (ОП)) для указанных мРНК CFTR в указанном раунде; мРНК были составлены в ЛНЧ-01.

[0044] **Фиг. 7B** представляет собой график, показывающий размер частиц ЛНЧ для указанных мРНК CFTR в указанном раунде; мРНК были составлены в ЛНЧ-01.

[0045] **Фиг. 7C** представляет собой график, показывающий эффективность инкапсуляции для указанных мРНК CFTR в указанном раунде; мРНК были составлены в ЛНЧ-01.

[0046] **Фиг. 8** представляет собой схему примерного процесса апостериорной загрузки (PHL) первого поколения для получения ЛНЧ.

[0047] **На Фиг. 9** представлена схема иллюстративного процесса PHL второго поколения (общего) для получения ЛНЧ.

[0048] **На Фиг. 10** представлена схема иллюстративного процесса PHL второго поколения (специфического) для получения ЛНЧ.

[0049] **На Фиг. 11** представлена схема иллюстративного способа получения прототипа пустой липидной наночастицы («Нейтральная сборка»), где пустую ЛНЧ смешивают при pH 8,0, а конечный состав — при pH 5,0.

[0050] **Фиг.12** представляет собой схему примерного процесса добавления GL-67 к ЛНЧ.

[0051] **ФИГ. 13A** представляет собой график, показывающий перенос хлоридов для указанных доз ЛНЧ.

[0052] **Фиг. 13B** представляет собой набор из двух графиков, показывающих статистическое сравнение данных на **Фиг. 13A** для доз 2 мкг (слева) и 6 мкг (справа) ЛНЧ-02 и ЛНЧ-03.

[0053] **Фиг. 13C** представляет собой график, показывающий перенос хлоридов для указанных доз ЛНЧ.

[0054] **Фиг. 13D** представляет собой набор из двух графиков, показывающих статистическое сравнение данных на **Фиг. 13C** для доз 2 мкг (слева) и 6 мкг (справа) ЛНЧ-03 и ЛНЧ-04.

[0055] **Фиг. 13E** представляет собой график, показывающий перенос хлоридов для указанных доз ЛНЧ.

[0056] **Фиг. 13F** представляет собой набор из двух графиков, показывающих статистическое сравнение данных на **Фиг. 13C** для доз 2 мкг (слева) и 6 мкг (справа) ЛНЧ-03, ЛНЧ-05 и ЛНЧ-06.

[0057] **Фиг. 13G** представляет собой график, показывающий перенос хлоридов для различных ЛНЧ при дозе 2 мкг. Каждая точка представляет отдельный раунд эксперимента.

[0058] **Фиг. 13H** представляет собой график, показывающий перенос хлоридов для различных ЛНЧ при дозе 6 мкг. Каждая точка представляет отдельный раунд эксперимента.

[0059] **Фиг. 14** представляет собой график, показывающий перенос хлоридов для ЛНЧ в зависимости от дозы при доставке аэрозолем на апикальную поверхность CF-HBE.

[0060] **Фиг. 15** представляет собой изображение белка NPI-Luc в бронхиальном эпителии крысы, которой вводили 0,24 мг/кг мРНК, доставленной в легкие с помощью аэрозольной доставки.

[0061] **Фиг. 16A** представляет собой набор из трех изображений срезов легких отличного от человека примата, которому ввели одну аэрозольную дозу NPI-Luc. Высокая доза, депозированная в легких, составляла 0,42 мг/кг через 6 часов после окончания введения дозы. Увеличенные изображения областей *, ** и *** представлены на **Фиг. 16B.**

[0062] **Фиг. 16B** представляют собой увеличенные изображения срезов легких на **ФИГ. 16A**.

[0063] **Фиг. 17** представляет собой набор из четырех изображений экспрессии белка CFTR и мРНК CFTR в срезе легкого крысы, которой вводили одну дозу ЛНЧ, содержащей мРНК CFTR. Нижний ряд изображений — это увеличенные изображения верхнего ряда изображений.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0064] В данном изобретении предложены терапевтические средства для лечения муковисцидоза (МВ). Муковисцидоз (МВ) — это прогрессирующее генетическое заболевание, которое вызывает стойкие инфекции легких и со временем ограничивает способность дышать. Это заболевание характеризуется наличием мутаций в обеих копиях гена белка регулятора трансмембранной проводимости при муковисцидозе (CFTR). Без CFTR, который участвует в производстве пота, пищеварительной жидкости и слизи, выделения, которые обычно жидкие, вместо этого становятся густыми.Рассматриваемые средства доставки позволяют доставлять полезные нагрузки в дыхательные пути для облегчения течения заболевания. В одном варианте осуществления полезная нагрузка содержит молекулы нуклеиновой кислоты или молекулы, способные модифицировать ДНК клеток, присутствующих в дыхательных путях. В частности, терапевтические средства на основе мРНК особенно хорошо подходят для лечения МВ, поскольку технология обеспечивает внутриклеточную доставку мРНК, кодирующей CFTR, с последующим синтезом *de novo* функционального белка CFTR в клетках-мишенях. После доставки мРНК в клетки-мишени желаемый белок CFTR экспрессируется с помощью собственного механизма трансляции клетки, и, следовательно, полностью функциональный белок CFTR заменяет дефектный или отсутствующий белок.

[0065] Одна из проблем, связанных с доставкой полезных нагрузок, например генетически сконструированных полезных нагрузок или терапевтических средств на основе нуклеиновых кислот (*например*, терапевтических средств на основе мРНК) *in vivo*, связана с врожденным иммунным ответом, который может возникать, когда иммунная система организма сталкивается с чужеродными нуклеиновыми кислотами. Чужеродные мРНК могут активировать иммунную систему посредством распознавания *через* толл-подобные рецепторы (TLR), в частности TLR7/8, который активируется одноцепочечной РНК (оцРНК). В неиммунных клетках распознавание чужеродной мРНК может происходить через индуцируемый ретиноевой кислотой ген I (RIG-I). Иммунное распознавание чужеродных мРНК может привести к нежелательным цитокиновым эффектам, включая продукцию интерлейкина-1β (IL-1β), распространение фактора некроза опухоли-α (TNF-α) и сильный ответ интерферона типа I (IFN типа I). В данном изобретении предложено включение различных модифицированных нуклеотидов в терапевтические мРНК для минимизации иммунной активации и оптимизации эффективности трансляции мРНК в белок. Конкретные аспекты включают комбинацию модификации нуклеотидов для снижения врожденного иммунного ответа и оптимизации последовательности, в частности, в пределах открытой рамки считывания (ОРС) терапевтических мРНК, кодирующих CFTR, для усиления экспрессии белка.

[0066] Некоторые варианты технологии терапевтических средств по данному изобретению также включают доставку терапевтической полезной нагрузки, кодирующей CFTR, *с помощью* системы доставки липидных на основе наночастиц (ЛНЧ). Рассматриваемые липидные наночастицы (ЛНЧ) являются идеальной платформой для безопасной и эффективной доставки полезной нагрузки к клеткам-мишеням в легких. В частности, ЛНЧ обладают уникальной способностью доставлять нуклеиновые кислоты по механизму, включающему клеточное поглощение, внутриклеточный транспорт и эндосомальное высвобождение или эндосомальный выход. В данном изобретении предложены ионизируемые ЛНЧ на основе липидов в сочетании с молекулами полезной нагрузки, например, мРНК, кодирующей CFTR, которые обладают улучшенными свойствами при введении *in vivo*. Не привязываясь к какой-либо теории, считается, что составы ЛНЧ на основе ионизируемых липидов по изобретению обладают улучшенными свойствами, например, клеточным поглощением, внутриклеточным транспортом и/или эндосомальным высвобождением или эндосомальным выходом. ЛНЧ, вводимые системным путем (*например*, внутривенным (IV) введением), например, при первом

введении, могут ускорить клиренс последовательно введенных ЛНЧ, например, при последующих введениях. Это явление известно как ускоренный клиренс крови (ABC) и представляет собой ключевую проблему, в частности, при замещении дефицитных ферментов (*например*, CFTR) в терапевтическом контексте. Это связано с тем, что повторное введение терапевтических средств на основе мРНК в большинстве случаев необходимо для поддержания необходимых уровней фермента в тканях-мишенях у субъектов (*например*, у субъектов, страдающих мв). Проблемы повторного дозирования можно решать на нескольких уровнях. Конструирование мРНК и/или эффективная доставка с помощью ЛНЧ могут привести к повышенным уровням и/или увеличению продолжительности экспрессии белка (*например*, CFTR) после введения первой дозы, что, в свою очередь, может увеличить время между введением первой дозы и последующим дозированием. Известно, что феномен ABC носит, по меньшей мере частично, преходящий характер, при этом иммунные реакции, лежащие в основе ABC, разрешаются через достаточное время после системного введения. Таким образом, увеличение продолжительности экспрессии и/или активности белка после системной доставки терапевтического средства на основе мРНК по данному изобретению в одном аспекте борется с феноменом ABC. Более того, ЛНЧ могут быть сконструированы таким образом, чтобы избежать восприятия и/или распознавания иммунной системой и, таким образом, могут дополнительно избежать ABC при последующем или повторном дозировании. Иллюстративный аспект изобретения включает ЛНЧ, которые были сконструированы таким образом, чтобы уменьшить ABC.

[0067] Кроме того, полезные нагрузки по изобретению для лечения МВ могут быть доставлены в легочную ткань с использованием способов перорального или назального ингаляционного введения. Известные способы доставки векторов генной терапии CFTR с использованием как вирусных, так и невирусных систем были разработаны и испытаны в легких пациентов с МВ (Griesenbach, U. and Alton, E. W. F. W. Adv. Drug Deliv. Rev. 61:128-139 (2009)). Однако с доставкой этих векторов возникли проблемы. Например, развитие гуморального иммунитета является проблемой для аденовирусных векторов. Составы ЛНЧ по изобретению обеспечивают преимущества для доставки в легкие полезных нагрузок, например, нуклеиновых кислот, таких как мРНК, кодирующая CFTR, обеспечивая эффективные уровни экспрессии CFTR, избегая при этом вызывания опасных иммунных ответов.

1. Регулятор трансмембранной проводимости при муковисцидозе (CFTR)

[0068] Регулятор трансмембранной проводимости при муковисцидозе (CFTR; EC 3.6.3.49) представляет собой ионный канал класса переносчиков ABC. Он проводит ионы хлора и тиоцианата через мембраны эпителиальных клеток. Структура CFTR массой около 168 кДа, которая высоко консервативна среди организмов, состоит из семи доменов. CFTR содержит два трансмембранных домена с шестью трансмембранными спиралями в каждом. Кроме того, CFTR содержит два нуклеотид-связывающих домена , два домена переносчика ABC и один PDZ-связывающий домен. Нуклеотид-связывающие домены используют для связывания и гидролиза АТФ, переносчики ABC перемещают ионы через плазматическую мембрану, а PDZ-связывающий домен служит для закрепления CFTR на плазматической мембране. CFTR обычно существует в виде димерных единиц в плазматической мембране клетки.

[0069] Наиболее известная проблема со здоровьем, связанная с CFTR, — это муковисцидоз (MB), аутосомно-рецессивное генетическое заболевание, при котором нефункциональный CFTR препятствует выведению ионов хлорида и приводит к увеличению абсорбции ионов натрия, что приводит к повышению вязкости слизи. Это вызвано генными мутациями, которые в большинстве случаев приводят к не функциональному CFTR.

[0070] Кодирующая последовательность (CDS; англ.: coding sequence) канонической последовательности мРНК CFTR дикого типа описана в базе данных эталонных последовательностей NCBI (RefSeq) под номером доступа NM_000492.3 («Регулятор трансмембранной проводимости при муковисцидозе Homo sapiens (АТФ-связывающая кассета, подсемейство С, член 7) (CFTR), мРНК»). Последовательность канонического белка CFTR дикого типа, соответствующая изоформе 1, описана в базе данных RefSeq под номером доступа NP_000483.3 («Регулятор трансмембранной проводимости при муковисцидозе [Homo sapiens]»); SEQ ID NO: 1:

MQRSPLEKASVVSKLFFSWTRPILRKGYRQRLELSDIYQIPSVDSADNLSEKLERE
WDRELASKKNPKLINALRRCFFWRFMFYGIFLYLGEVTKAVQPLLLGRIIASYDP
DNKEERSIAIYLGIGLCLLFIVRTLLLHPAIFGLHHIGMQMRIAMFSLIYKKTLKLS
SRVLDKISIGQLVSLLSNNLNKFDEGLALAHFVWIAPLQVALLMGLIWELLQASA
FCGLGFLIVLALFQAGLGRMMMKYRDQRAGKISERLVITSEMIENIQSVKAYCW
EEAMEKMIENLRQTELKLTRKAAYVRYFNSSAFFFSGFFVVFLSVLPYALIKGIIL
RKIFTTISFCIVLRMAVTRQFPWAVQTWYDSLGAINKIQDFLQKQEYKTLEYNLT
TTEVVMENVTAFWEEGFGELFEKAKQNNNNRKTSNGDDSLFFSNFSLLGTPVLK

DINFKIERGQLLAVAGSTGAGKTSLLMMIMGELEPSEGKIKHSGRISFCSQFSWIM
PGTIKENIIFGVSYDEYRYRSVIKACQLEEDISKFAEKDNIVLGEGGITLSGGQRAR
ISLARAVYKDADLYLLDSPFGYLDVLTEKEIFESCVCKLMANKTRILVTSKMEHL
KKADKILILHEGSSYFYGTFSELQNLQPDFSSKLMGCDSFDQFSAERRNSILTETL
HRFSLEGDAPVSWTETKKQSFKQTGEFGEKRKNSILNPINSIRKFSIVQKTPLQMN
GIEEDSDEPLERRLSLVPDSEQGEAILPRISVISTGPTLQARRRQSVLNLMTHSVNQ
GQNIHRKTTASTRKVSLAPQANLTELDIYSRRLSQETGLEISEEINEEDLKECFFDD
MESIPAVTTWNTYLRYITVHKSLIFVLIWCLVIFLAEVAASLVVLWLLGNTPLQD
KGNSTHSRNNSYAVIITSTSSYYVFYIYVGVADTLLAMGFFRGLPLVHTLITVSKI
LHHKMLHSVLQAPMSTLNTLKAGGILNRFSKDIAILDDLLPLTIFDFIQLLLIVIGAI
AVVAVLQPYIFVATVPVIVAFIMLRAYFLQTSQQLKQLESEGRSPIFTHLVTSLKG
LWTLRAFGRQPYFETLFHKALNLHTANWFLYLSTLRWFQMRIEMIFVIFFIAVTFI
SILTTGEGEGRVGIILTLAMNIMSTLQWAVNSSIDVDSLMRSVSRVFKFIDMPTEG
KPTKSTKPYKNGQLSKVMIIENSHVKKDDIWPSGGQMTVKDLTAKYTEGGNAIL
ENISFSISPGQRVGLLGRTGSGKSTLLSAFLRLLNTEGEIQIDGVSWDSITLQQWRK
AFGVIPQKVFIFSGTFRKNLDPYEQWSDQEIWKVADEVGLRSVIEQFPGKLDFVL
VDGGCVLSHGHKQLMCLARSVLSKAKILLLDEPSAHLDPVTYQIIRRTLKQAFAD
CTVILCEHRIEAMLECQQFLVIEENKVRQYDSIQKLLNERSLFRQAISPSDRVKLFP
HRNSSKCKSKPQIAALKEETEEEVQDTRL (SEQ ID NO: 1)

Белок изоформы 1 CFTR имеет длину 1480 аминокислот. Следует отметить, что конкретные последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие последовательность эталонного белка в последовательностях RefSeq, представляют собой кодирующую последовательность (CDS), как указано в соответствующей записи базы данных RefSeq.

[0071] Изоформы 2 и 3 получают альтернативным сплайсингом.

[0072] Изоформы 2 и 3 CFTR кодируются CDS, описанной в упомянутой выше записи мРНК RefSeq.

[0073] Полинуклеотид изоформы 2 создают путем пропуска экзона из-за большого количества повторов TG и небольшого количества повторов T на границе интрон-экзон. Он кодирует полипептид изоформы 2 CFTR, длина которого составляет 1419 аминокислот и в котором отсутствуют аминокислоты 404–464 изоформы 1. Белок этой изоформы вызывает врожденное двустороннее отсутствие семявыводящих протоков (CBAVD).

[0074] Полинуклеотид изоформы 3 создают мутацией экзонного энхансера сплайсинга (ESE), который имеет альтернативный акцепторный сайт. Полученный

полипептид изоформы 3 CFTR имеет длину 605 аминокислот, имеет другую последовательность аминокислот 589-605, чем изоформа 1, и не содержит аминокислот 606-1480 из изоформы 1.

[0075] В некоторых аспектах в данном изобретении предложен полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК), содержащий нуклеотидную последовательность (например, открытую рамку считывания (ОРС)), кодирующую полипептид CFTR. В некоторых вариантах осуществления полипептид CFTR по изобретению представляет собой полноразмерный белок CFTR человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления полипептид CFTR по изобретению представляет собой вариант, пептид или полипептид, содержащий замену и вставку, и/или добавление, делецию и/или ковалентную модификацию в отношении последовательности CFTR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления метки последовательности или аминокислоты могут быть добавлены к последовательностям, кодируемым полинуклеотидами по изобретению (например, на N-конце или С-конце), например, для локализации. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки, расположенные в карбоксильной, аминоконцевой или внутренней областях полипептида по изобретению, могут быть необязательно делетированы с получением фрагментов.

[0076] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК), содержащий нуклеотидную последовательность (например, ОРС) по изобретению, кодирует вариант последовательности CFTR человека с заменами, который может содержать один, два, три или более чем три замены. В некоторых вариантах осуществления вариант с заменами может содержать одну или несколько замен консервативных аминокислот. В других вариантах осуществления вариант представляет собой вариант с инсерциями. В других вариантах осуществления вариант представляет собой вариант с делециями.

[0077] Фрагменты белка CFTR, функциональные домены белка, варианты и гомологичные белки (ортологи) также входят в объем полипептидов CFTR данного изобретения. Неограничивающим примером полипептида, кодируемого полинуклеотидами по изобретению, является изоформа 1, показанная в SEQ ID NO: 1.

2. Полинуклеотиды и открытые рамки считывания (ОРС)

[0078] В данном изобретении предложены мРНК для применения при лечении или

профилактике МВ. мРНК, предназначенные для использования в изобретении, вводят субъектам и кодируют белок CFTR человека *in vivo*. Соответственно, изобретение относится к полинуклеотидам, например, мРНК, содержащей открытую рамку считывания связанных нуклеозидов, кодирующих изоформу 1 CFTR человека (SEQ ID NO: 1), ее изоформы, ее функциональные фрагменты и слитые белки, содержащие CFTR. В частности, в изобретении предложены полинуклеотиды с оптимизированной последовательностью, содержащие нуклеотиды, кодирующие полипептидную последовательность CFTR человека, или последовательности, обладающие высокой идентичностью последовательности с этими полинуклеотидами с оптимизированной последовательностью.

[0079] В некоторых аспектах в изобретении предложены полинуклеотиды (например, РНК, такой как мРНК), которые содержат нуклеотидную последовательность (например, ОРС), кодирующую один или несколько полипептидов CFTR. В некоторых вариантах осуществления кодируемый полипептид CFTR по данному изобретению может быть выбран из:

(i) полноразмерного полипептида CFTR (например, имеющего такую же или по существу такую же длину, как CFTR дикого типа; например, изоформа 1 CFTR человека);

(ii) функционального фрагмента CFTR, описанного в данном документе (например, укороченная (например, делеция карбоксильной, аминоконцевой или внутренней области) последовательность, более короткая, чем CFTR, но все еще сохраняющая ферментативную активность CFTR);

(iii) его варианта (например, полноразмерные или укороченные белки CFTR, в которых заменены одна или несколько аминокислот, например, варианты, которые сохраняют всю или большую часть активности CFTR полипептида по отношению к эталонному белку (например, любые природные или искусственные варианты, известные в данной области техники)); или

(iv) слитого белка, содержащего (i) полноразмерный белок CFTR (например, SEQ ID NO: 1), его изоформу или его вариант и (ii) гетерологичный белок.

[0080] В некоторых вариантах осуществления кодируемый полипептид CFTR представляет собой полипептид CFTR млекопитающих, такой как полипептид CFTR человека, его функциональный фрагмент или вариант.

[0081] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) по изобретению увеличивает уровни экспрессии белка CFTR

и/или определяемые уровни ферментативной активности CFTR в клетках при введении в эти клетки, например, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15 %, по меньшей мере на 20 %, по меньшей мере на 25 %, по меньшей мере на 30 %, по меньшей мере на 35 %, по меньшей мере на 40 %, по меньшей мере на 45 %, по меньшей мере на 50 %, по меньшей мере на 55 %, по меньшей мере на 60 %, по меньшей мере на 65 %, по меньшей мере на 70 %, по меньшей мере на 75 %, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или по меньшей мере на 100 % по сравнению с уровнями экспрессии белка CFTR и/или определяемыми уровнями ферментативной активности CFTR в клетках до введения полинуклеотида по изобретению. Уровни экспрессии белка CFTR и/или ферментативную активность CFTR можно измерить в соответствии со способами, известными в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид вводят в клетки *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид вводят в клетки *in vitro*.

[0082] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды (например, РНК, например, мРНК) по изобретению содержат нуклеотидную последовательность (например, ОРС), которая кодирует изоформу 1 CFTR человека дикого типа, например, (SEQ ID NO: 1) или его изоформа.

[0083] Полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) по изобретению содержит кодон-оптимизированную последовательность нуклеиновой кислоты, при этом открытая рамка считывания (ОРС) кодон-оптимизированной последовательности нуклеиновой кислоты получена из последовательности CFTR дикого типа (например, CFTR человека дикого типа). Например, для полинуклеотидов по изобретению, содержащих ОРС с оптимизированной последовательностью, кодирующую CFTR, соответствующая последовательность дикого типа представляет собой нативный CFTR человека. Аналогично, для мРНК с оптимизированной последовательностью, кодирующей функциональный фрагмент CFTR человека, соответствующая последовательность дикого типа представляет собой соответствующий фрагмент CFTR человека.

[0084] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды (например, РНК, например, мРНК) по изобретению содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую CFTR, имеющую полноразмерную последовательность CFTR человека (т. е. включающую инициатор метионина; аминокислоты 1-1480).

[0085] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды (например, РНК, например, мРНК) по изобретению содержат нуклеотидную последовательность

(например, ОРС), кодирующую мутантный полипептид CFTR. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по изобретению содержат ОРС, кодирующую полипептид CFTR, который содержит по меньшей мере одну точечную мутацию в аминокислотной последовательности CFTR и сохраняет ферментативную активность CFTR. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид CFTR имеет активность CFTR, которая составляет по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45 %, по меньшей мере 50 %, по меньшей мере 55 %, по меньшей мере 60 %, по меньшей мере 65 %, по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 100% активности CFTR соответствующего CFTR дикого типа (например, изоформа 1, показанная в SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) по изобретению, содержащий ОРС, кодирующую мутантный полипептид CFTR, оптимизирован по последовательности.

[0086] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) по изобретению содержит нуклеотидную последовательность (например, ОРС), которая кодирует полипептид CFTR с мутациями, которые не изменяют ферментативную активность CFTR. Такие мутантные полипептиды CFTR можно назвать функционально нейтральными. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит ОРС, которая кодирует мутантный полипептид CFTR, содержащий одну или несколько функционально нейтральных точечных мутаций.

[0087] В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид CFTR обладает более высокой ферментативной активностью CFTR, чем соответствующий CFTR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид CFTR имеет активность CFTR, которая по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45 %, по меньшей мере на 50 %, по меньшей мере на 55 %, по меньшей мере на 60 %, по меньшей мере на 65 %, по меньшей мере на 70 %, по меньшей мере на 75 %, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 100% выше, чем активность соответствующего CFTR дикого типа (т. е. того же белка CFTR, но без мутации(й)).

[0088] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды (например, РНК, например, мРНК) по изобретению содержат нуклеотидную последовательность (например, ОРС), кодирующую функциональный фрагмент CFTR, например, где один или несколько фрагментов соответствуют полипептидной подпоследовательности полипептид CFTR дикого типа и сохраняют ферментативную активность CFTR. В некоторых вариантах осуществления фрагмент CFTR имеет активность CFTR, которая составляет по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45 %, по меньшей мере 50 %, по меньшей мере 55 %, по меньшей мере 60 %, по меньшей мере 65 %, по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 100% активности CFTR соответствующего полноразмерного CFTR. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды (например, РНК, например, мРНК) по изобретению, содержащие ОРС, кодирующую функциональный фрагмент CFTR, оптимизированы по последовательности.

[0089] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) по изобретению содержит нуклеотидную последовательность (например, ОРС), кодирующую фрагмент CFTR, который обладает более высокой ферментативной активностью CFTR, чем соответствующий полноразмерный CFTR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления фрагмент CFTR имеет активность CFTR, которая по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45 %, по меньшей мере на 50 %, по меньшей мере на 55 %, по меньшей мере на 60 %, по меньшей мере на 65 %, по меньшей мере на 70 %, по меньшей мере на 75 %, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 100% выше, чем активность соответствующего полноразмерного CFTR.

[0090] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) по изобретению содержит нуклеотидную последовательность (например, ОРС), кодирующую фрагмент CFTR, который по меньшей мере на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24% или 25% короче, чем CFTR дикого типа.

[0091] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК,

например, мРНК) по изобретению содержит нуклеотидную последовательность (например, ОРС), кодирующую полипептид CFTR (например, последовательность дикого типа, функциональный фрагмент или его вариант), при этом нуклеотидная последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 142.

[0092] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) по изобретению содержит нуклеотидную последовательность (например, ОРС), кодирующую полипептид CFTR (например, последовательность дикого типа, функциональный фрагмент или его вариант), при этом нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 142.

[0093] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) по изобретению содержит нуклеотидную последовательность (например, ОРС), кодирующую полипептид CFTR (например, последовательность дикого типа, функциональный фрагмент или его вариант), при этом нуклеотидная последовательность имеет от 90% до 100%, от 95% до 100%, от 97% до 100%, от 98% до 100%, от 90% до 95%, от 90% до 97%, от 90% до 98%, от 95% до 97%, от 95% до 98% или от 95% до 99% идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 142.

[0094] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) по изобретению содержит нуклеотидную последовательность (например, ОРС), кодирующую полипептид CFTR (например, последовательность дикого типа, функциональный фрагмент или его вариант), при этом нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 142.

[0095] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) по изобретению содержит нуклеотидную последовательность (например, ОРС), кодирующую полипептид CFTR (например, последовательность дикого типа, функциональный фрагмент или его вариант), при этом нуклеотидная последовательность имеет от 90% до 100%, от 95% до 100%, от 97% до 100%, от 98% до 100%, от 90% до 95%, от 90% до 97%, от 90% до 98%, от 95% до 97%, от 95% до 98% или от 95% до 99% идентичности последовательности с последовательностью

SEQ ID NO: 142.

[0096] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) по изобретению содержит нуклеотидную последовательность (например, ОРС), кодирующую полипептид CFTR (например, последовательность дикого типа, функциональный фрагмент или его вариант), при этом нуклеотидная последовательность на 90-100% идентична; на 91-99% идентична; на 92-98% идентична; на 93-97% идентична или на 94-96% идентична последовательности SEQ ID NO: 142

[0097] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) по изобретению содержит от около 4400 до около 100 000 нуклеотидов (*например,* от 4400 до 4500, от 4400 до 4600, от 4400 до 4700, от 4400 до 4800, от 4400 до 4900, от 4400 до 5000, от 4400 до 7000, от 4400 до 10 000, от 4400 до 25 000, от 4400 до 50 000, от 4400 до 70 000, от 4400 до 100 000, от 4635 до 4700, от 4635 до 4800, от 4635 до 4900, от 4635 до 5000, от 4635 до 7000, от 4635 до 10 000, от 4635 до 25 000, от 4635 до 50 000, от 4635 до 70 000 или от 4635 до 100 000).

[0098] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению (например, РНК, например, мРНК) содержит нуклеотидную последовательность (например, ОРС), кодирующую полипептид CFTR (например, последовательность дикого типа, функциональный фрагмент или его вариант), при этом длина нуклеотидной последовательности (например, ОРС) составляет по меньшей мере 500 нуклеотидов (*например*, по меньшей мере или более около 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1050, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4635, 4700, 4800, 4900, 5000, 5100, 5200, 5300, 5400, 5500, 5600, 5700, 5800, 5900, 6000, 7000, 8000, 9000, 10 000, 20 000, 30 000, 40 000, 50 000, 60 000, 70 000, 80 000, 90 000 или до 100 000 нуклеотидов включительно).

[0099] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению (например, РНК, например, мРНК) содержит нуклеотидную последовательность (например, ОРС, например, последовательность SEQ ID NO: 142), кодирующую полипептид CFTR (например, последовательность дикого типа, функциональный фрагмент или его вариант), дополнительно содержит 5'-UTR (например, выбранный из последовательностей SEQ ID NO: 24 и 25) и 3'-UTR (например, SEQ ID NO: 45). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) по изобретению содержит последовательность SEQ ID NO: 142. В другом

варианте осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) содержит 5'-концевой кэп (например, m^7G-ppp-Gm-AG, Кэп 0, Кэп 1, ARCA, инозин, N1-метилгуанозин, 2'-фторгуанозин, 7-деазагуанозин, 8-оксогуанозин, 2-аминогуанозин, ЗНК-гуанозин, 2-азидогуанозин, Кэп 2, Кэп 4, 5'-метил-G-кэп или их аналог) и область хвоста поли-А (например, длиной около 100 нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит хвост поли-А. В некоторых случаях хвост поли-А имеет длину 50-150 (SEQ ID NO: 121), 75-150 (SEQ ID NO: 122), 85-150 (SEQ ID NO: 123), 90-120 (SEQ ID NO: 125), 90-130 (SEQ ID NO: 126) или 90-150 (SEQ ID NO: 124) нуклеотидов. В некоторых случаях хвост поли-А имеет длину 100 нуклеотидов (SEQ ID NO: 127). В некоторых случаях хвост поли-А защищен (например, инвертированным дезокситимидином). В некоторых случаях хвост поли-А содержит A100-UCUAG-A20-инвертированный дезокситимидин (SEQ ID NO: 211). В некоторых случаях хвост поли-А представляет собой A100-UCUAG-A20-инвертированный дезокситимидин (SEQ ID NO: 211).

[0100] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению (например, РНК, например, мРНК) содержит нуклеотидную последовательность (например, ОРС), кодирующую полипептид CFTR (например, последовательность дикого типа, функциональный фрагмент или его вариант), дополнительно содержит по меньшей мере одну некодирующую последовательность нуклеиновой кислоты, например, сайт связывания микроРНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) по изобретению дополнительно содержит 5'-UTR (например, выбранную из последовательностей SEQ ID NO: 2 или 6-23 или выбранную из последовательностей SEQ ID NO: 2-5) и 3'-UTR (например, выбранную из последовательностей SEQ ID NO: 29-37 или выбранную из последовательностей SEQ ID NO: 37-44). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) по изобретению содержит последовательность SEQ ID NO: 142. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) по изобретению содержит последовательность SEQ ID NO: 143 или 144. В другом варианте осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) содержит 5'-концевой кэп (например, m^7G-ppp-Gm-AG, Кэп 0, Кэп 1, ARCA, инозин, N1-метилгуанозин, 2'-фторгуанозин, 7-деазагуанозин, 8-оксогуанозин, 2-аминогуанозин, ЗНК-гуанозин, 2-азидогуанозин, Кэп 2, Кэп 4, 5'-метил-G-кэп или их аналог) и область хвоста поли-А (например, длиной около 100 нуклеотидов, например, A100-UCUAG-A20-инвертированный дезокситимидин (SEQ ID NO: 211)). В другом варианте

осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) содержит 3'-UTR, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, 36 или 44, или любой их комбинации. В другом варианте осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) содержит 3'-UTR, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-44 или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 3'-UTR, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 3'-UTR, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 3'-UTR, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 3'-UTR, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 3'-UTR, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 3'-UTR, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 3'-UTR, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит хвост поли-А. В некоторых случаях хвост поли-А имеет длину 50-150 (SEQ ID NO: 121), 75-150 (SEQ ID NO: 122), 85-150 (SEQ ID NO: 123), 90-120 (SEQ ID NO: 125), 90-130 (SEQ ID NO: 126) или 90-150 (SEQ ID NO: 124) нуклеотидов. В некоторых случаях хвост поли-А имеет длину 100 нуклеотидов (SEQ ID NO: 127). В некоторых случаях хвост поли-А защищен (например, инвертированным дезокситимидином). В некоторых случаях хвост поли-А содержит A100-UCUAG-A20-инвертированный дезокситимидин (SEQ ID NO: 211). В некоторых случаях хвост поли-А представляет собой A100-UCUAG-A20-инвертированный дезокситимидин (SEQ ID NO: 211).

[0101] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению (например, РНК, например, мРНК) содержит нуклеотидную последовательность (например, ОРС, например, последовательность SEQ ID NO: 142), кодирующую полипептид CFTR (например, последовательность дикого типа, функциональный фрагмент или его вариант), дополнительно содержит 5'-UTR (например, выбранный из последовательностей SEQ ID NO: 2-28) и 3'-UTR (например, выбранные из последовательностей SEQ ID NO: 29-71). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) по изобретению содержит

последовательность SEQ ID NO: 142. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) по изобретению содержит последовательность SEQ ID NO: 143 или 144. В другом варианте осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) содержит 5'-концевой кэп (например, m^7G-ppp-Gm-AG, Кэп 0, Кэп 1, ARCA, инозин, N1-метилгуанозин, 2'-фторгуанозин, 7-деазагуанозин, 8-оксогуанозин, 2-аминогуанозин, ЗНК-гуанозин, 2-азидогуанозин, Кэп 2, Кэп 4, 5'-метил-G-кэп или их аналог) и область хвоста поли-А (например, длиной около 100 нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит хвост поли-А. В некоторых случаях хвост поли-А имеет длину 50-150 (SEQ ID NO: 121), 75-150 (SEQ ID NO: 122), 85-150 (SEQ ID NO: 123), 90-120 (SEQ ID NO: 125), 90-130 (SEQ ID NO: 126) или 90-150 (SEQ ID NO: 124) нуклеотидов. В некоторых случаях хвост поли-А имеет длину 100 нуклеотидов (SEQ ID NO: 127). В некоторых случаях хвост поли-А защищен (например, инвертированным дезокситимидином). В некоторых случаях хвост поли-А содержит A100-UCUAG-A20-инвертированный дезокситимидин (SEQ ID NO: 211). В некоторых случаях хвост поли-А представляет собой A100-UCUAG-A20-инвертированный дезокситимидин (SEQ ID NO: 211).

[0102] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению (например, РНК, например, мРНК) содержит 5'-UTR, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 28, и нуклеотидную последовательность (например, ОРС), кодирующую полипептид CFTR SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) содержит 5'-UTR, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 28, нуклеотидную последовательность (например, ОРС), кодирующую полипептид CFTR SEQ ID NO: 1, и 3'-UTR, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 45.

[0103] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению (например, РНК, например, мРНК) содержит 5'-UTR, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 25, и нуклеотидную последовательность (например, ОРС), кодирующую полипептид CFTR SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) содержит 5'-UTR, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 25, нуклеотидную последовательность (например, ОРС), кодирующую полипептид CFTR SEQ ID NO: 1, и 3'-UTR, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 45.

[0104] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению (например, РНК, например, мРНК) содержит 5'-UTR, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24, и нуклеотидную последовательность (например, ОРС), кодирующую полипептид CFTR SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) содержит 5'-UTR, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24, нуклеотидную последовательность (например, ОРС), кодирующую полипептид CFTR SEQ ID NO: 1, и 3'-UTR, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 45.

[0105] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению (например, РНК, например, мРНК) содержит нуклеотидную последовательность (например, ОРС), кодирующую полипептид CFTR, является одноцепочечным или двухцепочечным.

[0106] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению, содержащий нуклеотидную последовательность (например, ОРС), кодирующую полипептид CFTR (например, последовательность дикого типа, функциональный фрагмент или его вариант), представляет собой ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению представляет собой РНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению представляет собой мРНК или функционирует как мРНК. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит нуклеотидную последовательность (например, ОРС), которая кодирует по меньшей мере один полипептид CFTR и способна транслироваться с образованием кодируемого полипептида CFTR *in vitro, in vivo, in situ* или *ex vivo*.

[0107] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению (например, РНК, например, мРНК) содержит нуклеотидную последовательность с оптимизированной последовательностью (например, ОРС), кодирующую полипептид CFTR (например, последовательность дикого типа, функциональный фрагмент или его вариант, см., например, SEQ ID NO: 142), при этом полинуклеотид содержит по меньшей мере одно химически модифицированное азотистое основание, например, N1-метилпсевдоурацил или 5-метоксиурацил. В некоторых вариантах осуществления все урацилы в полинуклеотиде представляют собой N1-метилпсевдоурацилы. В некоторых вариантах осуществления все урацилы в полинуклеотиде представляют собой 5-метоксиурацилы. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно содержит сайт связывания

микроРНК, например, сайт связывания микроРНК, который связывается с miR-142, и/или сайт связывания микроРНК, который связывается с miR-126.

[0108] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК), описанный в данном документе, составлен с средством доставки, содержащим, например, соединение формулы (I), например, любое из Соединений 1-232, например, Соединение II; соединение формулы (III), (IV), (V) или (VI), например, любое из Соединений 233-342, например, Соединение VI; или соединение формулы (VIII), например, любое из Соединений 419-428, например, Соединение I, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 50±25:10±8:38,5±20:1,5±1,25. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 50±12,5:10±4:38,5±10:1,5±0,75. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 50±5:10±2:38,5±5:1,5±0,25. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 50:10:38,5:1,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 50±25:10±8:38,5±20:1,5±1,25. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 50±12,5:10±4:38,5±10:1,5±0,75. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 50±5:10±2:38,5±5:1,5±0,25. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 50:10:38,5:1,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 50,5±25:10,1±8:38,9±20:0,5±0,75. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 50,5±12,5:10,1±4:38,9±10:0,5±0,375. В некоторых вариантах осуществления

средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 50,5±6,25:10,1±2:38,9±5:0,5±0,15. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 50,5:10,1:38,9:0,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 50,5±25:10,1±8:38,9±20:0,5±0,75. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 50,5±12,5:10,1±4:38,9±10:0,5±0,375. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 50,5±6,25:10,1±2:38,9±5:0,5±0,15. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 50,5:10,1:38,9:0,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 49±25:11,2±8:39,3±20:0,5±0,25. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 49±12,5:11,2±4:39,3±10:0,5±0,125. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 49±6,25:11,2±2:39,3±5:0,5±0,05. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 49:11,2:39,3:0,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 49±25:11,2±8:39,3±20:0,5±0,25. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 49±12,5:11,2±4:39,3±10:0,5±0,125. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 49±6,25:11,2±2:39,3±5:0,5±0,05.

В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 49:11,2:39,3:0,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II или VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением в диапазоне от около 30 до около 60 моль % Соединения II или VI (или родственного подходящего аминолипида) (например, 30-40, 40-45, 45-50, 50-55 или 55-60 моль % Соединения II или VI (или родственного подходящего аминолипида)), от около 5 до около 20 моль % фосфолипида (или родственного подходящего фосфолипида или «вспомогательного липида») (например, 5-10, 10-15 или 15-20 моль % фосфолипида (или родственного подходящего фосфолипида или «вспомогательного липида»)), от около 20 до около 50 моль % холестерина (или родственного стерола или «некатионного» липида) (например, около 20-30, 30-35, 35-40, 40-45 или 45-50 моль % холестерина (или родственного стерола или «некатионного» липида)) и от около 0,05 до около 10 моль % липида ПЭГ (или другого подходящего липида ПЭГ) (например, 0,05-1, 1-2, 2-3, 3-4, 4-5, 5-7 или 7-10 моль% липида ПЭГ (или другого подходящего липида ПЭГ)). Иллюстративное средство доставки может иметь молярное соотношение, например, 47,5:10,5:39,0:3,0 или 50:10:38,5:1,5. В некоторых случаях иллюстративное средство доставки может иметь молярные соотношения, например, 47,5:10,5:39,0:3; 47,5:10:39,5:3; 47,5:11:39,5:2; 47,5:10,5:39,5:2,5; 47,5:11:39:2,5; 48,5:10:38,5:3; 48,5:10,5:39:2; 48,5:10,5:38,5:2,5; 48,5:10,5:39,5:1,5; 48,5:10,5:38,0:3; 47:10,5:39,5:3; 47:10:40,5:2,5; 47:11:40:2; 47:10,5:39,5:3; 48:10,5:38,5:3; 48:10:39,5:2,5; 48:11:39:2 или 48:10,5:38,5:3. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II или VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 47,5:10,5:39,0:3,0. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II или VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 50:10:38,5:1,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II или VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 50,5:10,1:38,9:0,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II или VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 49:11,2:39,3:0,5. Если не указано иное, молярные соотношения/проценты, описанные в данном документе, относятся к композиции для доставки и не относятся к транспортируемой молекуле (например,

терапевтической нуклеиновой кислоте, например, полинуклеотиду, например, мРНК).

[0109] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК), описанный в данном документе, составлен с средством доставки, содержащим, например, соединение формулы (I), например, любое из Соединений 1-232, например, Соединение II; соединение формулы (III), (IV), (V) или (VI), например, любое из Соединений 233-342, например, Соединение VI; соединение формулы (VIII), например, любое из Соединений 419-428, например, Соединение I, или соединение формулы A1, A2, A3, A4 или A5, например, любое из SA1-SA41, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 47,6±25:9,5±8:36,6±20:1,4±1,25:4,9±2,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 47,6±12,5:9,5±4:36,6±10:1,4±0,75:4,9±1,25. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 47,6±6,25:9,5±2:36,6±5:1,4±0,375:4,9±0,625. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 47,6:9,5:36,6:1,4:4,9. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 47,6±25:9,5±8:36,6±20:1,4±1,25:4,9±2,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 47,6±12,5:9,5±4:36,6±10:1,4±0,75:4,9±1,25. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 47,6±6,25:9,5±2:36,6±5:1,4±0,375:4,9±0,625. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 47,6:9,5:36,6:1,4:4,9. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67

или его соль, например, с молярным соотношением около 47,3±25:9,5±8:36,4±20:1,4±1,25:5,5±2,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 47,3±12,5:9,5±4:36,4±10:1,4±0,75:5,5±1,25. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 47,3±6,25:9,5±2:36,4±5:1,4±0,375:5,5±0,625. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 47,3:9,5:36,4:1,4:5,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 47,3±25:9,5±8:36,4±20:1,4±1,25:5,5±2,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 47,3±12,5:9,5±4:36,4±10:1,4±0,75:5,5±1,25. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 47,3±6,25:9,5±2:36,4±5:1,4±0,375:5,5±0,625. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 47,3:9,5:36,4:1,4:5,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 45,8±25:10,5±8:36,8±20:1,4±1,25:5,5±2,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 45,8±12,5:10,5±4:36,8±10:1,4±0,75:5,5±1,25. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 45,8±6,25:10,5±2:36,8±5:1,4±0,375:5,5±0,625. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 45,8:10,5:36,8:1,4:5,5. В некоторых вариантах осуществления

средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 45,8±25:10,5±8:36,8±20:1,4±1,25:5,5±2,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 45,8±12,5:10,5±4:36,8±10:1,4±0,75:5,5±1,25. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 45,8±6,25:10,5±2:36,8±5:1,4±0,375:5,5±0,625. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 45,8:10,5:36,8:1,4:5,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II или VI, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением в диапазоне от около 30 до около 60 моль % Соединения II или VI (или родственного подходящего аминолипида) (например, 30-40, 40-45, 45-50, 50-55 или 55-60 моль % Соединения II или VI (или родственного подходящего аминолипида)), от около 5 до около 20 моль % фосфолипида (или родственного подходящего фосфолипида или «вспомогательного липида») (например, 5-10, 10-15 или 15-20 моль % фосфолипида (или родственного подходящего фосфолипида или «вспомогательного липида»)), от около 20 до около 50 моль % холестерина (или родственного стерола или «некатионного» липида) (например, около 20-30, 30-35, 35-40, 40-45 или 45-50 моль % холестерина (или родственного стерола или «некатионного» липида)), от около 0,05 до около 10 моль % липида ПЭГ (или другого подходящего липида ПЭГ) (например, 0,05-1, 1-2, 2-3, 3-4, 4-5, 5-7 или 7-10 моль% липида ПЭГ (или другого подходящего липида ПЭГ)) и от около 1 до около 10 моль % GL-67 или его соли (например, 1-3, 3-5, 5-7, 7-10, 3-8, 3,5-6,5 моль % GL-67 или его соли). Иллюстративное средство доставки может иметь молярное соотношение, например, 47,6:9,5:36,6:1,4:4,9, 47,3:9,5:36,4:1,4:5,5 или 45,8:10,5:36,8:1,4:5,5. В некоторых случаях иллюстративное средство доставки может иметь молярное соотношение, например, 48:9,5:35,5:1,5:5,5; 47:10:36:1,5:5,5; 46:10,5:36,5:1,5:5,5; 45:10,5:37,5:1,5:5,5; 48:9,5:36:1,5:5; 47:10:36,5:1,5:5; 46:10,5:37:1,5:5; или 45:10,5:38:1,5:5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II или VI, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 47,6:9,5:36,6:1,4:4,9. В

некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II или VI, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 47,3:9,5:36,4:1,4:5,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II или VI, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 45,8:10,5:36,8:1,4:5,5.

[0110] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка для лечения МВ, например, полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК), описанный в данном документе, составлен с средством доставки, содержащим, например, соединение формулы (I), например, любое из Соединений 1-232, например, Соединение II; соединение формулы (III), (IV), (V) или (VI), например, любое из Соединений 233-342, например, Соединение VI; или соединение формулы (VIII), например, любое из Соединений 419-428, например, Соединение I, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 49,5±3:10,5±2:39±3:1±0,75. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 49,5±3:10,5±2:39±3:1±0,75. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит около 48-52 моль % Соединения II или VI (или родственного подходящего аминолипида) (например, 48-51, 48-50, 49-52 или 49-51 моль % Соединения II или VI (или родственного подходящего аминолипида)), около 9-12 моль % фосфолипида (или родственного подходящего фосфолипида или «вспомогательного липида») (например, 9-11, 9-10, 10-12, 10-11,5, 10-11 моль % фосфолипида (или родственного подходящего фосфолипида или «вспомогательного липида»)), около 36-42 моль % холестерина (или родственного стерола или «некатионного» липида) (например, около 36-41, 36-40, 37-40 или 38-40 моль % холестерина (или родственного стерола или «некатионного» липида)) и около 0,25-2,5 моль % липида ПЭГ (или другого подходящего липида ПЭГ) (например, 0,25-2, 0,25-1,5, 0,25-2 или 0,5-1,5 моль% липида ПЭГ (или другого подходящего липида ПЭГ)).

[0111] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка для лечения МВ, например, полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК), описанный в данном документе, составлен с средством доставки, содержащим, например, соединение формулы (I), например, любое из Соединений 1-232, например, Соединение II;

соединение формулы (III), (IV), (V) или (VI), например, любое из Соединений 233-342, например, Соединение VI; соединение формулы (VIII), например, любое из Соединений 419-428, например, Соединение I, или соединение формулы A1, A2, A3, A4 или A5, например, любое из SA1-SA41, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 46,5±3:10±2:36±3:1,25±0,75:4,5±1,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 46,5±3:10±2:36±3:1,25±0,75:4,5±1,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит около 43-49 моль % Соединения II или VI (или родственного подходящего аминолипида) (например, 43-48, 44-48, 45-48 или 45,5-48 моль % Соединения II или VI (или родственного подходящего аминолипида)), около 8-12 моль % фосфолипида (или родственного подходящего фосфолипида или «вспомогательного липида») (например, 8-11, 8-10, 9-12, 9-11, 9,5-10,5 моль % фосфолипида (или родственного подходящего фосфолипида или «вспомогательного липида»)), около 33-39 моль % холестерина (или родственного стерина или «некатионного» липида) (например, около 33-38, 34-38, 35-38, или 36–37 моль % холестерина (или родственного стерола, или «некатионного» липида)), около 0,5–2 моль % липида ПЭГ (или другого подходящего липида ПЭГ) (например, 0,5–1,5, 0,75–1,5 или 1-1,5 моль % липида ПЭГ (или другого подходящего липида ПЭГ)) и около 3-6 моль % катионного агента (например, стеринамина) (например, 3-5, 3-4,5, 4-6 или 5-6 моль % катионного агента (например, стеринамина)). В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин,ДМГ-ПЭГ-2k и GL-67.В дополнительных вариантах осуществления средство для доставки содержит около 45-48 моль % Соединения II, около 9-11 моль % DSPC, около 35-38 моль % холестерина, около 1-3 моль % DMG-ПЭГ-2k и около 4-6 моль % GL-67.В дополнительных вариантах осуществления средство для доставки содержит около 45-48 моль % Соединения II, около 9-11 моль % DSPC, около 35-38 моль % холестерина, около 1-3 моль % DMG-ПЭГ-2k и около 4-6 моль % GL-67. В дополнительных вариантах осуществления средство для доставки содержит около 45,8-47,6 моль % Соединения II, около 9,5-10,5 моль % DSPC, около 36,4-36,8 моль % холестерина, около 1,4 моль % DMG-ПЭГ-2k и около 4,9-5,5 моль % GL-67.

[0112] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка для лечения MB,

например, полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК), описанный в данном документе, составлен с средством доставки, содержащим, например, соединение формулы (I), например, любое из Соединений 1-232, например, Соединение II; соединение формулы (III), (IV), (V) или (VI), например, любое из Соединений 233-342, например, Соединение VI; соединение формулы (VIII), например, любое из Соединений 419-428, например, Соединение I, или соединение формулы A1, A2, A3, A4 или A5, например, любое из SA1-SA41, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 47±3:10±2:36±3:1,25±0,75:4,5±1,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 46,5±3:10±2:36±3:1,25±0,75:4,5±1,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит около 43-49 моль % Соединения II или VI (или родственного подходящего аминолипида) (например, 43–48, 44–48, 45–48 или 45,5–48 моль % Соединения II или VI (или родственного подходящего аминолипида)), около 8-12 моль % фосфолипида (или родственного подходящего фосфолипида или «вспомогательного липида») (например, 8-11, 8-10, 9-12, 9-11, 9,5-10,5 моль % фосфолипида (или родственного подходящего фосфолипида или «вспомогательного липида»)), около 33-39 моль % холестерина (или родственного стерола или «некатионного» липида) (например, около 33–38, 34–38, 35–38 или 36–37 моль % холестерина (или родственного стерола или «некатионного» липида)), около 0,5-2 моль % липида ПЭГ (или другого подходящего липида ПЭГ) (например, 0,5-1,5, 0,75-1,5 или 1-1,5 моль% липида ПЭГ (или другого подходящего липида ПЭГ)) и около 3-6 моль % катионного агента (например, стеринамина) (например, 3-5, 3-4,5, 4-6 или 5-6 моль % катионного агента (например, стеринамина)).

[0113] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК), описанный в данном документе, составлен с средством доставки, содержащим ЛНЧ-01 (см. Пример 16).

[0114] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК), описанный в данном документе, составлен с средством доставки, содержащим ЛНЧ-02 (см. Пример 16).

[0115] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК), описанный в данном документе, составлен с средством доставки, содержащим ЛНЧ-03, ЛНЧ-04, ЛНЧ-05 или ЛНЧ-06 (см. Пример 16).

[0116] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению представляет собой мРНК, которая содержит 5'-концевой кэп (например, m^7G-ppp-Gm-AG), 5'-UTR (например, SEQ ID NO: 25), последовательность ОРС SEQ ID NO: 142, 3'-UTR (например, SEQ ID NO: 45) и хвост поли-А (например, длиной около 100 нуклеотидов, например, A100-UCUAG-A20-инвертированный дезокситимидин (SEQ ID NO :211)), при этом все урацилы в полинуклеотиде представляют собой N1-метилпсевдоурацилы или 5-метоксиурацилы. В некоторых вариантах осуществления средство доставки представляет собой ЛНЧ, например, ЛНЧ-01, ЛНЧ-03, ЛНЧ-04, ЛНЧ-05 или ЛНЧ-06. В некоторых вариантах осуществления средство доставки представляет собой ЛНЧ, например, ЛНЧ-02.

[0117] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению представляет собой мРНК, которая содержит 5'-концевой кэп (например, m7G-ppp-Gm-AG), 5'-UTR (например, SEQ ID NO: 25), последовательность ОРС SEQ ID NO: 143 или 144, 3'-UTR (например, SEQ ID NO: 45) и хвост поли-А (например, длиной около 100 нуклеотидов, например, A100-UCUAG-A20-инвертированный дезокситимидин (SEQ ID NO :211)), при этом все урацилы в полинуклеотиде представляют собой N1-метилпсевдоурацилы или 5-метоксиурацилы. В некоторых вариантах осуществления средство доставки представляет собой ЛНЧ, например, ЛНЧ-01, ЛНЧ-03, ЛНЧ-04, ЛНЧ-05 или ЛНЧ-06. В некоторых вариантах осуществления средство доставки представляет собой ЛНЧ, например, или ЛНЧ-02.

[0118] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению представляет собой мРНК, которая содержит 5'-концевой кэп (например, m^7G-ppp-Gm-AG), 5'-UTR (например, SEQ ID NO: 24), последовательность ОРС SEQ ID NO: 142, 3'-UTR (например, SEQ ID NO: 45) и хвост поли-А (например, длиной около 100 нуклеотидов, например, A100-UCUAG-A20-инвертированный дезокситимидин (SEQ ID NO :211)), при этом все урацилы в полинуклеотиде представляют собой N1-метилпсевдоурацилы или 5-метоксиурацилы. В некоторых вариантах осуществления средство доставки представляет собой ЛНЧ, например, ЛНЧ-01, ЛНЧ-03, ЛНЧ-04, ЛНЧ-05 или ЛНЧ-06. В некоторых вариантах осуществления средство доставки представляет собой ЛНЧ, например, ЛНЧ-02.

[0119] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению представляет собой мРНК, которая содержит 5'-концевой кэп (например, m7G-ppp-Gm-AG), 5'-UTR (например, SEQ ID NO: 24), последовательность ОРС SEQ ID NO: 143 или 144, 3'-UTR (например, SEQ ID NO: 45) и хвост поли-А (например, длиной около 100 нуклеотидов, например, A100-UCUAG-A20-инвертированный

дезокситимидин (SEQ ID NO :211)), при этом все урацилы в полинуклеотиде представляют собой N1-метилпсевдоурацилы или 5-метоксиурацилы. В некоторых вариантах осуществления средство доставки представляет собой ЛНЧ, например, ЛНЧ-01, ЛНЧ-03, ЛНЧ-04, ЛНЧ-05 или ЛНЧ-06. В некоторых вариантах осуществления средство доставки представляет собой ЛНЧ, например, ЛНЧ-02.

[0120] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению представляет собой мРНК, которая содержит 5'-концевой кэп (например, m^7G-ppp-Gm-AG), 5'-UTR (например, SEQ ID NO: 2), последовательность ОРС SEQ ID NO: 142, 3'-UTR (например, SEQ ID NO: 29, 44 или 37) и хвост поли-А (например, длиной около 100 нуклеотидов, например, A100-UCUAG-A20-инвертированный дезокситимидин (SEQ ID NO: 211)), при этом все урацилы в полинуклеотиде представляют собой N1-метилпсевдоурацилы или 5-метоксиурацилы. В некоторых вариантах осуществления средство доставки представляет собой ЛНЧ, например, ЛНЧ-01, ЛНЧ-03, ЛНЧ-04, ЛНЧ-05 или ЛНЧ-06. В некоторых вариантах осуществления средство доставки представляет собой ЛНЧ, например, ЛНЧ-02.

[0121] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению представляет собой мРНК, которая содержит 5'-концевой кэп (например, m7G-ppp-Gm-AG), 5'-UTR (например, SEQ ID NO: 2), последовательность ОРС SEQ ID NO: 143 или 144, 3'-UTR (например, SEQ ID NO: 29, 44 или 37) и хвост поли-А (например, длиной около 100 нуклеотидов, например, A100-UCUAG-A20-инвертированный дезокситимидин (SEQ ID NO: 211)), при этом все урацилы в полинуклеотиде представляют собой N1-метилпсевдоурацилы или 5-метоксиурацилы. В некоторых вариантах осуществления средство доставки представляет собой ЛНЧ, например, ЛНЧ-01, ЛНЧ-03, ЛНЧ-04, ЛНЧ-05 или ЛНЧ-06. В некоторых вариантах осуществления средство доставки представляет собой ЛНЧ, например, ЛНЧ-02.

[0122] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению представляет собой мРНК, которая содержит 5'-концевой кэп (например, m^7G-ppp-Gm-AG), 5'-UTR (например, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5), последовательность ОРС SEQ ID NO: 142, 3'-UTR (например, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-44) и хвост поли-А (например, длиной около 100 нуклеотидов, например, A100-UCUAG-A20-инвертированный дезокситимидин (SEQ ID NO: 211)), при этом все урацилы в полинуклеотиде представляют собой N1-метилпсевдоурацилы или 5-метоксиурацилы. В некоторых вариантах осуществления средство доставки представляет собой ЛНЧ, например, ЛНЧ-01, ЛНЧ-03, ЛНЧ-04, ЛНЧ-05 или ЛНЧ-06. В некоторых вариантах осуществления

средство доставки представляет собой ЛНЧ, например, ЛНЧ-02.

[0123] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению представляет собой мРНК, которая содержит 5'-концевой кэп (например, m^7G-ppp-Gm-AG), 5'-UTR (например, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5), последовательность ОРС SEQ ID NO: 143 или 144, 3'-UTR (например, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-44) и хвост поли-А (например, длиной около 100 нуклеотидов, например, A100-UCUAG-A20-инвертированный дезокситимидин (SEQ ID NO: 211)), при этом все урацилы в полинуклеотиде представляют собой N1-метилпсевдоурацилы или 5-метоксиурацилы. В некоторых вариантах осуществления средство доставки представляет собой ЛНЧ, например, ЛНЧ-01, ЛНЧ-03, ЛНЧ-04, ЛНЧ-05 или ЛНЧ-06. В некоторых вариантах осуществления средство доставки представляет собой ЛНЧ, например, ЛНЧ-02.

[0124] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению представляет собой мРНК, которая содержит 5'-концевой кэп (например, кэп 1), 5'-UTR (например, SEQ ID NO: 2), последовательность ОРС SEQ ID NO: 142, 3′-UTR (например, SEQ ID NO: 29, 44 или 37) и хвост поли-А (например, длиной около 100 нуклеотидов), при этом все урацилы в полинуклеотиде представляют собой N1-метилпсевдоурацилы или 5-метоксиурацилы. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II или Соединение VI в качестве ионизируемого липида и ПЭГ-ДМГ или Соединение I в качестве липида ПЭГ.

[0125] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению представляет собой мРНК, которая содержит 5'-концевой кэп (например, кэп 1), 5'-UTR (например, SEQ ID NO: 2), последовательность ОРС SEQ ID NO: 143 или 144, 3′-UTR (например, SEQ ID NO: 29, 44 или 37) и хвост поли-А (например, длиной около 100 нуклеотидов), при этом все урацилы в полинуклеотиде представляют собой N1-метилпсевдоурацилы или 5-метоксиурацилы. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II или Соединение VI в качестве ионизируемого липида и ПЭГ-ДМГ или Соединение I в качестве липида ПЭГ.

[0126] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению представляет собой мРНК, которая содержит 5'-концевой кэп (например, кэп 1), 5'-UTR (например, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5), последовательность ОРС SEQ ID NO: 142, 3'-UTR (например, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-44) и хвост поли-А (например, длиной около 100

нуклеотидов), при этом все урацилы в полинуклеотиде представляют собой N1-метилпсевдоурацилы или 5-метоксиурацилы. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II или Соединение VI в качестве ионизируемого липида и ПЭГ-ДМГ или Соединение I в качестве липида ПЭГ.

[0127] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению представляет собой мРНК, которая содержит 5'-концевой кэп (например, кэп 1), 5'-UTR (например, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5), последовательность ОРС SEQ ID NO: 143 или 144, 3'-UTR (например, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-44) и хвост поли-А (например, длиной около 100 нуклеотидов), при этом все урацилы в полинуклеотиде представляют собой N1-метилпсевдоурацилы или 5-метоксиурацилы. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II или Соединение VI в качестве ионизируемого липида и ПЭГ-ДМГ или Соединение I в качестве липида ПЭГ.

3. Сигнальные последовательности

[0128] Полинуклеотиды (например, РНК, например, мРНК) по изобретению могут также содержать нуклеотидные последовательности, которые кодируют дополнительные признаки, облегчающие перенос кодируемых полипептидов в терапевтически значимые сайты. Одним из таких признаков, который способствует транспортировке белков, является сигнальная последовательность или нацеливающую последовательность. Пептиды, кодируемые этими сигнальными последовательностями, известны под разными названиями, включая нацеливающие пептиды, транзитные пептиды и сигнальные пептиды. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) содержит нуклеотидную последовательность (например, ОРС), которая кодирует сигнальный пептид, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид CFTR, описанный в данном документе.

[0129] В некоторых вариантах осуществления «сигнальная последовательность» или «сигнальный пептид» представляет собой полинуклеотид или полипептид, соответственно, который имеет длину около 30-210, например, около 45-80 или 15-60 нуклеотидов (например, около 20, 30, 40, 50, 60 или 70 аминокислот), который, необязательно, включен на 5' (или N-конце) кодирующей области полинуклеотида

или полипептида, соответственно. Добавление этих последовательностей приводит к транспортировке кодируемого полипептида в желаемый сайт, такой как эндоплазматический ретикулум или митохондрии, посредством одного или нескольких путей нацеливания. Некоторые сигнальные пептиды отщепляются от белка, например, сигнальной пептидазой после того, как белки транспортируются в желаемый участок.

[0130] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR, при этом нуклеотидная последовательность дополнительно содержит 5'-последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный сигнальный пептид.

4. Слитые белки

[0131] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению (например, РНК, например, мРНК) может содержать более одной последовательности нуклеиновой кислоты (например, ОРС), кодирующей интересующий полипептид. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по изобретению содержат одну ОРС, кодирующую полипептид CFTR, его функциональный фрагмент или вариант. Однако в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению может содержать более одной ОРС, например, первую ОРС, кодирующую полипептид CFTR (первый интересующий полипептид), его функциональный фрагмент или вариант, и вторую ОРС, экспрессирующую второй интересующий полипептид. В некоторых вариантах осуществления два или более интересующих полипептида могут быть генетически слиты, т. е. два или более полипептида могут кодироваться одной и той же ОРС. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую линкер (например, пептидный линкер G_4S (SEQ ID NO: 74) или другой линкер, известный в данной области техники) между двумя или более интересующими полипептидами.

[0132] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению (например, РНК, например, мРНК) может содержать две, три, четыре или более ОРС, каждая из которых экспрессирует интересующий полипептид.

[0133] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению (например, РНК, например, мРНК) может содержать первую последовательность

нуклеиновой кислоты (например, первую ОРС), кодирующую полипептид CFTR, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты (например, вторую ОРС), кодирующую второй интересующий полипептид.

Линкеры и расщепляемые пептиды

[0134] В некоторых вариантах осуществления мРНК по изобретению кодируют более одного домена CFTR или гетерологичного домена, называемых в данном документе мультимерными конструкциями. В некоторых вариантах осуществления мультимерных конструкций мРНК дополнительно кодирует линкер, расположенный между каждым доменом. Линкер может быть, например, расщепляемым линкером или чувствительным к протеазе линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер выбран из группы, состоящей из линкера F2A, линкера P2A, линкера T2A, линкера E2A и их комбинаций. Это семейство саморасщепляющихся пептидных линкеров, называемых пептидами 2A, было описано в данной области техники (см., например, Kim, J.H. et al. (2011) PLoS ONE 6:e18556). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой линкер F2A. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой линкер GGGS (SEQ ID NO: 75). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой линкер (GGGS)n (SEQ ID NO: 76), где n = 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления мультимерная конструкция содержит три домена с промежуточными линкерами, имеющие структуру: домен-линкер-домен-линкер-домен, например, домен CFTR-линкер-домен CFTR-линкер-домен CFTR.

[0135] В одном варианте осуществления расщепляемый линкер представляет собой линкер F2A (например, имеющий аминокислотную последовательность GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 115)). В других вариантах осуществления расщепляемый линкер представляет собой линкер T2A (например, имеющий аминокислотную последовательность GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP (SEQ ID NO: 116)), линкер P2A (например, имеющий аминокислотную последовательность GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO: 117)) или линкер E2A (например, имеющий аминокислотную последовательность GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 118)). Специалисту в данной области техники будет понятно, что другие известные в данной области техники линкеры могут быть подходящими для использования в конструкциях по изобретению (например, кодируемых полинуклеотидами по изобретению). Специалисту в данной области техники будет также понятно, что другие мультицистронные конструкции могут быть подходящими для использования в

изобретении. В иллюстративных вариантах осуществления схема конструкции дает приблизительно эквимолярные количества интратела и/или его домена, кодируемых конструкциями по изобретению.

[0136] В одном варианте осуществления саморасщепляющийся пептид может представлять собой, помимо прочего, пептид 2A. В данной области техники известны и доступны различные пептиды 2A, которые могут быть использованы, включая, например, пептид 2A вируса ящура (FMDV), пептид 2A вируса ринита A лошадей, пептид 2A вируса Thosea asigna и пептид 2A свиного тешовируса-1. Пептиды 2A используются несколькими вирусами для создания двух белков из одного транскрипта путем пропуска рибосомы, так что нормальная пептидная связь нарушается в последовательности пептида 2A, в результате чего два прерывистых белка продуцируются в результате одного события трансляции. В качестве неограничивающего примера пептид 2A может иметь последовательность белка SEQ ID NO: 117, ее фрагменты или варианты. В одном варианте осуществления пептид 2A расщепляется между последним глицином и последним пролином. В качестве еще одного неограничивающего примера полинуклеотиды по данному изобретению могут включать полинуклеотидную последовательность, кодирующую пептид 2A, имеющий последовательность белка фрагментов или вариантов SEQ ID NO: 117. Одним из примеров полинуклеотидной последовательности, кодирующей пептид 2A, является: GGAAGCGGAGCUACUAACUUCAGCCUGCUGAAGCAGGCUGGAGACGUGGA GGAGAACCCUGGACCU (SEQ ID NO: 119). В одном иллюстративном варианте осуществления пептид 2A кодируется следующей последовательностью: 5′-UCCGGACUCAGAUCCGGGGAUCUCAAAAUUGUCGCUCCUGUCAAACAAAC UCUUAACUUUGAUUUACUCAAACUGGCTGGGGAUGUAGAAAGCAAUCCAG GTCCACUC-3′(SEQ ID NO: 120). Полинуклеотидная последовательность пептида 2A может быть модифицирована или оптимизирована по кодонам способами, описанными в данном документе, и/или известными в данной области техники.

[0137] В одном варианте осуществления эта последовательность может использоваться для разделения кодирующих областей двух или более представляющих интерес полипептидов. В качестве неограничивающего примера, последовательность, кодирующая пептид F2A, может находиться между первой кодирующей областью A и второй кодирующей областью B (A-F2Apep-B). Присутствие пептида F2A приводит к расщеплению одного длинного белка между глицином и пролином в конце пептидной последовательности F2A (NPGP (SEQ ID

NO: 130) расщепляется с образованием NPG и P), образуя тем самым отдельный белок A (с 21 аминокислотой присоединенного пептида F2A, заканчивающегося NPG) и отдельный белок B (с 1 аминокислотой P присоединенного пептида F2A). Аналогично, для других пептидов 2A (P2A, T2A и E2A) присутствие пептида в длинном белке приводит к расщеплению между глицином и пролином в конце последовательности пептида 2A (NPGP (SEQ ID NO: 130) расщепляется с образованием NPG и P). Белок A и белок B могут представлять собой одинаковые или разные интересующие пептиды или полипептиды (например, полипептид CFTR, такой как полноразмерный CFTR человека).

5. Оптимизация последовательности нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид CFTR

[0138] Полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) по изобретению имеет оптимизированную последовательность. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) по изобретению содержит нуклеотидную последовательность (например, ОРС), кодирующую полипептид CFTR, необязательно, нуклеотидную последовательность (например, ОРС), кодирующую другой интересующий полипептид, 5'-UTR, 3'-UTR, (5'-UTR или 3'-UTR, необязательно, содержащие по меньшей мере один сайт связывания микроРНК, необязательно нуклеотидную последовательность, кодирующую линкер, хвост поли-A или любую их комбинацию), в которых ОРС оптимизированы по последовательности.

[0139] Нуклеотидная последовательность с оптимизированной последовательностью, например, кодон-оптимизированная последовательность мРНК, кодирующая полипептид CFTR, представляет собой последовательность, содержащую по меньшей мере одну синонимичную замену азотистого основания по отношению к эталонной последовательности (например, нуклеотидной последовательности дикого типа, кодирующей полипептид CFTR).

[0140] Последовательность нуклеотидов с оптимизированной последовательностью может частично или полностью отличаться по последовательности от эталонной последовательности. Например, эталонная последовательность, кодирующая полисерин, единообразно кодируемый кодонами UCU, может быть оптимизирована по последовательности путем замены 100% ее азотистых оснований (для каждого кодона U в положении 1 заменен на A, C в положении 2 заменен на G и U в

положении 3 заменен на C), чтобы получить последовательность, кодирующую полисерин, который будет единообразно кодироваться кодонами AGC. Процент идентичности последовательности, полученный в результате глобального попарного выравнивания между эталонной последовательностью полисериновой нуклеиновой кислоты и последовательностью полисериновой нуклеиновой кислоты с оптимизированной последовательностью, будет составлять 0%. Однако белковые продукты обеих последовательностей будут на 100% идентичными.

[0141] Некоторые способы оптимизации последовательностей (также иногда называемые оптимизацией кодонов) известны в данной области техники (и более подробно обсуждаются ниже) и могут быть полезны для достижения одного или нескольких желаемых результатов. Эти результаты могут включать, например, согласование частот кодонов в определенных тканях-мишенях и/или организмах-хозяевах для обеспечения надлежащего фолдинга; смещение содержания G/C для повышения стабильности мРНК или уменьшения вторичных структур; сведение к минимуму тандемных повторов кодонов или серий оснований, которые могут нарушать построение или экспрессию генов; настраивание областей контроля транскрипции и трансляции; вставку или удаление последовательностей переноса белка; удаление/добавление сайтов посттрансляционной модификации в кодируемом белке (*например*, сайтов гликозилирования); добавление, удаление или перетасовку доменов белков; вставку или удаление сайтов рестрикции; изменение сайтов связывания рибосом и сайтов деградации мРНК; регулировку скорости трансляции, чтобы обеспечить надлежащий фолдинг различным доменам белка; и/или уменьшение или устранение проблемных вторичных структур в полинуклеотиде. В данной области техники известны инструменты, алгоритмы и сервисы оптимизации последовательности, неограничивающие примеры включают сервисы от GeneArt (Life Technologies), DNA2.0 (Menlo Park CA) и/или проприетарные методы.

[0142] Варианты кодонов для каждой аминокислоты приведены в ТАБЛИЦЕ 1.

ТАБЛИЦА 1. Варианты кодонов

Аминокислота	Однобуквенный код	Варианты кодонов
Изолейцин	I	AUU, AUC, AUA
Лейцин	L	CUU, CUC, CUA, CUG, UUA, UUG

Валин	V	GUU, GUC, GUA, GUG
Фенилаланин	F	UUU, UUC
Метионин	M	AUG
Цистеин	C	UGU, UGC
Аланин	A	GCU, GCC, GCA, GCG
Глицин	G	GGU, GGC, GGA, GGG
Пролин	P	CCU, CCC, CCA, CCG
Треонин	T	ACU, ACC, ACA, ACG
Серин	S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
Тирозин	Y	UAU, UAC
Триптофан	W	UGG
Глутамин	Q	CAA, CAG
Аспарагин	N	AAU, AAC
Гистидин	H	CAU, CAC
Глутаминовая кислота	E	GAA,GAG
Аспарагиновая кислота	D	GAU, GAC
Лизин	K	AAA, AAG
Аргинин	R	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Селеноцистеин	Sec	UGA в мРНК в присутствии элемента вставки селеноцистеина (SECIS)
Стоп-кодоны	Стоп	UAA, UAG, UGA

[0143] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) по изобретению содержит нуклеотидную последовательность с оптимизированной последовательностью (например, ОРС), кодирующую полипептид CFTR, его функциональный фрагмент или вариант, при этом полипептид CFTR, его функциональный фрагмент или вариант, кодируемый нуклеотидной последовательностью с оптимизированной последовательностью, обладает улучшенными свойствами (например, по сравнению с полипептидом CFTR, его функциональным фрагментом или вариантом, кодируемым эталонной нуклеотидной последовательностью, которая не оптимизирована по последовательности), например, улучшенными свойствами, связанными с

эффективностью экспрессии после введения *in vivo*. Такие свойства включают, помимо прочего, улучшение стабильности нуклеиновых кислот (например, стабильности мРНК), повышение эффективности трансляции в ткани-мишени, снижение количества экспрессируемых усеченных белков, улучшение фолдинга или предотвращение неправильного фолдинга экспрессированных белков, снижение токсичности экспрессируемых продуктов, уменьшение гибели клеток, вызванной экспрессируемыми продуктами, увеличение и/или уменьшение агрегации белков.

[0144] В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность с оптимизированной последовательностью (например, ОРС) является кодон-оптимизированной для экспрессии у субъектов-людей, имеет структурные и/или химические особенности, которые позволяют избежать одной или нескольких проблем в данной области техники, например, особенности, полезные для оптимизации состава и доставки терапевтических средств на основе нуклеиновых кислот при сохранении структурной и функциональной целостности; преодоления порога экспрессии; улучшения показателей экспрессии; периода полувыведения и/или концентрации белка; оптимизации локализации белка; и предотвращении вредных биологических реакций, таких как иммунный ответ и/или пути деградации.

[0145] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по изобретению содержат нуклеотидную последовательность (например, нуклеотидную последовательность (например, ОРС), кодирующую полипептид CFTR, нуклеотидную последовательность (например, ОРС), кодирующую другой интересующий полипептид, 5'-UTR, 3'-UTR, сайт связывания микроРНК, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую линкер, или любую их комбинацию), которая оптимизирована по последовательности в соответствии со способом, включающим:

(i) замену по меньшей мере одного кодона в эталонной нуклеотидной последовательности (например, ОРС, кодирующей полипептид CFTR) альтернативным кодоном для увеличения или уменьшения содержания уридина с получением уридин-модифицированной последовательности;

(ii) замену по меньшей мере одного кодона в эталонной нуклеотидной последовательности (например, ОРС, кодирующей полипептид CFTR) альтернативным кодоном, имеющим более высокую частоту кодона в наборе синонимичных кодонов;

(iii) замену по меньшей мере одного кодона в эталонной нуклеотидной последовательности (например, ОРС, кодирующей полипептид CFTR)

альтернативным кодоном для увеличения содержания G/C; или

(iv) их комбинацию.

[0146] В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность с оптимизированной последовательностью (например, ОРС, кодирующая полипептид CFTR) обладает по меньшей мере одним улучшенным свойством по сравнению с эталонной нуклеотидной последовательностью.

[0147] В некоторых вариантах осуществления способ оптимизации последовательности является многопараметрическим и включает один, два, три, четыре или более способов, описанных в данном документе, и/или другие способы оптимизации, известные в данной области техники.

[0148] Признаки, которые можно считать полезными в некоторых вариантах осуществления изобретения, могут кодироваться областями полинуклеотида или внутри них, и такие области могут располагаться выше (5'), ниже (3') или внутри области, которая кодирует полинуклеотид CFTR. Эти области могут быть включены в полинуклеотид до и/или после оптимизации последовательности области, кодирующей белок, или открытой рамки считывания (ОРС). Примеры таких признаков включают, помимо прочего, нетранслируемые области (UTR), последовательности микроРНК, последовательности Козак, последовательности олиго(dT), хвост поли-А и детектируемые метки, и могут включать множественные сайты клонирования, которые могут распознавать XbaI.

[0149] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению содержит 5'-UTR, 3'-UTR и/или сайт связывания микроРНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит две или более 5'-UTR и/или 3'-UTR, которые могут представлять собой одинаковые или разные последовательности. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит два или более сайтов связывания микроРНК, которые могут представлять собой одинаковые или разные последовательности. Любая часть 5'-UTR, 3'-UTR и/или сайта связывания микроРНК, в том числе ни одна из них, могут быть оптимизированы по последовательности и могут независимо содержать одну или несколько разных структурных или химических модификаций до и/или после оптимизации последовательности.

[0150] В некоторых вариантах осуществления после оптимизации полинуклеотид восстанавливают и трансформируют в вектор, такой как, помимо прочего, плазмиды, вирусы, космиды и искусственные хромосомы. Например, оптимизированный полинуклеотид можно реконструировать и трансформировать в

химически компетентные штаммы *E.coli*, дрожжи, нейроспоры, кукурузу, дрозофилу и т.д., в которых встречаются многокопийные плазмидоподобные или хромосомные структуры, способами, описанными в данном документе.

6. Нуклеотидные последовательности с оптимизированной последовательностью, кодирующие полипептид CFTR

[0151] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению содержит нуклеотидную последовательность с оптимизированной последовательностью, кодирующую полипептид CFTR, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению содержит открытую рамку считывания (ОРС), кодирующую полипептид CFTR, где ОРС оптимизирована по последовательности.

[0152] Типичная нуклеотидная последовательность с оптимизированной последовательностью, кодирующая полноразмерный CFTR человека, представлена как SEQ ID NO: 142. В некоторых вариантах осуществления последовательность CFTR с оптимизированной последовательностью, ее фрагмент и вариант используют для практического применения описанных в данном документе способах.

[0153] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по данному изобретению, например полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность мРНК, кодирующую полипептид CFTR, содержит от 5'-конца к 3'-концу:

(i) 5'-кэп по изобретению, например, m^7G-ppp-Gm-AG;

(ii) 5'-UTR, такую как последовательности по изобретению, например, SEQ ID NO: 25;

(iii) открытую рамку считывания, кодирующую полипептид CFTR, например, последовательность нуклеиновой кислоты с оптимизированной последовательностью, кодирующую CFTR, представленную как SEQ ID NO: 142;

(iv) по меньшей мере один стоп-кодон (если он отсутствует на 5'-конце 3'-UTR);

(v) 3'-UTR, такую как последовательности по изобретению, например, SEQ ID NO: 45; и

(vi) хвост поли-А, указанный выше (например, A100-UCUAG-A20-инвертированный дезокситимидин (SEQ ID NO: 211)).

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по данному изобретению, например полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность мРНК, кодирующую полипептид CFTR, содержит от 5'-конца к 3'-концу:

(i) 5'-кэп по изобретению, например, m^7G-ppp-Gm-AG;

(ii) 5'-UTR, такую как последовательности по изобретению, например, SEQ ID NO: 2;

(iii) открытую рамку считывания, кодирующую полипептид CFTR, например, последовательность нуклеиновой кислоты с оптимизированной последовательностью, кодирующую CFTR, представленную как SEQ ID NO: 142;

(iv) по меньшей мере один стоп-кодон (если он отсутствует на 5'-конце 3'-UTR);

(v) 3'-UTR, такую как последовательности по изобретению, например, SEQ ID NO: 29, 37 или 44; и

(vi) хвост поли-A, указанный выше (например, A100-UCUAG-A20-инвертированный дезокситимидин (SEQ ID NO: 211)).

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по данному изобретению, например полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность мРНК, кодирующую полипептид CFTR, содержит от 5'-конца к 3'-концу:

(i) 5'-кэп по изобретению, например, m^7G-ppp-Gm-AG;

(ii) 5'-UTR, такую как последовательности по изобретению, например, одну из SEQ ID NO: 2-5;

(iii) открытую рамку считывания, кодирующую полипептид CFTR, например, последовательность нуклеиновой кислоты с оптимизированной последовательностью, кодирующую CFTR, представленную как SEQ ID NO: 142;

(iv) по меньшей мере один стоп-кодон (если он отсутствует на 5'-конце 3'-UTR);

(v) 3'-UTR, такую как последовательности по изобретению, например, одну из SEQ ID NO: 37-44; и

(vi) хвост поли-A, указанный выше (например, A100-UCUAG-A20-инвертированный дезокситимидин (SEQ ID NO: 211)).

В некоторых вариантах осуществления все урацилы в полинуклеотиде представляют собой N1-метилпсевдоурацил (G5). В некоторых вариантах осуществления все урацилы в полинуклеотиде представляют собой 5-метоксиурацил (G6).

[0154] Описанные в данном документе нуклеотидные последовательности с оптимизированной последовательностью отличаются от соответствующих

нуклеотидных последовательностей дикого типа и от других известных нуклеотидных последовательностей с оптимизированной последовательностью, например, эти нуклеиновые кислоты с оптимизированной последовательностью имеют уникальные композиционные характеристики.

[0155] В некоторых вариантах осуществления процентное содержание урациловых или тиминовых азотистых оснований в нуклеотидной последовательности с оптимизированной последовательностью (например, кодирующей полипептид CFTR, его функциональный фрагмент или вариант) модифицировано (например, уменьшено) по отношению к процентному содержанию урациловых или тиминовых азотистых оснований в эталонной нуклеотидной последовательности дикого типа. Такая последовательность называется урацил-модифицированной или тимин-модифицированной последовательностью. Процент содержания урацила или тимина в нуклеотидной последовательности можно определить путем деления количества урацилов или тиминов в последовательности на общее количество нуклеотидов и умножения на 100. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность с оптимизированной последовательностью имеет более низкое содержание урацила или тимина, чем содержание урацила или тимина в эталонной последовательности дикого типа. В некоторых вариантах осуществления содержание урацила или тимина в нуклеотидной последовательности с оптимизированной последовательностью по изобретению выше, чем содержание урацила или тимина в эталонной последовательности дикого типа, и при этом сохраняются полезные эффекты, например, повышенная экспрессия и/или сниженный ответ Толл-подобный рецептора (TLR) по сравнению с эталонной последовательностью дикого типа.

[0156] Способы использования оптимизации кодонов известны в данной области техники. Например, ОРС любой одной или нескольких последовательностей, предложенных в данном документе, может быть кодон-оптимизированной. Оптимизация кодонов, в некоторых вариантах осуществления, может использоваться для согласования частот кодонов в организмах-мишенях и организмах-хозяевах для обеспечения надлежащего фолдинга; смещения содержания GC для повышения стабильности мРНК или уменьшения вторичных структур; минимизации тандемных повторных кодонов или базовых прогонов, которые могут нарушать конструирование или экспрессию генов; настраивания области контроля транскрипции и трансляции; вставки или удаления последовательности переноса белков; удаления/добавления сайтов

посттрансляционной модификации в кодируемых белках (например, сайты гликозилирования); добавления, удаления или перетасовки белковых доменов; вставки или удаления сайтов рестрикции; модификации сайтов связывания рибосом и сайтов деградации мРНК; регуляции скорости трансляции, чтобы позволить различным доменам белка правильно сворачиваться; или уменьшать или устранять проблемные вторичные структуры в полинуклеотиде. В данной области техники известны инструменты, алгоритмы и сервисы оптимизации; неограничивающие примеры включают сервисы от GeneArt (Life Technologies), DNA2.0 (Menlo Park CA) и/или проприетарные методы. В некоторых вариантах осуществления последовательность открытой рамки считывания (ОРС) оптимизируется с использованием алгоритмов оптимизации.

7. Характеристика нуклеиновых кислот с оптимизированной последовательностью

[0157] В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК), содержащий описанную в данном документе нуклеиновую кислоту с оптимизированной последовательностью, кодирующую полипептид CFTR, можно тестировать, чтобы определить, было ли улучшено по меньшей мере одно свойство последовательности нуклеиновой кислоты (например, стабильности при воздействии нуклеаз) или свойство экспрессии по сравнению с нуклеиновой кислотой без оптимизации последовательности.

[0158] Используемый в данном документе термин «свойство экспрессии» относится к свойству последовательности нуклеиновой кислоты либо *in vivo* (например, эффективности трансляции синтетической мРНК после введения нуждающемуся в этом субъекту), либо *in vitro* (например, эффективности трансляции синтетической мРНК, протестированной в модельной системе *in vitro*). Свойства экспрессии включают, помимо прочего, количество белка, продуцируемого мРНК, кодирующей полипептид CFTR, после введения, и количество продуцируемого растворимого или иным образом функционального белка. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты с оптимизированной последовательностью, описанные в данном документе, можно оценивать в соответствии с жизнеспособностью клеток, экспрессирующих белок, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты с оптимизированной последовательностью (например, РНК, например, мРНК), кодирующей полипептид CFTR, описанный в данном документе.

[0159] В данном варианте осуществления множество описанных в данном документе нуклеиновых кислот с оптимизированной последовательностью (например, РНК, например, мРНК), содержащих замены кодонов по отношению к неоптимизированной эталонной последовательности нуклеиновой кислоты, можно функционально охарактеризовать для измерения интересующего свойства, например, свойства экспрессии в модельной системе *in vitro* или *in vivo* в ткани или клетке-мишени.

a. Оптимизация внутренних свойств последовательности нуклеиновой кислоты

[0160] В некоторых вариантах осуществления изобретения желаемое свойство полинуклеотида является внутренним свойством последовательности нуклеиновой кислоты. Например, последовательность нуклеотидов (например, РНК, например, мРНК) может быть оптимизирована для стабильности *in vivo* или *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеотидов может быть оптимизирована для экспрессии в данной ткани или клетке-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты оптимизирована для увеличения ее периода полужизни в плазме за счет предотвращения ее деградации эндо- и экзонуклеазами.

[0161] В других вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты является оптимизированной по последовательности для повышения ее устойчивости к гидролизу в растворе, например, для увеличения времени, в течение которого нуклеиновая кислота с оптимизированной последовательностью или фармацевтическая композиция, содержащая нуклеиновую кислоту с оптимизированной последовательностью, может храниться в водных условиях с минимальной деградацией.

[0162] В других вариантах осуществления нуклеиновая кислота с оптимизированной последовательностью может быть оптимизирована для повышения ее устойчивости к гидролизу в условиях сухого хранения, например, для увеличения времени, в течение которого нуклеиновая кислота с оптимизированной последовательностью может храниться после лиофилизации с минимальной деградацией.

b. Последовательность нуклеиновых кислот, оптимизированная для

экспрессии белка

[0163] В некоторых вариантах осуществления изобретения желаемым свойством полинуклеотида является уровень экспрессии полипептида CFTR, кодируемого описанной в данном документе последовательностью с оптимизированной последовательностью. Уровни экспрессии белка можно измерить с использованием одной или нескольких систем экспрессии. В некоторых вариантах осуществления экспрессию можно измерить в системах культивирования клеток, например, в клетках CHO или клетках HEK293. В некоторых вариантах осуществления экспрессия может быть измерена с использованием систем экспрессии *in vitro*, приготовленных из экстрактов живых клеток, например, лизатов ретикулоцитов кролика, или систем экспрессии *in vitro*, приготовленных путем сборки очищенных отдельных компонентов. В других вариантах осуществления экспрессию белка измеряют в системе *in vivo*, например, на мышах, кроликах, обезьянах и т. д.

[0164] В некоторых вариантах осуществления может быть желательной экспрессия белка в форме раствора. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления эталонная последовательность может быть оптимизирована по последовательности для получения последовательности нуклеиновой кислоты с оптимизированной последовательностью, имеющей оптимизированные уровни экспрессируемых белков в растворимой форме. Уровни экспрессии белка и другие свойства, такие как растворимость, уровни агрегации и присутствие продуктов усечения (т. е. фрагментов вследствие протеолиза, гидролиза или дефектной трансляции), можно измерить в соответствии со способами, известными в данной области техники, например, с использованием электрофореза (например, нативного или SDS-PAGE) или хроматографических методов (например, ВЭЖХ, эксклюзионной хроматографии и т. д.).

c. Оптимизация ткани-мишени или жизнеспособности клеток-мишеней

[0165] В некоторых вариантах осуществления экспрессия гетерологичных терапевтических белков, кодируемых последовательностью нуклеиновой кислоты, может оказывать вредное воздействие на ткань- или клетку-мишень, снижая выход белка или снижая качество экспрессируемого продукта (например, из-за присутствия фрагментов белка или осаждение экспрессированного белка в тельцах включения), или вызывая токсичность.

[0166] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения оптимизация последовательности нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе, например, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид CFTR, может быть использована для повышения жизнеспособности клеток-мишеней, экспрессирующих белок, кодируемый нуклеиновой кислотой с оптимизированной последовательностью.

[0167] Экспрессия гетерологичного белка также может быть вредной для клеток, трансфицированных последовательностью нуклеиновой кислоты для аутологичной или гетерологичной трансплантации. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения оптимизацию последовательности нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе, можно использовать для повышения жизнеспособности клеток-мишеней, экспрессирующих белок, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты с оптимизированной последовательностью. Изменения в жизнеспособности клеток или тканей, токсичность и другие физиологические реакции можно измерить в соответствии со способами, известными в данной области техники.

d. Снижение иммунного и/или воспалительного ответа

[0168] В некоторых случаях введение нуклеиновой кислоты с оптимизированной последовательностью, кодирующей полипептид CFTR или его функционального фрагмент, может вызвать иммунный ответ, который может быть вызван (i) терапевтическим агентом (например, мРНК, кодирующей полипептид CFTR), или (ii) продуктом экспрессии такого терапевтического агента (например, полипептидом CFTR, кодируемым мРНК) или (iv) их комбинацией. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения описанная в данном документе оптимизация последовательности нуклеиновой кислоты (например, мРНК) может быть использована для снижения иммунного или воспалительного ответа, запускаемого введением нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид CFTR, или экспрессией продукт CFTR, кодируемый такой нуклеиновой кислотой.

[0169] В некоторых случаях воспалительную реакцию можно измерить путем обнаружения повышенных уровней одного или нескольких воспалительных цитокинов с использованием способов, известных в данной области техники, например, ИФА. Термин «воспалительный цитокин» относится к цитокинам, уровень которых повышается при воспалительной реакции. Примеры воспалительных цитокинов включают интерлейкин-6 (IL-6), CXCL1 (лиганд 1

хемокина (мотив C-X-C); также известный как GROα, интерферон-γ (IFNγ), фактор некроза опухоли α (TNFα), интерферон γ-индуцированный белок 10 (IP-10) или гранулоцитарно-колониестимулирующий фактор (G-CSF). Термин «воспалительные цитокины» включает также другие цитокины, связанные с воспалительными реакциями, известные в данной области техники, например, интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-8 (IL-8), интерлейкин-12 (IL-12), интерлейкин-13 (IL-13), интерферон α (IFN-α) и др.

8. Модифицированные нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды CFTR

[0170] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК) по изобретению содержит химически модифицированное азотистое основание, например, химически модифицированный урацил, например, псевдоурацил, N1-метилпсевдоурацил, 5-метоксиурацил или тому подобное. В некоторых вариантах осуществления мРНК представляет собой модифицированную урацилом последовательность, содержащую ОРС, кодирующую полипептид CFTR, при этом мРНК содержит химически модифицированное азотистое основание, например, химически модифицированный урацил, например, псевдоурацил, N1-метилпсевдоурацил или 5-метоксиурацил.

[0171] В некоторых аспектах изобретения, когда модифицированное урациловое основание соединяется с сахаром рибозой, как это происходит в полинуклеотидах, полученный модифицированный нуклеозид или нуклеотид называют модифицированным уридином. В некоторых вариантах осуществления урацил в полинуклеотиде представляет собой по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% модифицированный урацил. В одном варианте осуществления урацил в полинуклеотиде представляет собой по меньшей мере на 95% модифицированный урацил. В другом варианте осуществления урацил в полинуклеотиде представляет собой на 100% модифицированный урацил.

[0172] В вариантах осуществления, где урацил в полинуклеотиде представляет собой по меньшей мере на 95% модифицированный урацила, общее содержание

урацила может быть отрегулировано таким образом, чтобы мРНК обеспечивала подходящие уровни экспрессии белка, практически не вызывая иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления содержание урацила в ОРС составляет от около 100% до около 150%, от около 100% до около 110%, от около 105% до около 115%, от около 110% до около 120%, от около 115% % и около 125%, от около 120% до около 130%, от около 125% до около 135%, от около 130% до около 140%, от около 135% до около 145%, от около 140% до около 150% теоретического минимального содержания урацила в соответствующей ОРС дикого типа (%U_{TM}). В других вариантах осуществления содержание урацила в ОРС составляет от около 121% до около 136% или от 123% до 134% %U_{TM}. В некоторых вариантах осуществления содержание урацила в ОРС, кодирующей полипептид CFTR, составляет около 115 %, около 120 %, около 125 %, около 130 %, около 135 %, около 140 %, около 145 % или около 150 % % U_{TM}. В этом контексте термин «урацил» может относиться к модифицированному урацилу и/или встречающемуся в природе урацилу.

[0173] В некоторых вариантах осуществления содержание урацила в ОРС мРНК, кодирующей полипептид CFTR по изобретению, составляет менее около 30%, около 25%, около 20%, около 15% или около 10% от общего содержания азотистых оснований в ОРС. В некоторых вариантах осуществления содержание урацила в ОРС составляет от около 10% до около 20% от общего содержания азотистых оснований в ОРС. В других вариантах осуществления содержание урацила в ОРС составляет от около 10% до около 25% от общего содержания азотистых оснований в ОРС. В одном варианте содержание урацила в ОРС мРНК, кодирующей полипептид CFTR, составляет менее около 20% от общего содержания азотистых оснований в открытой рамке считывания. В этом контексте термин «урацил» может относиться к модифицированному урацилу и/или встречающемуся в природе урацилу.

[0174] В дополнительных вариантах осуществления ОРС мРНК, кодирующей полипептид CFTR, имеющий модифицированный урацил и скорректированное содержание урацила, имеет повышенное содержание цитозина (C), гуанина (G) или гуанина/цитозина (G/C) (абсолютное или относительное). В некоторых вариантах осуществления общее увеличение содержания C, G или G/C (абсолютное или относительное) в ОРС составляет по меньшей мере около 2%, по меньшей мере около 3%, по меньшей мере около 4%, по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 6%, по меньшей мере около 7%, по меньшей мере около 10%, по меньшей

мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 100% относительно содержания G/C (абсолютного или относительного) в ОРС дикого типа. В некоторых вариантах осуществления содержание G, C или G/C в ОРС составляет менее около 100%, менее около 90%, менее около 85% или менее около 80% теоретического максимального содержания G, C или G/C в соответствующей нуклеотидной последовательности дикого типа, кодирующей полипептид CFTR (%G_{TMX}; %C_{TMX} или %G/C_{TMX}). В некоторых вариантах осуществления увеличение содержания G и/или C (абсолютное или относительное), описанное в данном документе, может быть осуществлено путем замены синонимичных кодонов с низким содержанием G, C или G/C на синонимичные кодоны с более высоким содержанием G, C или G/C. В других вариантах осуществления увеличение содержания G и/или C (абсолютное или относительное) проводят путем замены кодона, оканчивающегося на U, синонимичным кодоном, оканчивающимся на G или C.

[0175] В дополнительных вариантах осуществления ОРС мРНК, кодирующей полипептид CFTR по изобретению, содержит модифицированный урацил и имеет скорректированное содержание урацила, содержащее меньше пар урацила (UU) и/или триплетов урацила (UUU), и/или квадруплетов урацила (UUUU), чем соответствующая нуклеотидная последовательность дикого типа, кодирующая полипептид CFTR. В некоторых вариантах ОРС мРНК, кодирующей полипептид CFTR по изобретению, не содержит пар урацила и/или триплетов урацила, и/или квадруплетов урацила. В некоторых вариантах осуществления количество пар урацила и/или триплетов урацила, и/или квадруплетов урацила снижается ниже определенного порога, например, не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 появлений в ОРС мРНК, кодирующей полипептид CFTR. В конкретном варианте осуществления ОРС мРНК, кодирующей полипептид CFTR по изобретению, содержит менее 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 нефенилаланиновых пар и/или триплетов урацила. В другом варианте осуществления ОРС мРНК, кодирующей полипептид CFTR, не содержит нефенилаланиновых пар и/или триплетов урацила.

[0176] В дополнительных вариантах осуществления ОРС мРНК, кодирующей полипептид CFTR по изобретению, содержит модифицированный урацил и имеет скорректированное содержание урацила, содержащее менее богатые урацилом

кластеры, чем соответствующая нуклеотидная последовательность дикого типа, кодирующая полипептид CFTR. В некоторых вариантах осуществления ОРС мРНК, кодирующей полипептид CFTR по изобретению, содержит богатые урацилом кластеры, которые короче по длине, чем соответствующие богатые урацилом кластеры в соответствующей нуклеотидной последовательности дикого типа, кодирующей полипептид CFTR.

[0177] В дополнительных вариантах осуществления используют альтернативные более низкие частоты кодонов. По меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50 %, по меньшей мере около 55 %, по меньшей мере около 60 %, по меньшей мере около 65 %, по меньшей мере около 70 %, по меньшей мере около 75 %, по меньшей мере около 80 %, по меньшей мере около 85 %, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 99% или 100% кодонов в ОРС, кодирующей полипептид CFTR, модифицированной содержащей урацил мРНК заменены альтернативными кодонами, причем частота каждого альтернативного кодона ниже, чем частота кодона замененного кодона в наборе синонимичных кодонов. ОРС также имеет скорректированное содержание урацила, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один кодон в ОРС мРНК, кодирующей полипептид CFTR, заменен альтернативным кодоном, частота кодона которого ниже, чем частота кодона замененного кодона в наборе синонимичных кодонов.

[0178] В некоторых вариантах осуществления ОРС, кодирующая полипептид CFTR, с отрегулированным содержанием модифицированной содержащей урацил мРНК демонстрирует уровни экспрессии CFTR при введении в клетку млекопитающего, которые выше, чем уровни экспрессии CFTR из соответствующей мРНК дикого типа. В некоторых вариантах осуществления клетка млекопитающего представляет собой клетку мыши, клетку крысы или клетку кролика. В других вариантах осуществления клетка млекопитающего представляет собой клетку обезьяны или клетку человека. В некоторых вариантах осуществления клетка человека представляет собой клетку HeLa, клетку фибробластов BJ или мононуклеарную клетку периферической крови (PBMC). В некоторых вариантах осуществления CFTR экспрессируется на уровне, превышающем уровни экспрессии CFTR из соответствующей мРНК дикого типа, при введении мРНК в клетку млекопитающего

in vivo. В некоторых вариантах осуществления мРНК вводят мышам, кроликам, крысам, обезьянам или людям. В одном варианте осуществления мыши являются нуль-мышами. В некоторых вариантах осуществления мРНК вводят мышам в количестве около 0,01 мг/кг, около 0,05 мг/кг, около 0,1 мг/кг или 0,2 мг/кг, или около 0,5 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления мРНК вводят внутривенно или внутримышечно. В других вариантах осуществления полипептид CFTR экспрессируется, когда мРНК вводят в клетку млекопитающего. *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления экспрессия увеличивается в по меньшей мере около 2 раза, в по меньшей мере около 5 раз, в по меньшей мере около 10 раз, в по меньшей мере около 50 раз, в по меньшей мере около 500 раз, в по меньшей мере около 1500 раз или в по меньшей мере около 3000 раз. В других вариантах осуществления экспрессия увеличивается на по меньшей мере около 10%, на около 20%, на около 30%, на около 40%, на около 50%, 60%, на около 70%, на около 80%, на около 90% или на около 100%.

[0179] В некоторых вариантах осуществления ОРС, кодирующая полипептид CFTR, с отрегулированным содержанием модифицированной содержащей урацил мРНК проявляет повышенную стабильность. В некоторых вариантах осуществления мРНК проявляет повышенную стабильность в клетке по сравнению со стабильностью соответствующей мРНК дикого типа в тех же условиях. В некоторых вариантах осуществления мРНК проявляет повышенную стабильность, включая устойчивость к нуклеазам, термическую стабильность и/или повышенную стабилизацию вторичной структуры. В некоторых вариантах осуществления повышенную стабильность, проявляемую мРНК, измеряют путем определения периода полужизни мРНК (например, в образце плазмы, сыворотки, клетки или ткани) и/или определения площади под кривой (AUC) экспрессии белка мРНК с течением времени (например, in vitro или in vivo). мРНК идентифицируют как имеющую повышенную стабильность, если период полужизни и/или AUC больше, чем период полужизни и/или AUC соответствующей мРНК дикого типа в тех же условиях.

[0180] В некоторых вариантах осуществления мРНК по данному изобретению индуцирует заметно более низкий иммунный ответ (например, врожденный или приобретенный) по сравнению с иммунным ответом, индуцированным соответствующей мРНК дикого типа в тех же условиях. В других вариантах осуществления мРНК по данному изобретению индуцирует заметно более низкий иммунный ответ (например, врожденный или приобретенный) по сравнению с

иммунным ответом, индуцированным мРНК, кодирующей полипептид CFTR, но не содержащей модифицированный урацил, в тех же условиях, или по сравнению с иммунным ответом, индуцированным мРНК, которая кодирует полипептид CFTR и содержит модифицированный урацил, но не имеет скорректированного содержания урацила в тех же условиях. Врожденный иммунный ответ может проявляться повышенной экспрессией провоспалительных цитокинов, активацией внутриклеточных PRR (RIG-I, MDA5 и т. д.), гибелью клеток и/или прекращением или снижением трансляции белка. В некоторых вариантах осуществления снижение врожденного иммунного ответа можно измерить по уровню экспрессии или активности интерферонов типа 1 (например, IFN-α, IFN-β, IFN-κ, IFN-δ, IFN-ε, IFN-τ, IFN-ω и IFN-ζ) или экспрессии регулируемых интерфероном генов, таких как toll-подобные рецепторы (например, TLR7 и TLR8), и/или снижению гибели клеток после одного или нескольких введений мРНК по изобретению в клетку.

[0181] В некоторых вариантах осуществления экспрессия интерферонов типа 1 клеткой млекопитающего в ответ на мРНК по данному изобретению снижается по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99,9% или более чем на 99,9% по отношению к соответствующей мРНК дикого типа, к мРНК, кодирующей полипептид CFTR, но не содержащей модифицированный урацил, или к мРНК, кодирующей полипептид CFTR, который содержит модифицированный урацил, но не имеет скорректированного содержания урацила. В некоторых вариантах осуществления интерферон представляет собой IFN-β. В некоторых вариантах осуществления частота гибели клеток, вызванная введением мРНК по данному изобретению в клетку млекопитающего, на 10%, 25%, 50%, 75%, 85%, 90%, 95% или более чем на 95% меньше, чем частота гибели клеток, наблюдаемая при соответствующей мРНК дикого типа, мРНК, которая кодирует полипептид CFTR, но не содержит модифицированный урацил, или мРНК, которая кодирует полипептид CFTR и содержит модифицированный урацил, но не имеет скорректированного содержание урацила. В некоторых вариантах осуществления клетка млекопитающего представляет собой клетку фибробластов BJ. В других вариантах осуществления клетка млекопитающего представляет собой спленоцит. В некоторых вариантах осуществления клетка млекопитающего представляет собой клетку мыши или крысы. В других вариантах осуществления клетка млекопитающего представляет собой клетку человека. В одном варианте осуществления мРНК по данному изобретению по существу не индуцирует врожденный иммунный ответ клетки млекопитающего, в которую введена мРНК.

9. Способы модификации полинуклеотидов

[0182] Данное изобретение включает модифицированные полинуклеотиды, содержащие полинуклеотид, описанный в данном документе (например, полинуклеотид, например, мРНК, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR). Модифицированные полинуклеотиды могут быть химически модифицированы и/или структурно модифицированы. Когда полинуклеотиды по данному изобретению химически и/или структурно модифицированы, полинуклеотиды могут называться «модифицированными полинуклеотидами».

[0183] Данное изобретение относится к модифицированным нуклеозидам и нуклеотидам полинуклеотида (*например*, полинуклеотидам РНК, таким как полинуклеотиды мРНК), кодирующим полипептид CFTR. «Нуклеозид» относится к соединению, содержащему молекулу сахара (*например*, пентозу или рибозу) или ее производное в комбинации с органическим основанием (*например*, пурином или пиримидином) или его производным (также упоминается в данном документе как «азотистое основание»). «Нуклеотид» относится к нуклеозиду, содержащему фосфатную группу. Модифицированные нуклеотиды можно синтезировать любым подходящим способом, таким как, например, химическим, ферментативным или рекомбинантным способом, для включения одного или более модифицированных или неприродных нуклеозидов. Полинуклеотиды могут содержать область или области связанных нуклеозидов. Такие области могут иметь вариабельные связи остова. Связи могут представлять собой стандартные фосфодиэфирные связи, и в этом случае полинуклеотиды могут включать области нуклеотидов.

[0184] Описанные в данном документе модифицированные полинуклеотиды могут содержать различные отдельные модификации. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полинуклеотиды содержат одну, две или более (необязательно различных) нуклеозидных или нуклеотидных модификаций. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полинуклеотид, введенный в клетку, может проявлять одно или более из желаемых свойств, например, улучшенная экспрессия белка, сниженная иммуногенность или сниженная деградация в клетке по сравнению с немодифицированным полинуклеотидом.

[0185] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по данному

изобретению (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR) структурно модифицирован. В контексте данного документа «структурная» модификация представляет собой модификацию, при которой два или более связанных нуклеозида вставляются, удаляются, дублируются, инвертируются или рандомизируются в полинуклеотид без значительной химической модификации самих нуклеотидов. Поскольку химические связи обязательно будут разрушены и преобразованы для осуществления структурной модификации, структурные модификации имеют химическую природу и, следовательно, являются химическими модификациями. Однако структурные модификации приведут к образованию другой последовательности нуклеотидов. Например, полинуклеотид «ATCG» может быть химически модифицирован до «AT-5meC-G». Тот же полинуклеотид может быть структурно модифицирован с «ATCG» на «ATCCCG». В данном случае был вставлен динуклеотид «CC», что привело к структурной модификации полинуклеотида.

[0186] Терапевтические композиции по данному изобретению содержат, в некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту (например, РНК), имеющую открытую рамку считывания, кодирующую по CFTR (например, SEQ ID NO: 142), при этом нуклеиновая кислота содержит нуклеотиды и/или нуклеозиды, которые могут быть стандартными (немодифицированными) или модифицированными, как известно в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды и нуклеозиды по настоящему раскрытию содержат модифицированные нуклеотиды или нуклеозиды. Такие модифицированные нуклеотиды и нуклеозиды могут быть встречающимися в природе модифицированными нуклеотидами и нуклеозидами или не встречающимися в природе модифицированными нуклеотидами и нуклеозидами. Такие модификации могут включать модификации в сахаре, остове или части азотистого основания нуклеотида и/или нуклеозида, как известно в данной области техники.

[0187] В некоторых вариантах осуществления встречающийся в природе модифицированный нуклеотид или нуклеотид по настоящему описанию является общеизвестным или признанным в данной области техники. Неограничивающие примеры таких встречающихся в природе модифицированных нуклеотидов и нуклеозидов можно найти, среди прочего, в широко известной базе данных MODOMICS.

[0188] В некоторых вариантах осуществления не встречающийся в природе модифицированный нуклеотид или нуклеозид по настоящему изобретению является общеизвестным или признанным в данной области техники. Неограничивающие примеры таких не встречающихся в природе модифицированных нуклеотидов и нуклеозидов можно найти, среди прочего, в опубликованных заявках США №№ PCT/US2012/058519; PCT/US2013/075177; PCT/US2014/058897; PCT/US2014/058891; PCT/US2014/070413; PCT/US2015/36773; PCT/US2015/36759; PCT/US2015/36771 или PCT/IB2017/051367, все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

[0189] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна РНК (например, мРНК) по данному изобретению не является химически модифицированной и содержит стандартные рибонуклеотиды, состоящие из аденозина, гуанозина, цитозина и уридина. В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды и нуклеозиды по данному изобретению содержат стандартные нуклеозидные остатки, такие как те, которые присутствуют в транскрибируемой РНК (например, A, G, C или U). В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды и нуклеозиды по данному изобретению содержат стандартные дезоксирибонуклеозиды, такие как те, которые присутствуют в ДНК (например, dA, dG, dC или dT).

[0190] Следовательно, нуклеиновые кислоты по настоящему раскрытию (*например*, нуклеиновые кислоты ДНК и нуклеиновые кислоты РНК, такие как нуклеиновые кислоты мРНК) могут содержать стандартные нуклеотиды и нуклеозиды, встречающиеся в природе нуклеотиды и нуклеозиды, не встречающиеся в природе нуклеотиды и нуклеозиды или их любую комбинацию.

[0191] Нуклеиновые кислоты по настоящему раскрытию (*например*, нуклеиновые кислоты ДНК и нуклеиновые кислоты РНК, такие как нуклеиновые кислоты мРНК) в некоторых вариантах осуществления содержат различные (более одного) типы стандартных и/или модифицированных нуклеотидов и нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления конкретная область нуклеиновой кислоты содержит один, два или более (необязательно различных) типов стандартных и/или модифицированных нуклеотидов и нуклеозидов.

[0192] В некоторых вариантах осуществления модифицированная нуклеиновая кислота РНК (*например*, модифицированная нуклеиновая кислота мРНК), введенная в клетку или организм, демонстрирует пониженную деградацию в клетке или организме, соответственно, относительно немодифицированной нуклеиновой

кислоты, содержащей стандартные нуклеотиды и нуклеозиды.

[0193] В некоторых вариантах осуществления модифицированная нуклеиновая кислота РНК (*например*, модифицированная нуклеиновая кислота мРНК), введенная в клетку или организм, может проявлять пониженную иммуногенность в клетке или организме, соответственно (*например*, пониженный врожденный ответ) относительно немодифицированной нуклеиновой кислоты, содержащей стандартные нуклеотиды и нуклеозиды.

[0194] Нуклеиновые кислоты (*например*, нуклеиновые кислоты РНК, такие как нуклеиновые кислоты мРНК) в некоторых вариантах осуществления содержат неприродные модифицированные нуклеотиды, которые вводятся в ходе синтеза или постсинтеза нуклеиновых кислот для достижения желаемых функций или свойств. Модификации могут присутствовать в межнуклеотидных связях, пуриновых или пиримидиновых основаниях или сахарах. Модификация может быть введена с помощью химического синтеза или с помощью фермента полимеразы на конце цепи или в любом другом месте цепи. Любая из областей нуклеиновой кислоты может быть химически модифицирована.

[0195] В данном изобретении предложены модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды нуклеиновой кислоты (*например*, нуклеиновые кислоты РНК, такие как нуклеиновые кислоты мРНК). «Нуклеозид» относится к соединению, содержащему молекулу сахара (*например*, пентозу или рибозу) или ее производное в комбинации с органическим основанием (*например*, пурином или пиримидином) или его производным (также упоминается в данном документе как «азотистое основание»). «Нуклеотид» относится к нуклеозиду, содержащему фосфатную группу. Модифицированные нуклеотиды можно синтезировать любым подходящим способом, таким как, например, химическим, ферментативным или рекомбинантным способом, для включения одного или более модифицированных или неприродных нуклеозидов. Нуклеиновые кислоты могут содержать область или области связанных нуклеозидов. Такие области могут иметь вариабельные связи остова. Связи могут представлять собой стандартные фосфодиэфирные связи, и в этом случае нуклеиновые кислоты могут включать области нуклеотидов.

[0196] Спаривание модифицированных пар нуклеотидных оснований включает 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, в которых расположение доноров водородных

связей и акцепторов водородных связей позволяет образовывать водородные связи между нестандартным основанием и стандартным основанием или между двумя дополнительными структурами нестандартных оснований, такими как, например, в тех нуклеиновых кислотах, которые имеют по меньшей мере одну химическую модификацию. Одним из примеров такого спаривания нестандартных оснований является спаривание оснований между модифицированным нуклеотидом инозином и аденином, цитозином или урацилом. Любая комбинация основания/сахара или линкера может быть включена в нуклеиновые кислоты по настоящему раскрытию.

[0197] В некоторых вариантах осуществления модифицированные азотистые основания в нуклеиновых кислотах (*например*, нуклеиновых кислотах РНК, таких как нуклеиновые кислоты мРНК) включают N1-метилпсевдоуридин (m1ψ), 1-этилпсевдоуридин (e1ψ), 5-метоксиуридин (mo5U), 5-метилцитидин (m5C) и/или псевдоуридин (ψ). В некоторых вариантах осуществления модифицированные азотистые основания в нуклеиновых кислотах (*например*, нуклеиновых кислотах РНК, таких как нуклеиновые кислоты мРНК) включают 5-метоксиметилуридин, 5-метилтиоуридин, 1-метоксиметилпсевдоуридин, 5-метилцитидин и/или 5-метоксицитидин. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид включает комбинацию по меньшей мере двух (*например*, 2, 3, 4 или более) любых из вышеупомянутых модифицированных азотистых оснований, включая, но не ограничиваясь ими, химические модификации.

[0198] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота РНК по изобретению содержит замены N1-метил-псевдоуридина (m1ψ) в одном или более или всех положениях уридина нуклеиновой кислоты.

[0199] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота РНК по раскрытию содержит замены N1-метил-псевдоуридином (m1ψ) в одном или более или всех уридиновых положениях нуклеиновой кислоты и замены 5-метилцитидина в одном или более или всех цитидиновых положениях нуклеиновой кислоты.

[0200] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота РНК по раскрытию содержит замены псевдоуридином (ψ) в одном или более или всех уридиновых положениях нуклеиновой кислоты.

[0201] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота РНК по раскрытию содержит замены псевдоуридином (ψ) в одном или более или всех уридиновых положениях нуклеиновой кислоты и замены 5-метилцитидина в одном или более или всех цитидиновых положениях нуклеиновой кислоты.

[0202] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота РНК по

раскрытию содержит уридин в одном или более или всех уридиновых положениях нуклеиновой кислоты.

[0203] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты (*например*, нуклеиновые кислоты РНК, такие как нуклеиновые кислоты мРНК) являются единообразно модифицированными (*например*, полностью модифицированными, модифицированными по всей последовательности) для конкретной модификации. Например, нуклеиновая кислота может быть единообразно модифицирована N1-метилпсевдоуридином, что означает, что все остатки уридина в последовательности мРНК заменены N1-метилпсевдоуридином. Подобным образом, нуклеиновая кислота может быть единообразно модифицирована для любого типа нуклеозидного остатка, присутствующего в последовательности, путем замены модифицированным остатком, таким как указанные выше.

[0204] Нуклеиновые кислоты по настоящему раскрытию могут быть частично или полностью модифицированы по всей длине молекулы.Например, один или более, или все, или указанный тип нуклеотида (*например*, пурин или пиримидин, или любой один или более, или все из A, G, U, C) могут быть единообразно модифицированы в нуклеиновой кислоте по настоящему раскрытию, или в предварительно определенной области ее последовательности (*например*, в мРНК, включая или исключая полиА-хвост).В некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды X в нуклеиновой кислоте согласно настоящему раскрытию (или в области ее последовательности) представляют собой модифицированные нуклеотиды, где X может быть любым из нуклеотидов A, G, U, C или любой из комбинаций A+G, A+U, A+C, G+U, G+C, U+C, A+G+U, A+G+C, G+U+C или A+G+C.

[0205] Нуклеиновая кислота может содержать от около 1% до около 100% модифицированных нуклеотидов (либо по отношению к общему содержанию нуклеотидов, либо по отношению к одному или более типам нуклеотидов, *то есть* любому одному или более из A, G, U или C) или любой промежуточный процент (*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%).Следует понимать, что любой оставшийся процент объясняется присутствием немодифицированных A, G, U или C.

[0206] Нуклеиновые кислоты могут содержать минимум 1% и максимум 100% модифицированных нуклеотидов или любой промежуточный процент, такой как по меньшей мере 5% модифицированных нуклеотидов, по меньшей мере 10% модифицированных нуклеотидов, по меньшей мере 25% модифицированных нуклеотидов, по меньшей мере 50%. модифицированные нуклеотиды, по меньшей мере 80% модифицированных нуклеотидов или по меньшей мере 90% модифицированных нуклеотидов.Например, нуклеиновые кислоты могут содержать модифицированный пиримидин, такой как модифицированный урацил или цитозин.В некоторых вариантах осуществления 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 заменяется модифицированным урацилом (*например*, 5-замещенным урацилом).Модифицированный урацил может быть заменен соединением, имеющим одну уникальную структуру, или может быть заменен множеством соединений, имеющих разные структуры (*например*, 2, 3, 4 или более уникальных структур).В некоторых вариантах осуществления 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 заменяется модифицированным цитозином (*например*, 5-замещенным цитозином).Модифицированный цитозин может быть заменен соединением, имеющим одну уникальную структуру, или может быть заменен множеством соединений, имеющих разные структуры (*например*, 2, 3, 4 или более уникальных структур).

10. Нетранслируемые области (UTR)

[0207] Трансляцию полинуклеотида, содержащего открытую рамку считывания, кодирующую полипептид, можно контролировать и регулировать с помощью различных механизмов, которые обеспечиваются различными цис-действующими структурами нуклеиновых кислот. Например, встречающиеся в природе цис-действующие элементы РНК, которые образуют шпильки или другие внутримолекулярные вторичные структуры мРНК более высокого порядка (например, псевдоузел), могут придавать трансляционную регуляторную активность

полинуклеотиду, при этом элемент РНК влияет или модулирует инициацию трансляции полинуклеотида, особенно когда элемент РНК расположен в 5'-UTR близко к структуре 5'-кэпа (Pelletier and Sonenberg (1985) Cell 40(3):515-526; Kozak (1986) Proc Natl Acad Sci 83:2850 -2854).

[0208] Нетранслируемые области (UTR) представляют собой участки нуклеиновой кислоты полинуклеотида до старт-кодона (5'-UTR) и после стоп-кодона (3'-UTR), которые не транслируются. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, рибонуклеиновая кислота (РНК), например, матричная РНК (мРНК)) по изобретению, содержащая открытую рамку считывания (ОРС), кодирующую полипептид CFTR, дополнительно содержит UTR (например, 5′-UTR или ее функциональный фрагмент, 3′-UTR или ее функциональный фрагмент, или их комбинацию).

[0209] Цис-действующие элементы РНК также могут влиять на элонгацию трансляции, участвуя в многочисленных событиях сдвига рамки считывания (Namy et al., (2004) Mol Cell 13(2):157-168). Последовательности внутреннего участка посадки рибосомы (IRES) представляют собой другой тип цис-действующих элементов РНК, которые обычно располагаются в 5'-UTR, но также сообщалось, что они обнаруживаются в кодирующей области встречающихся в природе мРНК (Holcik et al. (2000) Trends Genet 16(10):469-473). В клеточных мРНК IRES часто сосуществуют со структурой 5'-кэпа и придают мРНК функциональную способность к трансляции в условиях, в которых скомпрометирована зависимая от кэпа трансляция (Gebauer et al., (2012) Cold Spring Harb Perspect Biol 4(7): a012245). Другой тип встречающегося в природе цис-действующего элемента РНК включает расположенные выше открытые рамки считывания (uORF). Встречающиеся в природе uORF встречаются единично или многократно в пределах 5'-UTR многочисленных мРНК и влияют на трансляцию расположенной ниже основной ОРС, как правило, отрицательно (за заметным исключением мРНК GCN4 у дрожжей и мРНК ATF4 у млекопитающих, где uORF служат для стимулирования трансляция расположенной ниже основной ОРС в условиях повышенного фосфорилирования eIF2 (Hinnebusch (2005) Annu Rev Microbiol 59:407-450)). Дополнительные иллюстративные трансляционно-регуляторные активности, обеспечиваемые компонентами, структурами, элементами, мотивами и/или специфическими последовательностями, содержащими полинуклеотиды (например, мРНК), включают, помимо прочего, стабилизацию или дестабилизацию мРНК (Baker & Parker (2004) Curr Opin Cell Biol. 16(3):293-299), активацию трансляции (Villalba et

al., (2011) Curr Opin Genet Dev 21(4):452-457) и репрессию трансляции (Blumer et al., (2002) Mech Dev 110(1-2):97-112). Исследования показали, что встречающиеся в природе цис-действующие элементы РНК могут выполнять соответствующие функции при использовании для модификации путем включения в гетерологичные полинуклеотиды (Goldberg-Cohen et al., (2002) J Biol Chem 277(16):13635-13640).

Модифицированные полинуклеотиды, содержащие функциональные элементы РНК

[0210] Данное раскрытие обеспечивает синтетические полинуклеотиды, содержащие модификацию (например, элемент РНК), причем модификация обеспечивает желаемую трансляционную регуляторную активность. В некоторых вариантах осуществления раскрытие обеспечивает полинуклеотид, содержащий 5′-нетранслируемую область (UTR), инициирующий кодон, полноразмерную открытую рамку считывания, кодирующую полипептид, 3′-UTR и по меньшей мере одну модификацию, причем по меньшей мере одна модификация обеспечивает желательную трансляционную регуляторную активность, например, модификацию, которая способствует и/или повышает точность трансляции мРНК. В некоторых вариантах осуществления желательная трансляционная регуляторная активность представляет собой цис-действующую регуляторную активность. В некоторых вариантах осуществления желаемая трансляционная регуляторная активность представляет собой увеличение времени пребывания 43S преинициирующего комплекса (PIC) или рибосомы при инициирующем кодоне или вблизи него. В некоторых вариантах осуществления желательная трансляционная регуляторная активность представляет собой увеличение инициации синтеза полипептида при или из инициирующего кодона. В некоторых вариантах осуществления желательная трансляционная регуляторная активность представляет собой увеличение количества полипептида, транслированного из полноразмерной открытой рамки считывания. В некоторых вариантах осуществления желательная трансляционная регуляторная активность представляет собой увеличение точности декодирования инициирующего кодона с помощью PIC или рибосомы. В некоторых вариантах осуществления желательная трансляционная регуляторная активность представляет собой ингибирование или уменьшение ослабленного сканирования PIC или рибосомой. В некоторых вариантах осуществления желательная трансляционная регуляторная активность представляет собой снижение скорости декодирования инициирующего кодона с помощью PIC или рибосомы. В некоторых вариантах осуществления желаемая трансляционная регуляторная активность представляет собой ингибирование или снижение инициации синтеза полипептида в любом

кодоне в мРНК, кроме инициирующего кодона. В некоторых вариантах осуществления желательная трансляционная регуляторная активность представляет собой ингибирование или уменьшение количества полипептида, транслируемого с любой открытой рамки считывания в мРНК, кроме полноразмерной открытой рамки считывания. В некоторых вариантах осуществления желательная трансляционная регуляторная активность представляет собой ингибирование или снижение продукции аберрантных продуктов трансляции. В некоторых вариантах осуществления желательная трансляционная регуляторная активность представляет собой комбинацию одной или более из вышеупомянутых трансляционных регуляторных активностей.

[0211] Соответственно, данное раскрытие обеспечивает полинуклеотид, например, мРНК, содержащую элемент РНК, который содержит последовательность и/или вторичную структуру(ы) РНК, которая обеспечивает желаемую трансляционную регуляторную активность, как описано в данном документе. В некоторых аспектах мРНК содержит элемент РНК, который содержит последовательность и/или вторичную структуру(ы) РНК, которая способствует и/или усиливает точность трансляции мРНК. В некоторых аспектах мРНК содержит элемент РНК, который содержит последовательность и/или вторичную структуру(ы) РНК, которая обеспечивает желаемую трансляционную регуляторную активность, такую как ингибирование и/или уменьшение ослабленного сканирования. В некоторых аспектах раскрытие обеспечивает мРНК, которая содержит элемент РНК, который содержит последовательность и/или вторичную структуру(ы) РНК, которая ингибирует и/или уменьшает ослабленное сканирование, тем самым способствуя точности трансляции мРНК.

[0212] В некоторых вариантах осуществления элемент РНК содержит природные и/или модифицированные нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления элемент РНК содержит последовательность соединенных нуклеотидов или их производных или аналогов, которая обеспечивает требуемую трансляционную регуляторную активность, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления элемент РНК содержит последовательность соединенных нуклеотидов или их производных или аналогов, которая образует или сворачивается в стабильную вторичную структуру РНК, причем вторичная структура РНК обеспечивает желаемую трансляционную регуляторную активность, как описано в данном документе. Элементы РНК могут быть идентифицированы и/или охарактеризованы на основе первичной последовательности элемента (например,

GC-богатого элемента), посредством вторичной структуры РНК, образованной элементом (например, шпилькой), по расположению элемента в молекуле РНК (например, расположенной в 5′-UTR мРНК) по биологической функции и/или активности элемента (например, «элемента, усиливающего трансляцию») и любой их комбинации.

[0213] В некоторых аспектах раскрытие обеспечивает мРНК, имеющую одну или более структурных модификаций, которые ингибируют ослабленное сканирование и/или способствуют точности трансляции мРНК, причем по меньшей мере одна из структурных модификаций представляет собой GC-богатый элемент РНК. В некоторых аспектах раскрытие обеспечивает модифицированную мРНК, содержащую по меньшей мере одну модификацию, при этом по меньшей мере одна модификация представляет собой GC-богатый элемент РНК, содержащий последовательность соединенных нуклеотидов или их производных или аналогов, предшествующий консенсусной последовательности Козак в 5′-UTR мРНК. В одном варианте осуществления GC-богатый элемент РНК расположен через около 30, около 25, около 20, около 15, около 10, около 5, около 4, около 3, около 2 или около 1 нуклеотид(ов) против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак в 5'-UTR мРНК. В другом варианте осуществления GC-богатый элемент РНК расположен через 15-30, 15-20, 15-25, 10-15 или 5-10 нуклеотидов против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак. В другом варианте осуществления GC-богатый элемент РНК расположен непосредственно рядом с консенсусной последовательностью Козак в 5'-НТО мРНК.

[0214] В любом из предшествующих или связанных аспектов раскрытие обеспечивает GC-богатый элемент РНК, который содержит последовательность 3–30, 5–25, 10–20, 15–20, около 20, около 15, около 12, около 10, около 7, около 6 или около 3 нуклеотидов, их производных или аналогов, соединенных в любом порядке, при этом состав последовательности представляет собой 70–80 % цитозина, 60–70 % цитозина, 50 % – 60 % цитозина, 40–50 % цитозина, 30–40 % цитозиновых оснований. В любом из предшествующих или связанных аспектов раскрытие обеспечивает GC-богатый элемент РНК, который содержит последовательность 3–30, 5–25, 10–20, 15–20, около 20, около 15, около 12, около 10, около 7, около 6 или около 3 нуклеотидов, их производных или аналогов, соединенных в любом порядке, при этом состав последовательности представляет собой около 80 % цитозина, около 70 % цитозина, около 60 % цитозина, около 50 % цитозина, около 40 % цитозина или около 30 % цитозина.

[0215] В любом из предшествующих или связанных аспектов раскрытие обеспечивает GC-богатый элемент РНК, который содержит последовательность из 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 нуклеотида, или их производных или аналогов, соединенных в любом порядке, при этом состав последовательности представляет собой 70–80 % цитозина, 60–70 % цитозина, 50 % –60 % цитозина, 40–50% цитозина, или 30–40% цитозина. В любом из предшествующих или связанных аспектов раскрытие обеспечивает GC-богатый элемент РНК, который содержит последовательность из 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 нуклеотида, или их производных или аналогов, соединенных в любом порядке, при этом состав последовательности представляет собой около 80 % цитозина, около 70 % цитозина, около 60 % цитозина, около 50 % цитозина, около 40 % цитозина или около 30 % цитозина.

[0216] В некоторых вариантах осуществления раскрытие обеспечивает модифицированную мРНК, содержащую по меньшей мере одну модификацию, при этом по меньшей мере одна модификация представляет собой GC-богатый элемент РНК, содержащий последовательность соединенных нуклеотидов или их производных или аналогов, предшествующий консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК, причем GC-богатый элемент РНК расположен через около 30, около 25, около 20, около 15, около 10, около 5, около 4, около 3, около 2 или около 1 нуклеотид(ов) против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК, и при этом GC-богатый элемент РНК, содержит последовательность 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 , 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов или их производных или аналогов, соединенных в любом порядке, причем состав последовательности представляет собой > 50 % цитозина. В некоторых вариантах осуществления композиция последовательности представляет собой >55 % цитозина, >60 % цитозина, >65 % цитозина, >70 % цитозина, >75 % цитозина, >80 % цитозина, >85 % цитозина или >90 % цитозина.

[0217] В других аспектах в изобретении предложена модифицированная мРНК, содержащая по меньшей мере одну модификацию, при этом по меньшей мере одна модификация представляет собой GC-богатый элемент РНК, содержащий последовательность соединенных нуклеотидов или их производных или аналогов, предшествующий консенсусной последовательности Козак в 5'-UTR мРНК, причем GC-богатый элемент РНК расположен через около 30, около 25, около 20, около 15, около 10, около 5, около 4, около 3, около 2 или около 1 нуклеотид(ов) выше консенсусной последовательности Козак в 5'-UTR мРНК, и при этом GC-богатый

элемент РНК содержит последовательность из около 3-30, 5-25, 10-20, 15-20 или около 20, около 15, около 12, около 10, около 6 или около 3 нуклеотидов, или их производных или аналогов, при этом последовательность содержит повторяющийся GC-мотив, при этом повторяющийся GC-мотив представляет собой [CCG]n, где n = от 1 до 10 (SEQ ID NO: 131), n = от 2 до 8 (SEQ ID NO: 132), n= от 3 до 6 (SEQ ID NO: 133) или n= от 4 до 5 (SEQ ID NO: 134). В некоторых вариантах осуществления последовательность содержит повторяющийся GC-мотив [CCG]n, где n = 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 135). В некоторых вариантах осуществления последовательность содержит повторяющийся GC-мотив [CCG]n, где n = 1, 2, or 3. В некоторых вариантах осуществления последовательность содержит повторяющийся GC-мотив [CCG]n, где n = 1. В некоторых вариантах осуществления последовательность содержит повторяющийся GC-мотив [CCG]n, где n = 2. В некоторых вариантах осуществления последовательность содержит повторяющийся GC-мотив [CCG]n, где n = 3. В некоторых вариантах осуществления последовательность содержит повторяющийся GC-мотив [CCG]n, где n=4 (SEQ ID NO: 136). В некоторых вариантах осуществления последовательность содержит повторяющийся GC-мотив [CCG]n, где n = 5 (SEQ ID NO: 137).

[0218] В другом аспекте в данном изобретении предложена модифицированная мРНК, содержащая по меньшей мере одну модификацию, при этом по меньшей мере одна модификация представляет собой GC-богатый элемент РНК, содержащий последовательность связанных нуклеотидов или их производных или аналогов, предшествующую консенсусной последовательность Козак в 5'-UTR мРНК, при этом GC-богатый элемент РНК содержит любую из последовательностей, указанных в Таблице 2. В одном варианте осуществления GC-богатый элемент РНК расположен на около 30, около 25, около 20, около 15, около 10, около 5, около 4, около 3, около 2 или около 1 нуклеотид(ы) выше консенсусной последовательности Козак в 5'-UTR мРНК. В другом варианте осуществления GC-богатый элемент РНК расположен через около 15-30, 15-20, 15-25, 10-15 или 5-10 нуклеотидов против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак. В другом варианте осуществления GC-богатый элемент РНК расположен непосредственно рядом с консенсусной последовательностью Козак в 5'-НТО мРНК.

[0219] В других аспектах в изобретении предложена модифицированная мРНК, содержащая по меньшей мере одну модификацию, при этом по меньшей мере одна модификация представляет собой GC-богатый элемент РНК, содержащий последовательность V1 [CCCCGGCGCC (SEQ ID NO: 140)], как указано в Таблице

2, или ее производные или аналоги, предшествующий консенсусной последовательности Козак в 5'-UTR мРНК. В некоторых вариантах осуществления GC-богатый элемент РНК содержит последовательность V1, как указано в Таблице 2, расположенную непосредственно рядом с консенсусной последовательностью Козак и выше от нее в 5'-НТО мРНК. В некоторых вариантах осуществления GC-богатый элемент РНК содержит последовательность V1, как указано в Таблице 2, расположенную через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 оснований против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК. В других вариантах осуществления GC-богатый элемент РНК содержит последовательность V1, как указано в Таблице 2, расположенную через 1-3, 3-5, 5-7, 7-9, 9-12 или 12-15 оснований против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК.

[0220] В других аспектах раскрытие обеспечивает модифицированную мРНК, содержащую по меньшей мере одну модификацию, причем по меньшей мере одна модификация представляет собой GC-богатый элемент РНК, содержащий последовательность V2 [CCCCGGC (SEQ ID NO: 141)], как указано в Таблице 2, или ее производные или аналоги, предшествующий консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК. В некоторых вариантах осуществления GC-богатый элемент РНК содержит последовательность V2, как указано в Таблице 2, расположенную непосредственно рядом с консенсусной последовательностью Козак и против хода транскрипции от нее в 5'-НТО мРНК. В некоторых вариантах осуществления GC-богатый элемент РНК содержит последовательность V2, как указано в Таблице 2, расположенную через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 оснований выше консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК. В других вариантах осуществления GC-богатый элемент РНК содержит последовательность V2, как указано в Таблице 2, расположенную через 1-3, 3-5, 5-7, 7-9, 9-12 или 12-15 оснований против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК.

[0221] В других аспектах в изобретении предложена модифицированная мРНК, содержащая по меньшей мере одну модификацию, при этом по меньшей мере одна модификация представляет собой GC-богатый элемент РНК, содержащий последовательность EK [GCCGCC (SEQ ID NO: 139)], как указано в Таблице 2, или ее производные или аналоги, предшествующий консенсусной последовательности Козак в 5'-UTR мРНК. В некоторых вариантах осуществления GC-богатый элемент РНК содержит последовательность EK, как указано в Таблице 2, расположенную

непосредственно рядом с консенсусной последовательностью Козак и против хода транскрипции от нее в 5'-НТО мРНК. В некоторых вариантах осуществления GC-богатый элемент РНК содержит последовательность ЕК, как указано в Таблице 2, расположенную через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 оснований против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК. В других вариантах осуществления GC-богатый элемент РНК содержит последовательность ЕК, как указано в Таблице 2, расположенную через 1-3, 3-5, 5-7, 7-9, 9-12 или 12-15 оснований против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК.

[0222] В еще других аспектах раскрытие обеспечивает модифицированную мРНК, содержащую по меньшей мере одну модификацию, причем по меньшей мере одна модификация представляет собой GC-богатый элемент РНК, содержащий последовательность V1 [CCCCGGCGCC (SEQ ID NO: 140)], как указано в Таблице 2, или их производные или аналоги, предшествующий консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК, при этом 5'-НТО содержит следующую последовательность, приведенную в Таблице 2:

GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGA (SEQ ID NO: 27). Специалист в данной области техники, конечно, поймет, что все U в последовательностях РНК, описанных в данном документе, будут T в соответствующей матричной последовательности ДНК, например, в матрицах или конструкциях ДНК, с которых транскрибируются мРНК по данному изобретению, например, посредством IVT.

[0223] В некоторых вариантах осуществления GC-богатый элемент содержит последовательность V1, как указано в Таблице 2, расположенную непосредственно рядом с консенсусной последовательностью Козак и выше от нее в последовательности 5'-UTR, показанной в Таблице 2. В некоторых вариантах осуществления GC-богатый элемент содержит последовательность V1, как указано в Таблице 2, расположенную на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 оснований выше консенсусной последовательности Козака в 5'-UTR мРНК, при этом 5'-UTR содержит следующую последовательность, показанную в Таблице 2:

GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGA (SEQ ID NO: 27).

[0224] В других вариантах осуществления GC-богатый элемент РНК содержит последовательность V1, как указано в Таблице 2, расположенную через 1-3, 3-5, 5-7, 7-9, 9-12 или 12-15 оснований против хода транскрипции от консенсусной

последовательности Козак в 5'-НТО мРНК, при этом 5'-НТО содержит следующую последовательность, приведенную в Таблице 2:
GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGA (SEQ ID NO: 27).

[0225] В некоторых вариантах осуществления 5'-НТО содержит следующую последовательность, приведенную в Таблице 2:
GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGACCCCGGCGCCGCCACC (SEQ ID NO: 5)

[0226]

Таблица 2

	5′-UTR	**Последовательность 5'-UTR**
	Стандарт	GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACC (SEQ ID NO: 2)
	V1-UTR	GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGACCCCGGCGCCGCCACC (SEQ ID NO: 5)
	V2-UTR	GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGACCCCGGCGCCACC (SEQ ID NO: 26)
	GC-богатые элементы РНК	**Последовательность**
	K0 (Традиционная консенсусная последовательность Козак)	[GCCA/GCC] (SEQ ID NO: 72)
	EK	[GCCGCC] (SEQ ID NO: 139)
	V1	[CCCCGGCGCC] (SEQ ID NO: 140)
	V2	[CCCCGGC] (SEQ ID NO: 141)
	$(CCG)_n$, где n=1-10	$[CCG]_n$ (SEQ ID NO: 131)
	$(GCC)_n$, где n=1-10	$[GCC]_n$ (SEQ ID NO: 138)

[0227] В другом аспекте раскрытие обеспечивает модифицированную мРНК, содержащую по меньшей мере одну модификацию, причем по меньшей мере одна модификация представляет собой GC-богатый элемент РНК, содержащий стабильную вторичную структуру РНК, содержащую последовательность нуклеотидов или их производных или аналогов, соединенных в определенном порядке, которые образует шпильку или петлю-на-стебле. В одном варианте

осуществления стабильная вторичная структура РНК находится против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак. В другом варианте осуществления стабильная вторичная структура РНК расположена через около 30, около 25, около 20, около 15, около 10 или около 5 нуклеотидов против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак. В другом варианте осуществления стабильная вторичная структура РНК расположена через около 20, около 15, около 10 или около 5 нуклеотидов против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак. В другом варианте осуществления стабильная вторичная структура РНК расположена через около 5, около 4, около 3, около 2, около 1 нуклеотид против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак. В другом варианте осуществления стабильная вторичная структура РНК расположена через около 15-30, около 15-20, около 15-25, около 10-15 или около 5-10 нуклеотидов против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак. В другом варианте осуществления стабильная вторичная структура РНК расположена через 12-15 нуклеотидов против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак. В другом варианте осуществления стабильная вторичная структура РНК имеет ΔG около -30 ккал/моль, от около -20 до -30 ккал/моль, около -20 ккал/моль, от около -10 до -20 ккал/моль, около -10 ккал/моль, от около -5 до -10 ккал/моль.

[0228] В другом варианте осуществления модификация функционально связана с открытой рамкой считывания, кодирующей полипептид, и при этом модификация и открытая рамка считывания являются гетерологичными.

[0229] В другом варианте осуществления последовательность GC-богатого элемента РНК состоит исключительно из азотистых оснований гуанина (G) и цитозина (C).

[0230] Элементы РНК, которые обеспечивают желаемую трансляционную регуляторную активность, как описано в данном документе, могут быть идентифицированы и охарактеризованы с использованием известных методов, таких как профилирование рибосом. Профилирование рибосом представляет собой метод, который позволяет определять положения PIC и/или рибосом, связанных с мРНК (см., например, Ingolia et al., (2009) Science 324 (5924):218-23, включенной в данный документ посредством ссылки). Метод основан на защите области или сегмента мРНК с помощью PIC и/или рибосомы от расщепления нуклеазой. Защита приводит к генерации фрагмента РНК длиной 30 п.н., называемого «область узнавания». Последовательность и частоту областей узнавания РНК можно

анализировать способами, известными в данной области техники (например, РНК-секвенирование). Область узнавания примерно расположена по центру на А-сайте рибосомы. Если PIC или рибосома находятся в определенном положении или месте вдоль мРНК, области узнавания, генерируемые в этом положении, будут относительно распространенными. Исследования показали, что в положениях, где PIC и/или рибосома проявляют пониженную процессивность, образуется больше областей узнавания, а в положениях, где PIC и/или рибосома проявляет повышенную процессивность образуется меньше областей узнавания (Gardin et al., (2014) eLife 3:e03735). В некоторых вариантах осуществления время нахождения или время пребывания PIC или рибосомы в дискретном положении или месте вдоль полинуклеотида, содержащего любой один или более элементов РНК, описанных в данном документе, определяют с помощью профилирования рибосомы.

[0231] UTR может быть гомологичной или гетерологичной кодирующей области в полинуклеотиде. В некоторых вариантах осуществления UTR гомологична ОРС, кодирующей полипептид CFTR. В некоторых вариантах осуществления UTR гетерологична ОРС, кодирующей полипептид CFTR. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит две или более 5′-UTR или их функциональных фрагментов, каждый из которых имеет одинаковые или разные нуклеотидные последовательности. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит две или более 3′-UTR или их функциональных фрагментов, каждый из которых имеет одинаковые или разные нуклеотидные последовательности.

[0232] В некоторых вариантах осуществления 5′-UTR или ее функциональный фрагмент, 3′-UTR или ее функциональный фрагмент или любая их комбинация являются оптимизированными по последовательности.

[0233] В некоторых вариантах осуществления 5′-UTR или ее функциональный фрагмент, 3′-UTR или ее функциональный фрагмент или любая их комбинация содержит по меньшей мере одно химически модифицированное азотистое основание, например, N1-метилпсевдоуридин или 5-метоксиурацил.

[0234] UTR могут иметь признаки, которые обеспечивают регулирующую роль, например, повышенную или пониженную стабильность, локализацию и/или эффективность трансляции. Полинуклеотид, содержащий UTR, может быть введена в клетку, ткань или организм, и один или более регуляторных признаков можно измерить с помощью обычных способов. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент 5′’-UTR или 3′-UTR содержит один или более

регуляторных признаков полноразмерной 5 или 3′-UTR, соответственно.

[0235] Природные 5′-UTR обладают признаками, которые играют роль в инициации трансляции. Они содержат сигнатуры, такие как последовательности Козак, которые, как известно, участвуют в процессе, посредством которого рибосома инициирует трансляцию многих генов. Последовательности Козак имеют консенсусную последовательность CCR(A/G)CCAUGG (SEQ ID NO: 73), где R представляет собой пурин (аденин или гуанин) на три основания выше стартового кодона (AUG), за которым следует еще один «G». Также известно, что 5'-UTR образуют вторичные структуры, которые участвуют в связывании фактора элонгации.

[0236] Путем конструирования свойств, обычно обнаруживаемых в обильно экспрессируемых генах определенных органов-мишеней, можно повысить стабильность и продукцию белка полинуклеотидом. Например, введение 5′-UTR экспрессируемой печенью мРНК, такую как альбумин, сывороточный амилоид A, аполипопротеин A/B/E, трансферрин, альфа-фетопротеин, эритропоэтин или фактор VIII, может усилить экспрессию полинуклеотидов в линиях клеток печени или самой печени. Аналогичным образом, использование 5′-UTR из другой тканеспецифической мРНК для улучшения экспрессии в этой ткани возможно для мышц (например, MyoD, миозина, миоглобина, миогенина, геркулина), для эндотелиальных клеток (например, Tie-1, CD36), для миелоидных клеток (например, C/EBP, AML1, G-CSF, ГМ-CSF, CD11b, MSR, Fr-1, i-NOS), для лейкоцитов (например, CD45, CD18), для жировой ткани (например, CD36 , GLUT4, ACRP30, адипонектина) и для эпителиальных клеток легких (например, SP-A/B/C/D).

[0237] В некоторых вариантах осуществления UTR выбраны из семейства транскриптов, белки которых имеют общую функцию, структуру, признак или свойство. Например, кодируемый полипептид может принадлежать к семейству белков (то есть, которые имеют по меньшей мере одну общую функцию, структуру, признак, локализацию, происхождение или паттерн экспрессии), которые экспрессируются в конкретной клетке, ткани или в течение какого-то периода времени в ходе развития. UTR из любого из генов или мРНК могут быть заменены на любую другую UTR того же или другого семейства белков для создания нового полинуклеотида.

[0238] В некоторых вариантах осуществления 5′-UTR и 3′-UTR могут быть гетерологичными. В некоторых вариантах осуществления 5′-UTR может происходить от другого вида, чем 3′-UTR. В некоторых вариантах осуществления

3′-UTR может происходить от другого вида, чем 5′-UTR.

[0239] Международная патентная заявка № PCT/US2014/021522 (публикация № WO/2014/164253, полностью включенная в данный документ посредством ссылки) содержит список типовых UTR, которые можно использовать в полинуклеотиде по данному изобретению в качестве фланкирующих областей для ОРС.

[0240] Примеры UTR в заявке включают, помимо прочего, одну или несколько 5'-UTR и/или 3'-UTR, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты: глобина, такого как α- или β-глобин (например, глобин *Xenopus*, мыши, кролика или человека); сильного сигнала инициации трансляции Козак; CYBA (например, полипептид человеческого цитохрома b-245α); альбумина (например, человеческий альбумин7); HSD17B4 (гидроксистероид(17-β)дегидрогеназа); вируса (например, вирус гравировки табака (TEV), вирус венесуэльского конского энцефалита (VEEV), вирус денге, цитомегаловирус (ЦМВ; например, предранний белок ЦМВ 1 (IE1)), вирус гепатита (например, вирус гепатита В), вирус Синдбис или вирус желтой карликовости ячменя PAV); белка теплового шока (например, hsp70); фактора инициации трансляции (например, elF4G); переносчика глюкозы (например, hGLUT1 (переносчик глюкозы 1 человека)); актина (например, человеческий α- или β-актин); GAPDH; тубулина; гистона; фермента цикла лимонной кислоты; топоизомеразы (например, 5′-UTR гена TOP, лишенного 5′-мотива TOP (олигопиримидиновый тракт)); рибосомного белка Large 32 (L32); рибосомного белка (например, рибосомный белок человека или мыши, такой как, например, rps9); АТФ-синтазы (например, АТФ5А1 или β-субъединица митохондриальной H^+-АТФ-синтазы); гормона роста (например, бычий (bGH) или человеческий (hGH)); фактора элонгации (например, фактор элонгации 1 α1 (EEF1A1)); супероксиддисмутазы марганца (MnSOD); фактор-усилителя миоцитов 2А (MEF2A); β-F1-АТФазы, креатинкиназы, миоглобина, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ); коллагена (например, коллагена типа I, альфа 2 (Col1A2), коллагена типа I, альфа 1 (Col1A1), коллагена типа VI, альфа 2 (Col6A2), коллаген типа VI, альфа 1 (Col6A1)); рибофорина (например, рибофорин I (RPNI)); белка, связанного с рецептором липопротеинов низкой плотности (например, LRP1); кардиотропиноподобного цитокинового фактора (например, Nnt1); кальретикулина (Calr); проколлаген-лизина, 2-оксоглутарат-5-диоксигеназы 1 (Plod1); и нуклеобиндина (например, Nucb1).

[0241] В некоторых вариантах осуществления 5′-UTR выбрана из группы, состоящей из 5′-UTR β-глобина; 5′-UTR, содержащей сильный сигнал инициации

трансляции Козак; 5′-UTR α-полипептида цитохрома b-245 (CYBA); 5′-UTR гидроксистероид(17-β)дегидрогеназы (HSD17B4); 5′-UTR вируса гравировки табака (TEV); 5′-UTR вируса венесуэльского конского энцефалита (TEEV); 5′-проксимальной открытой рамки считывания РНК вируса краснухи (RV), кодирующей неструктурные белки; 5′-UTR вируса денге (DEN); 5′-UTR белка теплового шока 70 (Hsp70); 5′-UTR eIF4G; 5′-UTR GLUT1; их функциональных фрагментов и любой их комбинации.

[0242] В некоторых вариантах осуществления 3′-UTR выбрана из группы, состоящей из 3′-UTR β-глобина; 3′-UTR CYBA; 3′-UTR альбумина; 3′-UTR гормона роста (GH); 3′-UTR VEEV; 3′-UTR вируса гепатита B (ВГВ); 3′-UTR α-глобина; 3′-UTR DEN; 3′-UTR вируса желтой карликовости ячменя PAV (BYDV-PAV); 3′-UTR фактора элонгации удлинения 1 α1 (EEF1A1); 3′-UTR супероксиддисмутазы марганца (MnSOD); 3′-UTR β-субъединицы митохондриальной H(+)-АТФ-синтазы (β-мРНК); 3′-UTR GLUT1; 3′-UTR MEF2A; 3′-UTR β-F1-АТФазы; их функциональных фрагментов и их комбинаций.

[0243] UTR дикого типа, происходящие из любого гена или мРНК, могут быть включены в полинуклеотиды согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления UTR может быть изменена относительно UTR дикого типа или нативной UTR для создания вариантной UTR, например, путем изменения ориентации или местоположения НТО относительно ОРС; или путем включения дополнительных нуклеотидов, делеции нуклеотидов, замены или транспозиции нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления могут использоваться варианты 5′- или 3′-НТО, например, мутанты НТО дикого типа или варианты, в которых один или более нуклеотидов добавлены или удалены из конца НТО.

[0244] Кроме того, одна или более синтетических НТО могут использоваться в комбинации с одной или более несинтетическими НТО. *См.*, например, Mandal and Rossi, Nat. Protoc. 2013 8(3):568-82, содержание которого полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[0245] НТО или их части могут быть размещены в той же ориентации, что и в транскрипте, из которого они были выбраны, или могут быть изменены по ориентации или местоположению. Следовательно, 5′- и/или 3′-НТО могут быть инвертированы, укорочены, удлинены или объединены с одной или более другими 5′-НТО или 3′-НТО.

[0246] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид может содержать несколько НТО, например, двойную, тройную или четвертную 5′-НТО или 3′-НТО.

Например, двойная HTO содержит две копии одной и той же HTO последовательно или по существу последовательно. Например, можно использовать двойную 3'-HTO бета-глобин (см. US 2010/0129877, содержание которого полностью включено в данный документ посредством ссылки).

[0247] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по изобретению содержат 5'-HTO и/или 3'-HTO, выбранные из любой из HTO, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления 5'-HTO содержит:

5′ HTO-001 (выше HTO) (GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACC) (SEQ ID NO.:2);

5′ HTO-002 (выше HTO) (GGGAGAUCAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACC) (SEQ ID NO.:7);

5′ HTO-003 (выше HTO) (См. WO2016/100812);

5′ HTO-004 (выше HTO) (GGGAGACAAGCUUGGCAUUCCGGUACUGUUGGUAAAGCCACC) (SEQ ID NO.:8);

5′ HTO-005 (выше HTO) (GGGAGAUCAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACC) (SEQ ID NO.:9);

5′ HTO-006 (выше HTO) (См. WO2016/100812);

5′ HTO-007 (выше HTO) (GGGAGACAAGCUUGGCAUUCCGGUACUGUUGGUAAAGCCACC) (SEQ ID NO.:10);

5′ HTO-008 (выше HTO) (GGGAAUUAACAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACC) (SEQ ID NO.:11);

5′ HTO-009 (выше HTO) (GGGAAAUUAGACAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACC) (SEQ ID NO.:12);

5′ HTO-010, выше (GGGAAAUAAGAGAGUAAAGAACAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACC) (SEQ ID NO.:13);

5′ HTO-011 (выше HTO) (GGGAAAAAAGAGAGAAAAGAAGACUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACC) (SEQ ID NO.: 14);

5′ HTO-012 (выше HTO) (GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAUAUAUAAGAGCCACC) (SEQ ID NO.:15);

5′ HTO-013 (выше HTO) (GGGAAAUAAGAGACAAAACAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACC) (SEQ ID NO.:16);

5′ HTO-014 (выше HTO) (GGGAAAUUAGAGAGUAAAGAACAGUAAGUAGAAUUAAAAGAGCCACC) (SEQ ID NO.:17);

5′ HTO-015 (выше HTO) (GGGAAAUAAGAGAGAAUAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACC) (SEQ ID NO.:18);

5′ HTO-016 (выше HTO) (GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAAUUAAGAGCCACC) (SEQ ID NO.:19);

5′ HTO-017 (выше HTO); (GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUUUAAGAGCCACC) (SEQ ID NO.:20);

5′ HTO-018 (выше HTO) 5′ HTO

(UCAAGCUUUUGGACCCUCGUACAGAAGCUAAUACGACUCACUAUAGGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACC) (SEQ ID NO.:6);

5′ HTO-019

(GGGAAAUCGCAAAAUUUGCUCUUCGCGUUAGAUUUCUUUUAGUUUUCUCGCA ACUAGCAAGCUUUUUGUUCUCGCC) (SEQ ID NO: 24);

5′ HTO-020

(GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGACCCCGGCGCC GCCACC) (SEQ ID NO: 5); или

5′ HTO-021

(AGGAAAUCGCAAAAUUUGCUCUUCGCGUUAGAUUUCUUUUAGUUUUCUCGCA ACUAGCAAGCUUUUUGUUCUCGCC) (SEQ ID NO: 25).

[0248] В некоторых вариантах осуществления 5'-HTO содержит:

N_1 G G A A A U C G C A A A A $(N_2)_X$ $(N_3)_X$ C U $(N_4)_X$ $(N_5)_X$ C G C G U U A G A U U U C U U U U A G U U U U C U N_6 N_7 C A A C U A G C A A G C U U U U U U G U U C U C G C C $(N_8$ C C)x (SEQ ID NO: 28), где

N_1 представляет собой аденин или гуанин

$(N_2)_x$представляет собой урацил, а x представляет собой целое число от 0 до 5, например, где x = 3 или 4

$(N_3)_x$ представляет собой гуанин и x представляет собой целое число от 0 до 1;

$(N_4)_x$ представляет собой цитозин и x представляет собой целое число от 0 до 1;

$(N_5)_x$представляет собой урацил, а x представляет собой целое число от 0 до 5, например, где x = 2 или 3

N_6 представляет собой урацил или цитозин

N_7 представляет собой урацил или гуанин

$(N_8$ C C)x N_8 представляет собой аденин или гуанин, а x представляет собой целое число от 0 до 1.

[0249] В некоторых вариантах осуществления 3'-HTO содержит:

142-3p 3′-HTO (HTO, включая сайт связывания miR142-3p) (UGAUAAUAGUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGCCUCGGUGGCCAU GCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUA CCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC) (SEQ ID NO.:30);

142-3p 3'-HTO (HTO, включая сайт связывания miR142-3p) (UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCUCCAUAAAGUAGGAAACACUACACAU

GCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUA
CCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC) (SEQ ID NO.:31); или

142-3p 3'-HTO (HTO, включая сайт связывания miR142-3p)
(UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUCCAUAAAGU
AGGAAACACUACAUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGU
ACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC) (SEQ ID NO.:32);

142-3p 3′-HTO (HTO, включая сайт связывания miR142-3p)
(UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCC
CCCAGUCCAUAAAGUAGGAAACACUACACCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGU
ACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC) (SEQ ID NO.: 33);

142-3p 3′-HTO (HTO, включая сайт связывания miR142-3p)
(UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCC
CCCAGCCCCUCCUCCCCUUCUCCAUAAAGUAGGAAACACUACACUGCACCCGU
ACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC) (SEQ ID NO.:34);

142-3p 3′-HTO (HTO, включая сайт связывания miR142-3p)
(UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCC
CCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCUCCAUAAAGUAGGAAAC
ACUACAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC) (SEQ ID NO.:29).

142-3p 3'-HTO (HTO, включая сайт связывания miR142-3p)
(UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCC
CCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAG
UUCCAUAAAGUAGGAAACACUACACUGAGUGGGCGGC) (SEQ ID NO.:35);

3′-HTO-018 (См. SEQ ID NO. 37);

3'-HTO (сайты связывания miR142 и miR126, вариант 1)

(UGAUAAUAGUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGCCUCGGUGGCCAU
GCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUA
CCCCCCGCAUUAUUACUCACGGUACGAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUG
GGCGGC) (SEQ ID NO.:44)

3'-HTO (сайты связывания miR142 и miR126, вариант 2)

(UGAUAAUAGUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGCCUCGGUGGCCUA GCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUA CCCCCCGCAUUAUUACUCACGGUACGAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUG GGCGGC) (SEQ ID NO.:36);

3'-НТО (сайт связывания miR142-3p, вариант 3)

UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCC CCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCUCCAUAAAGUAGGAAACA CUACAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (SEQ ID NO.:41);

3′-НТО

UAAGUCUAAGCUGGAGCCUCCUGAGAGACCUGUGUGAACUAUUGAGAAGAUC GGAACAGCUCCUUACUCUGAGGAAGUUGGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAA GUCUGAGUGGGCGGC (SEQ ID NO: 45); или

3′-НТО

UAAAGCUAAGCUGGAGCCUCUACACAUUGCUUCUAGUUGGCAGAAAUAAUUG AUUAAAAGACCAGAAACUGUGAUAACUGGUACCCCCGUGGUCUUUAAAUAAA GUCUAAGUGGGCGGC (SEQ ID NO: 71).

[0250] В некоторых вариантах осуществления последовательность 5'-НТО и/или 3'-НТО по изобретению содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей 5'-НТО, содержащих любую из SEQ ID NO: 2 или 6-23, и/или последовательностей 3'-НТО, содержащих любую из SEQ ID NO: 29-37, и любую их комбинацию.

[0251] В некоторых вариантах осуществления последовательность 5'-НТО и/или 3'-НТО по изобретению содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентична последовательности,

выбранной из группы, состоящей из последовательностей 5'-НТО, содержащих любую из SEQ ID NO: 2-5, и/или последовательностей 3'-НТО, содержащих любую из SEQ ID NO: 37-44, и любую их комбинацию.

[0252] В некоторых вариантах осуществления последовательность 5'-НТО и/или 3'-НТО по изобретению содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей 5'-НТО, содержащих любую из SEQ ID NO : 24 и 25, и/или последовательностей 3'-НТО, содержащих SEQ ID NO: 45.

[0253] В некоторых вариантах осуществления 5'-НТО содержит аминокислотную последовательность, представленную в Таблице 4B (SEQ ID NO: 2-5). В некоторых вариантах осуществления 3'-НТО содержит аминокислотную последовательность, представленную в Таблице 4B (SEQ ID NO: 37-44). В некоторых вариантах осуществления 5'-НТО содержит аминокислотную последовательность, указанную в Таблице 4B (SEQ ID NO: 2-5), а 3'-НТО содержит аминокислотную последовательность, указанную в Таблице 4B (SEQ ID NO: 37-44).

[0254] В некоторых вариантах осуществления 5'-НТО содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 или 25. В некоторых вариантах осуществления 3'-НТО содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления 5'-НТО содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 или 25, а 3'-НТО содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45.

[0255] Полинуклеотиды по изобретению могут включать комбинации признаков. Например, ОРС может быть фланкирована посредством 5′-НТО, которая содержит сильный сигнал инициации трансляции Козак, и/или 3′-НТО, содержащей последовательность олиго(dT) для матричного добавления поли(А)-хвоста. 5′-НТО может содержать первый фрагмент полинуклеотида и второй фрагмент полинуклеотида из одной и той же и/или разных НТО (см., например, US2010/0293625, который полностью включен для этой цели посредством ссылки).

[0256] Другие последовательности, не относящиеся к НТО, можно использовать в качестве областей или подобластей в полинуклеотиде по настоящему изобретению. Например, интроны или части интронных последовательностей могут быть

включены в полинуклеотид по изобретению. Включение интронных последовательностей может увеличить продукцию белка, а также уровни экспрессии полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению содержит участок внутренней посадки рибосомы (IRES) вместо или в дополнение к НТО (см., например, Yakubov et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010 394(1):189-193, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит IRES вместо последовательности 5′-НТО. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит ОРС и последовательность вирусного капсида. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит синтетическую 5′-НТО в комбинации с несинтетической 3′-НТО.

[0257] В некоторых вариантах осуществления НТО также может включать по меньшей мере один полинуклеотид, усиливающий трансляцию, элемент, усиливающий трансляцию, или элементы, усиливающие трансляцию (в совокупности «ТЕЕ», который относится к последовательностям нуклеиновых кислот, которые увеличивают количество полипептида или белка, продуцируемого из полинуклеотида). В качестве неограничивающего примера, ТЕЕ может быть расположен между промотором транскрипции и старт-кодоном. В некоторых вариантах осуществления 5′-НТО содержит ТЕЕ.

[0258] В одном аспекте ТЕЕ представляет собой консервативный элемент в НТО, который может способствовать трансляционной активности нуклеиновой кислоты, такой как, без ограничения, кэп-зависимая или кэп-независимая трансляция.

11. Сайты связывания микроРНК (миРНК)

[0259] Полинуклеотиды согласно изобретению могут содержать регуляторные элементы, например сайты связывания микроРНК (миРНК), сайты связывания фактора транскрипции, структурированные последовательности и/или мотивы мРНК, искусственные сайты связывания, сконструированные так, чтобы действовать в качестве псевдорецепторов для молекул, связывающих эндогенную нуклеиновую кислоту, и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, содержащие такие регуляторные элементы, упоминаются как содержащие «сенсорные последовательности».

[0260] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, рибонуклеиновая кислота (РНК), например, матричная РНК (мРНК)) согласно

изобретению содержит открытую рамку считывания (ОРС), кодирующую представляющий интерес полипептид, и дополнительно содержит один или более сайт(ов) связывания миРНК. Включение или вставка сайта(ов) связывания миРНК обеспечивает регуляцию полинуклеотидов согласно изобретению и, в свою очередь, полипептидов, кодируемых из них, на основе тканеспецифической и/или специфической для клеточного типа экспрессии природных миРНК.

[0261] В данном изобретении также предложены фармацевтические композиции и составы, которые содержат любой из полинуклеотидов, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления композиция или состав дополнительно содержит средство доставки.

[0262] В некоторых вариантах осуществления композиция или состав могут содержать полинуклеотид, содержащий описанную в данном документе последовательность нуклеиновой кислоты с оптимизированной последовательностью, которая кодирует полипептид. В некоторых вариантах осуществления композиция или состав могут содержать полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК), содержащий полинуклеотид (например, ОРС), обладающий значительной идентичностью последовательности с оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе, которая кодирует полипептид. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно содержит сайт связывания миРНК, например, сайт связывания миРНК, который связывает

[0263] миРНК, например природная миРНК, представляет собой некодирующую РНК длиной 19-25 нуклеотидов, которая связывается с полинуклеотидом и подавляет экспрессию генов или путем снижения стабильности, или путем ингибирования трансляции полинуклеотида. Последовательность миРНК содержит «затравочную» область, то есть последовательность в области положений 2-8 зрелой миРНК. Затравочная область миРНК может содержать положения 2-8 или 2-7 зрелой миРНК.

[0264] микроРНК получены ферментативным путем из областей транскриптов РНК, которые складываются сами по себе, образуя структуры с короткими шпильками, часто называемые пре-миРНК (предшественник миРНК). Пре-миРНК обычно имеет выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце и имеет 3'-гидроксильную и 5'-фосфатную группы. Этот предшественник мРНК процессируется в ядре и впоследствии транспортируется в цитоплазму, где он подвергается дальнейшему процессингу с помощью DICER (фермента НКазы III) с образованием зрелой

микроРНК, состоящей из около 22 нуклеотидов. Зрелая микроРНК затем включается в рибонуклеарную частицу с образованием РНК-индуцированного комплекса сайленсинга, RISC, который обеспечивает сайленсинг генов. Признанная в данной области техники номенклатура зрелых миРНК обычно обозначает плечо пре-миРНК, из которого получена зрелая миРНК; «5p» означает, что микроРНК получена из 5-штрих плеча шпильки пре-миРНК, а «3p» означает, что микроРНК получена из 3-штрих конца шпильки пре-миРНК. miR, обозначенная в данном документе номером, может относиться к любой из двух зрелых микроРНК, полученных из противоположных плеч одной и той же пре-миРНК (например, 3p или 5p микроРНК). Предполагается, что все miR, упомянутые в данном документе, включают в себя плечи/последовательности 3p и 5p, если специально не указано в обозначении 3p или 5p.

[0265] Используемый в данном документе термин «сайт связывания микроРНК (миРНК или miR)» относится к последовательности в пределах полинуклеотида, например, в пределах ДНК или в пределах транскрипта РНК, в том числе в 5'-НТО и/или 3'-НТО, которая имеет достаточную комплементарность ко всей или к области миРНК для взаимодействия, соединения с или связывания с миРНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению содержит ОРС, кодирующую интересующий полипептид, и дополнительно содержит один или несколько сайтов связывания миРНК. В иллюстративных вариантах осуществления 5′-НТО и/или 3′-НТО полинуклеотида (например, рибонуклеиновой кислоты (РНК), например, матричной РНК (мРНК)) содержит один или более сайт(ов) связывания миРНК.

[0266] Сайт связывания миРНК, имеющий достаточную комплементарность с миРНК, относится к степени комплементарности, достаточной для облегчения миРНК-опосредованной регуляции полинуклеотида, например, миРНК-опосредованной репрессии трансляции или деградации полинуклеотида. В типовых аспектах изобретения сайт связывания миРНК, имеющий достаточную комплементарность к миРНК, относится к степени комплементарности, достаточной для облегчения миРНК-опосредованной деградации полинуклеотида, например, расщепления мРНК, опосредованного направляемым миРНК РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC). Сайт связывания миРНК может иметь комплементарность, например, с последовательностью миРНК длиной 19–25 нуклеотидов, с последовательностью миРНК длиной 19–23 нуклеотида или с последовательностью миРНК длиной 22 нуклеотида. Сайт связывания миРНК

может быть комплементарен только части миРНК, например, части из менее 1, 2, 3 или 4 нуклеотидов природной полноразмерной последовательности миРНК, или части менее чем на 1, 2, 3 или 4 нуклеотида короче, чем природная последовательность миРНК. Полная или абсолютная комплементарность (например, полная комплементарность или абсолютная комплементарность по всей или значительной части длины природной миРНК) является предпочтительной, если желаемой регуляцией является деградация мРНК.

[0267] В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК содержит последовательность, которая имеет комплементарность (например, частичную или полную комплементарность) с затравочной последовательностью миРНК. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК содержит последовательность, которая обладает полной комплементарностью с затравочной последовательностью миРНК. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК содержит последовательность, которая имеет комплементарность (например, частичную или полную комплементарность) с последовательностью миРНК. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК содержит последовательность, которая обладает полной комплементарностью с последовательностью миРНК. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК обладает полной комплементарностью с последовательностью миРНК, но для 1, 2 или 3 нуклеотидных замен, концевых добавлений и/или усечений.

[0268] В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК имеет ту же длину, что и соответствующая миРНК. В других вариантах осуществления сайт связывания миРНК на один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать или двенадцать нуклеотид(ов) короче, чем соответствующая миРНК на 5'-конце, 3'- конце или обоих. В других вариантах осуществления сайт связывания микроРНК на два нуклеотида короче, чем соответствующая микроРНК на 5'-конце, 3'-конце или обоих. Сайты связывания миРНК, которые короче, чем соответствующие миРНК, по-прежнему способны разрушать мРНК, содержащую один или более сайтов связывания миРНК, или предотвращать трансляцию мРНК.

[0269] В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК связывает соответствующую зрелую миРНК, которая является частью активного RISC, содержащего дайсер. В другом варианте осуществления связывание сайта связывания миРНК с соответствующей миРНК в RISC приводит к деградации мРНК, содержащую сайт связывания миРНК, или препятствует трансляции мРНК. В

некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК обладает достаточной комплементарностью по отношению к миРНК, так что комплекс RISC, содержащий миРНК, расщепляет полинуклеотид, содержащий сайт связывания миРНК. В других вариантах осуществления сайт связывания миРНК имеет неполную комплементарность, так что комплекс RISC, содержащий миРНК, индуцирует нестабильность в полинуклеотиде, содержащем сайт связывания миРНК. В другом варианте осуществления сайт связывания миРНК имеет неполную комплементарность, так что комплекс RISC, содержащий миРНК, репрессирует транскрипцию полинуклеотида, содержащего сайт связывания миРНК.

[0270] В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК имеет одно, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать или двенадцать несоответствий с соответствующей миРНК.

[0271] В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК имеет по меньшей мере около десяти, по меньшей мере около одиннадцати, по меньшей мере около двенадцати, по меньшей мере около тринадцати, по меньшей мере около четырнадцати, по меньшей мере около пятнадцати, по меньшей мере около шестнадцати, по меньшей мере около семнадцати, при по меньшей мере около восемнадцати, по меньшей мере около девятнадцати, по меньшей мере около двадцати или по меньшей мере около двадцати одного смежных нуклеотидов, комплементарных по меньшей мере около десяти, по меньшей мере около одиннадцати, по меньшей мере около двенадцати, по меньшей мере около тринадцати, по меньшей мере около четырнадцати, по меньшей мере около пятнадцати, по меньшей мере около шестнадцати, по меньшей мере около семнадцати, по меньшей мере около восемнадцати, по меньшей мере около девятнадцати, по меньшей мере около двадцати или по меньшей мере около двадцати одного, соответственно, смежного нуклеотидам соответствующей миРНК.

[0272] Путем встраивания одного или более сайтов связывания миРНК в полинуклеотид по изобретению, полинуклеотид может быть нацелен на деградацию или пониженную трансляцию, при условии наличия рассматриваемой миРНК. Это может уменьшить нежелательные эффекты при доставке полинуклеотида. Например, если полинуклеотид по изобретению не предназначен для доставки в ткань или клетку, но в конечном итоге является указанной тканью или клеткой, то миРНК, присутствующая в ткани или клетке, может ингибировать экспрессию представляющего интерес гена, если один или множество сайтов связывания миРНК встроены в 5'-НТО и/или 3'-НТО полинуклеотида. Таким образом, в некоторых

вариантах осуществления включение одного или нескольких сайтов связывания миРНК в мРНК по изобретению может снизить опасность нецелевых эффектов при доставке молекулы нуклеиновой кислоты и/или обеспечить тканеспецифическую регуляцию экспрессии полипептида, кодируемого мРНК. В других вариантах осуществления включение одного или нескольких сайтов связывания миРНК в мРНК по изобретению может модулировать иммунные ответы при доставке нуклеиновой кислоты *in vivo*. В дополнительных вариантах осуществления включение одного или нескольких сайтов связывания миРНК в мРНК по изобретению может модулировать ускоренный клиренс из крови (ABC) липидсодержащих соединений и композиций, описанных в данном документе.

[0273] Наоборот, сайты связывания миРНК могут быть удалены из полинуклеотидных последовательностей, в которых они встречаются в природе, для увеличения экспрессии белка в определенных тканях. Например, сайт связывания для конкретной миРНК может быть удален из полинуклеотида для улучшения экспрессии белка в тканях или клетках, содержащих миРНК.

[0274] Регуляция экспрессии во множестве тканях может быть достигнута путем введения или удаления одного или более сайтов связывания миРНК, например, одного или более отдельных сайтов связывания миРНК. Решение о том, удалять или вставлять сайт связывания миРНК, может быть принято на основе паттернов экспрессии миРНК и/или их профилирования в тканях и/или клетках в процессе развития и/или болезни. Сообщалось об идентификации миРНК, сайтов связывания миРНК, а также об их паттернах экспрессии и роли в биологии (например, Bonauer et al., Curr Drug Targets 2010 11:943-949; Anand and Cheresh 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; Gentner и Naldini, Tissue Antigens. 2012 80:393-403 и все ссылки в них; каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0275] Примеры тканей для которых известно, что миРНК регулирует мРНК и тем самым экспрессию белка, включают, но не ограничиваются ими, печень (miR-122), мышцы (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), эпителиальные клетки сердца (miR-1d, miR-149), почек (miR-192, miR-194, miR-204) и легких (let-7, miR-133, miR-126).

[0276] В частности, известно, что миРНК дифференциально экспрессируются в

иммунных клетках (также называемых гемопоэтическими клетками), таких как антигенпрезентирующие клетки (АПК) (например, дендритные клетки и макрофаги), макрофаги, моноциты, В-лимфоциты, Т-лимфоциты, гранулоциты, природные клетки-киллеры и т. д. миРНК, специфические для иммунных клеток, участвуют в иммуногенности, аутоиммунности, иммунном ответе на инфекцию, воспалении, а также в нежелательном иммунном ответе после генной терапии и трансплантации тканей/органов. Специфические для иммунных клеток миРНК также регулируют многие аспекты развития, пролиферации, дифференцировки и апоптоза гемопоэтических клеток (иммунных клеток). Например, miR-142 и miR-146 экспрессируются исключительно в иммунных клетках, особенно в больших количества в миелоидных дендритных клетках. Было продемонстрировано, что иммунный ответ на полинуклеотид может быть отключен добавлением сайтов связывания miR-142 к 3'-НТО полирибонуклеотида, что обеспечивает более стабильный перенос генов в тканях и клетках. miR-142 эффективно расщепляет экзогенные полинуклеотиды в антигенпрезентирующих клетках и подавляет цитотоксическую элиминацию трансдуцированных клеток (например, Annoni A et al., blood, 2009, 114, 5152-5161; Brown BD, et al., Nat med. 2006, 12(5), 585-591; Brown BD, et al., blood, 2007, 110(13): 4144-4152, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0277] Антиген-опосредованный иммунный ответ может относиться к иммунному ответу, запускаемому чужеродными антигенами, которые при попадании в организм подвергаются процессингу антигенпрезентирующими клетками и отображаются на поверхности антигенпрезентирующих клеток. Т-клетки могут распознавать представленный антиген и вызывать цитотоксическую элиминацию клеток, которые экспрессируют антиген.

[0278] Введение одного или нескольких (например, одного, двух или трех) сайтов связывания miR-142 в 5′-НТО и/или 3'-НТО полинуклеотида по изобретению может избирательно подавлять экспрессию гена в антигенпрезентирующих клетках посредством опосредованной miR-142 деградации, ограничивая презентацию антигена в антигенпрезентирующих клетках (например, в дендритных клетках) и тем самым предотвращая антиген-опосредованный иммунный ответ после доставки полинуклеотида. Затем полинуклеотид стабильно экспрессируется в целевых тканях или клетках без запуска цитотоксической элиминации.

[0279] В некоторых вариантах осуществления может быть полезно нацеливать множество miR на один и тот же тип клеток и включать сайты связывания в каждое

из плеч 3p и 5p, если они присутствуют в большом количестве (например, и miR-142-3p, и miR142-5p присутствуют в большом количестве в гемопоэтических стволовых клетках). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по изобретению содержат два или более (например, два, три, четыре или более) сайтов связывания miR из: (i) группы, состоящей из miR-142, miR-144, miR-150, miR-155 и miR-223 (которые экспрессируются во многих гемопоэтических клетках); или (ii) группы, состоящей из miR-142, miR-150, miR-16 и miR-223 (которые экспрессируются в B-клетках); или группы, состоящей из miR-223, miR-451, miR-26a, miR-16 (которые экспрессируются в гемопоэтических клетках-предшественниках).

[0280] В некоторых вариантах осуществления также может быть полезно комбинировать различные miR, чтобы одновременно нацеливать на несколько интересующих типов клеток (например, miR-142 и miR-126 для нацеливания на многие клетки гемопоэтической линии и эндотелиальные клетки). Так, например, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по изобретению содержат два или более (например, два, три, четыре или более) сайтов связывания миРНК, при этом: (i) по меньшей мере одна из miR нацелена на клетки гемопоэтической линии (например, miR-142, miR-144, miR-150, miR-155 или miR-223), и по меньшей мере одна из miR нацелена на плазмоцитоидные дендритные клетки, тромбоциты или эндотелиальные клетки (например, miR-126); или (ii) по меньшей мере одна из miR нацелена на B-клетки (например, miR-142, miR150, miR-16 или miR-223) и по меньшей мере одна из miR нацелена на плазмоцитоидные дендритные клетки, тромбоциты или эндотелиальные клетки (например, miR-126); или (iii) по меньшей мере одна из miR нацелена на гемопоэтические клетки-предшественники (например, miR-223, miR-451, miR-26a или miR-16), и по меньшей мере одна из miR нацелена на плазмоцитоидные дендритные клетки, тромбоциты или эндотелиальные клетки (например, miR-126); или (iv) по меньшей мере одна из miR нацелена на клетки гемопоэтической линии (например, miR-142, miR-144, miR-150, miR-155 или miR-223), по меньшей мере одна из miR нацелена на B-клетки (например, miR-142, miR-150, miR-16 или miR-223), и по меньшей мере одна из miR нацелена на плазмоцитоидные дендритные клетки, тромбоциты или эндотелиальные клетки (например, miR-126); или любая другая возможная комбинация вышеуказанных четырех классов сайтов связывания miR (т.е. нацеленных на гемопоэтическую линию, нацеленных на B-клетки, нацеленных на гемопоэтические клетки-предшественники и/или нацеленных на плазмацитоидные дендритные

клетки/тромбоциты/эндотелиальные клетки).

[0281] В одном варианте осуществления для модулирования иммунных ответов полинуклеотиды по данному изобретению могут содержать одну или несколько последовательностей связывания миРНК, которые связываются с одной или несколькими miR, которые экспрессируются в обычных иммунных клетках или любых клетках, которые экспрессируют TLR7 и/или TLR8 и секретируют провоспалительные цитокины и/или хемокины (например, в иммунных клетках периферических лимфоидных органов и/или спленоцитах, и/или эндотелиальных клетках). В настоящее время обнаружено, что включение в мРНК одной или нескольких miR, которые экспрессируются в обычных иммунных клетках или любых клетках, которые экспрессируют TLR7 и/или TLR8 и секретируют провоспалительные цитокины и/или хемокины (например, в иммунных клетках периферических лимфоидных органов, и/или спленоцитах, и/или эндотелиальных клетках), снижает или ингибирует активацию иммунных клеток (например, активацию B-клеток, определяемую частотой активированных B-клеток) и/или продукцию цитокинов (например, продукцию IL-6, IFN-γ и/или TNFα). Кроме того, в настоящее время обнаружено, что включение в мРНК одной или нескольких miR, которые экспрессируются в обычных иммунных клетках или любых клетках, которые экспрессируют TLR7 и/или TLR8 и секретируют провоспалительные цитокины и/или хемокины (например, в иммунных клетках периферических лимфоидных органов, и/или спленоцитах, и/или эндотелиальных клетках), может снижать или ингибировать ответ антитела на лекарственное средство (ADA) в отношении интересующего белка, кодируемого мРНК.

[0282] В другом варианте осуществления для модулирования ускоренного клиренса из крови полинуклеотида, доставляемого в липидсодержащем соединении или композиции, полинуклеотиды по изобретению могут содержать одну или несколько последовательностей связывания miR, которые связываются с одной или несколькими миРНК, экспрессируемыми в обычных иммунных клетках или любых клетках, которые экспрессируют TLR7 и/или TLR8 и секретируют провоспалительные цитокины и/или хемокины (например, в иммунных клетках периферических лимфоидных органов и/или спленоцитах, и/или эндотелиальных клетках). В настоящее время обнаружено, что включение в мРНК одного или нескольких сайтов связывания miR снижает или ингибирует ускоренный клиренс из крови (ABC) липидсодержащего соединения или композиции для применения в доставке мРНК. Кроме того, в настоящее время обнаружено, что включение одного

или нескольких сайтов связывания miR в мРНК снижает сывороточные уровни анти-ПЭГ анти-IgM (например, уменьшает или ингибирует острую продукцию IgM, которые распознают полиэтиленгликоль (ПЭГ) В-клетками) и/или снижает или ингибирует пролиферацию и/или активацию плазмоцитоидных дендритных клеток после введения липидсодержащего соединения или композиции, содержащей мРНК.

[0283] В некоторых вариантах осуществления последовательности miR могут соответствовать любой известной микроРНК, экспрессируемой в иммунных клетках, включая, помимо прочего, последовательности, описанные в публикации США№ US 2005/0261218 и публикации США № US 2005/0059005, содержание которых полностью включено в данное описание посредством ссылки. Неограничивающие примеры miR, экспрессируемых в иммунных клетках, включают те, которые экспрессируются в клетках селезенки, миелоидных клетках, дендритных клетках, плазмоцитоидных дендритных клетках, В-клетках, Т-клетках и/или макрофагах. Например, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24 и miR-27 экспрессируются в миелоидных клетках, miR-155 экспрессируется в дендритных клетках, В клетках и Т-клетках, miR-146 активируется в макрофагах при стимуляции TLR, а miR-126 экспрессируется в плазмоцитоидных дендритных клетках. В некоторых вариантах осуществления miR обильно или преимущественно экспрессируются в иммунных клетках. Например, miR-142 (miR-142-3p и/или miR-142-5p), miR-126 (miR-126-3p и/или miR-126-5p), miR-146 (miR-146-3p и/или miR-146-5p) и miR-155 (miR-155-3p и/или miR155-5p) обильно экспрессируются в иммунных клетках. Эти последовательности микроРНК известны в данной области техники, и, таким образом, специалист в данной области техники может легко разработать последовательности связывания или последовательности-мишени, с которыми эти микроРНК будут связываться, на основе принципа комплементарности Уотсона-Крика.

[0284] В одном варианте осуществления полинуклеотид по изобретению содержит три копии одного и того же сайта связывания миРНК. В некоторых вариантах осуществления использование трех копий одного и того же сайта связывания miR может проявлять полезные свойства по сравнению с использованием одного сайта связывания миРНК. Неограничивающие примеры последовательностей для 3'-НТО, содержащих три сайта связывания миРНК, показаны в SEQ ID NO: 49 (три сайта связывания miR-142-3p) и SEQ ID NO: 51 (три сайта связывания miR-142-5p).

[0285] В другом варианте осуществления полинуклеотид по изобретению содержит две или более (например, две, три, четыре) копии по меньшей мере двух разных

сайтов связывания miR, экспрессированных в иммунных клетках. Неограничивающие примеры последовательностей 3'-НТО, содержащих два или более разных сайтов связывания miR, показаны в SEQ ID NO: 44 (один сайт связывания miR-142-3p и один сайт связывания miR-126-3p), SEQ ID NO: 52 (два сайта связывания miR-142-5p и один сайт связывания miR-142-3p) и SEQ ID NO: 55 (два сайта связывания miR-155-5p и один сайт связывания miR-142-3p).

[0286] В другом варианте осуществления полинуклеотид по изобретению содержит по меньшей мере два сайта связывания miR для микроРНК, экспрессируемых в иммунных клетках, где один из сайтов связывания miR предназначен для miR-142-3p. В различных вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению содержит сайты связывания miR-142-3p и miR-155 (miR-155-3p или miR-155-5p), miR-142-3p и miR-146 (miR-146-3 или miR-146-5p), или miR-142-3p и miR-126 (miR-126-3p или miR-126-5p).

[0287] В другом варианте осуществления полинуклеотид по изобретению содержит по меньшей мере два сайта связывания miR для микроРНК, экспрессируемых в иммунных клетках, где один из сайтов связывания miR предназначен для miR-126-3p. В различных вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению содержит сайты связывания miR-126-3p и miR-155 (miR-155-3p или miR-155-5p), miR-126-3p и miR-146 (miR-146-3p или miR-146-5p), или miR-126-3p и miR-142 (miR-142-3p или miR-142-5p).

[0288] В другом варианте осуществления полинуклеотид по изобретению содержит по меньшей мере два сайта связывания miR для микроРНК, экспрессируемых в иммунных клетках, где один из сайтов связывания miR предназначен для miR-142-5p. В различных вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению содержит сайты связывания miR-142-5p и miR-155 (miR-155-3p или miR-155-5p), miR-142-5p и miR-146 (miR-146- 3 или miR-146-5p), или miR-142-5p и miR-126 (miR-126-3p или miR-126-5p).

[0289] В еще одном варианте осуществления полинуклеотид по изобретению содержит по меньшей мере два сайта связывания miR для микроРНК, экспрессируемых в иммунных клетках, где один из сайтов связывания miR предназначен для miR-155-5p. В различных вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению содержит сайты связывания miR-155-5p miR-142 (miR-142-3p или miR-142-5p), miR-155-5p и miR-146 (miR-146-3 или miR-146-5p), или miR-155-5p и miR-126 (miR-126-3p или miR-126-5p).

[0290] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид согласно

изобретению содержит сайт связывания миРНК, причем сайт связывания миРНК содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, выбранных из Таблицы 3, включая одну или более копий любой одной или более последовательностей сайта связывания миРНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению дополнительно содержит по меньшей мере один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более одинаковых или разных сайтов связывания миРНК, выбранных из Таблицы 3, включая любую их комбинацию.

[0291] В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК связывается с miR-142 или является комплементарным к miR-142. В некоторых вариантах осуществления miR-142 содержит SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК связывается с miR-142-3p или miR-142-5p. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания miR-142-3p содержит SEQ ID NO: 79. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания miR-142-5p содержит SEQ ID NO: 81. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК содержит нуклеотидную последовательность на по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 % или 100 % идентичную SEQ ID NO: 79 или SEQ ID NO: 81.

[0292] В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК связывается с miR-126 или является комплементарным к miR-126. В некоторых вариантах осуществления miR-126 содержит SEQ ID NO: 82. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК связывается с miR-126-3p или miR-126-5p. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания miR-126-3p содержит SEQ ID NO: 84. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания miR-126-5p содержит SEQ ID NO: 86. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК содержит нуклеотидную последовательность на по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 % или 100 % идентичную SEQ ID NO: 84 или SEQ ID NO: 86.

[0293] В одном варианте осуществления 3'-НТО содержит два сайта связывания миРНК, где первый сайт связывания миРНК связывается с miR-142, а второй сайт связывания миРНК связывается с miR-126. В конкретном варианте осуществления 3'-НТО, связывающая miR-142 и miR-126, содержит, состоит из или по существу состоит из последовательности SEQ ID NO: 57.

ТАБЛИЦА 3. Сайты связывания miR-142, miR-126 и miR-142, и miR-126

SEQ ID NO.	Описание	Последовательность
77	miR-142	GACAGUGCAGUCACCCAUAAAGUAGA AAGCACUACUAACAGCACUGGAGGGU GUAGUGUUUCCUACUUUAUGGAUGAG UGUACUGUG
78	miR-142-3p	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA
79	сайт связывания miR-142-3p	UCCAUAAAGUAGGAAACACUACA
80	miR-142-5p	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU
81	сайт связывания miR-142-5p	AGUAGUGCUUUCUACUUUAUG
82	miR-126	CGCUGGCGACGGGACAUUAUUACUUU UGGUACGCGCUGUGACACUUCAAACU CGUACCGUGAGUAAUAAUGCGCCGUC CACGGCA
83	miR-126-3p	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG
84	сайт связывания miR-126-3p	CGCAUUAUUACUCACGGUACGA
85	miR-126-5p	CAUUAUUACUUUUGGUACGCG
86	сайт связывания miR-126-5p	CGCGUACCAAAAGUAAUAAUG

[0294] В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК вставляют в полинуклеотид по изобретению в любом положении полинуклеотида (например, 5′-НТО и/или 3′-НТО). В некоторых вариантах осуществления 5′-НТО содержит сайт связывания миРНК. В некоторых вариантах осуществления 3′-НТО содержит сайт связывания миРНК. В некоторых вариантах осуществления 5'-НТО и 3'-НТО содержат сайт связывания миРНК. Сайт вставки в полинуклеотид может находиться где угодно в полинуклеотиде, пока вставка сайта связывания миРНК в полинуклеотид не мешает трансляции функционального полипептида в отсутствии соответствующей миРНК; и в присутствии миРНК вставка сайта связывания миРНК в полинуклеотид и связывание сайта связывания миРНК с соответствующей миРНК способны расщеплять полинуклеотид или предотвращать трансляцию полинуклеотида.

[0295] В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК вставляют через по меньшей мере около 30 нуклеотидов по ходу транскрипции от стоп-кодона ОРС в полинуклеотиде по изобретению, который содержит ОРС. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК вставляют через по меньшей мере около 10 нуклеотидов, по меньшей мере около 15 нуклеотидов, по меньшей мере около 20 нуклеотидов, по меньшей мере около 25 нуклеотидов, по меньшей мере около 30 нуклеотидов, по меньшей мере около 35 нуклеотидов, по меньшей мере около 40 нуклеотидов, по меньшей мере около 45 нуклеотидов, по меньшей мере около 50 нуклеотидов, по меньшей мере около 55 нуклеотидов, по меньшей мере около 60 нуклеотидов, по меньшей мере около 65 нуклеотидов, по меньшей мере около 70 нуклеотидов, по меньшей мере около 75 нуклеотидов, по меньшей мере около 80 нуклеотидов, по меньшей мере около 85 нуклеотидов, по меньшей мере около 90 нуклеотидов, по меньшей мере около 95 нуклеотидов или по меньшей мере около 100 нуклеотидов по ходу транскрипции от стоп-кодона ОРС в полинуклеотиде согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК вставляют через от около 10 нуклеотидов до около 100 нуклеотидов, от около 20 нуклеотидов до около 90 нуклеотидов, от около 30 нуклеотидов до около 80 нуклеотидов, от около 40 нуклеотидов до около 70 нуклеотидов, от около 50 нуклеотидов до около 60 нуклеотидов, от около 45 нуклеотидов до около 65 нуклеотидов по ходу транскрипции от стоп-кодона ОРС в полинуклеотиде согласно изобретению.

[0296] В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК вставлен в 3'-НТО сразу после стоп-кодона кодирующей области полинуклеотида по изобретению, например, мРНК. В некоторых вариантах осуществления, если в конструкции имеется несколько копий стоп-кодона, сайт связывания миРНК вставлен сразу после последнего стоп-кодона. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК вставлен далее (ниже) стоп-кодона, и в этом случае между стоп-кодоном и сайтом(ами) связывания miR имеются основания 3'-НТО. В некоторых вариантах осуществления три неограничивающих примера возможных сайтов вставки miR в 3'-НТО показаны в SEQ ID NO: 56, 57 и 58, которые показывают последовательность 3'-НТО с сайтом miR-142-3p, вставленным в один из трех различных возможных сайтов вставки, соответственно, в пределах 3'-НТО.

[0297] В некоторых вариантах осуществления один или несколько сайтов связывания миРНК могут быть расположены в пределах 5'-НТО в одном или нескольких возможных сайтах вставки. Например, три неограничивающих примера

возможных сайтов вставки miR в 5'-НТО показаны в SEQ ID NO: 21, 22 или 23, которые показывают последовательность 5'-НТО с сайтом miR-142-3p, вставленным в один из трех различных возможных сайтов вставки, соответственно, в пределах 5'-НТО.

[0298] В одном варианте осуществления кодон-оптимизированная открытая рамка считывания, кодирующая интересующий полипептид, содержит стоп-кодон, и по меньшей мере один сайт связывания микроРНК расположен в пределах 1-100 нуклеотидов 3'-НТО после стоп-кодона. В одном варианте осуществления кодон-оптимизированная открытая рамка считывания, кодирующая интересующий полипептид, содержит стоп-кодон, и по меньшей мере один сайт связывания микроРНК для miR, экспрессируемой в иммунных клетках, расположен в пределах 30-50 нуклеотидов 3'-НТО после стоп-кодона. В другом варианте осуществления кодон-оптимизированная открытая рамка считывания, кодирующая интересующий полипептид, содержит стоп-кодон, и по меньшей мере один сайт связывания микроРНК для miR, экспрессируемой в иммунных клетках, расположен в пределах по меньшей мере 50 нуклеотидов 3'-НТО после стоп-кодона. В другом варианте осуществления кодон-оптимизированная открытая рамка считывания, кодирующая интересующий полипептид, содержит стоп-кодон, и по меньшей мере один сайт связывания микроРНК для miR, экспрессируемой в иммунных клетках, расположен в пределах 3'-НТО сразу после стоп-кодона или в пределах 15-20 нуклеотидов 3'-НТО после стоп-кодона, или в пределах 70-80 нуклеотидов 3'-НТО после стоп-кодона. В других вариантах осуществления 3'-НТО содержит более одного сайта связывания миРНК (например, 2-4 сайта связывания миРНК), где может быть спейсерная область (например, из 10-100, 20-70 или 30-50 нуклеотидов в длину) между каждым сайтом связывания миРНК. В другом варианте осуществления 3'-НТО содержит спейсерную область между концом сайта(ов) связывания миРНК и нуклеотидами хвоста поли-А. Например, спейсерная область длиной 10-100, 20-70 или 30-50 нуклеотидов может располагаться между концом сайта (сайтов) связывания миРНК и началом хвоста поли-А.

[0299] В одном варианте осуществления кодон-оптимизированная открытая рамка считывания, кодирующая интересующий полипептид, содержит старт-кодон, и по меньшей мере один сайт связывания микроРНК расположен в пределах 1-100 нуклеотидов 5'-НТО до (выше) старт-кодона. В одном варианте осуществления кодон-оптимизированная открытая рамка считывания, кодирующая интересующий полипептид, содержит старт-кодон, и по меньшей мере один сайт связывания

микроРНК для miR, экспрессируемой в иммунных клетках, расположен в пределах 10-50 нуклеотидов 5'-НТО до (выше) старт-кодона. В другом варианте осуществления кодон-оптимизированная открытая рамка считывания, кодирующая интересующий полипептид, содержит старт-кодон, и по меньшей мере один сайт связывания микроРНК для miR, экспрессируемой в иммунных клетках, расположен в пределах по меньшей мере 25 нуклеотидов 5'-НТО до (выше) старт-кодона. В другом варианте осуществления кодон-оптимизированная открытая рамка считывания, кодирующая интересующий полипептид, содержит старт-кодон, и по меньшей мере один сайт связывания микроРНК для miR, экспрессируемой в иммунных клетках, расположен в пределах 5'-НТО сразу до старт-кодона или в пределах 15-20 нуклеотидов 5'-НТО до старт-кодона, или в пределах 70-80 нуклеотидов 5'-НТО до старт-кодона. В других вариантах осуществления 5'-НТО содержит более одного сайта связывания миРНК (например, 2-4 сайта связывания миРНК), где может быть спейсерная область (например, из 10-100, 20-70 или 30-50 нуклеотидов в длину) между каждым сайтом связывания миРНК.

[0300] В одном варианте осуществления 3'-НТО содержит более одного стоп-кодона, при этом по меньшей мере один сайт связывания миРНК расположен ниже стоп-кодона. Например, 3'-НТО может содержать 1, 2 или 3 стоп-кодона. Неограничивающие примеры тройных стоп-кодонов, которые можно использовать, включают: UGAUAAUAG (SEQ ID NO: 104), UGAUAGUAA (SEQ ID NO: 105), UAAUGAUAG (SEQ ID NO: 106), UGAUAAUAA (SEQ ID NO: 107), UGAUAGUAG (SEQ ID NO: 108), UAAUGAUGA (SEQ ID NO: 109), UAAUAGUAG (SEQ ID NO: 110), UGAUGAUGA (SEQ ID NO: 111), UAAUAAUAA (SEQ ID NO: 112) и UAGUAGUAG (SEQ ID NO: 113). В пределах 3'-НТО, например, 1, 2, 3 или 4 сайта связывания миРНК, например, сайты связывания miR-142-3p, могут быть расположены непосредственно рядом со стоп-кодоном(ами) или на любое количество нуклеотидов ниже конечного стоп-кодона. Когда 3'-НТО содержит несколько сайтов связывания миРНК, эти сайты связывания могут быть расположены непосредственно рядом друг с другом в конструкции (т. е. один за другим) или, альтернативно, между каждым сайтом связывания могут быть расположены спейсерные нуклеотиды.

[0301] В одном варианте осуществления 3'-НТО содержит три стоп-кодона с одним сайтом связывания miR-142-3p, расположенным ниже 3-го стоп-кодона. Неограничивающие примеры последовательностей 3'-НТО, имеющих три стоп-кодона и один сайт связывания miR-142-3p, расположенные в разных положениях

ниже конечного стоп-кодона, показаны в SEQ ID NO: 48, 56, 57 и 58.

ТАБЛИЦА 4. 5'-НТО, 3'-НТО, последовательности miR и сайты связывания miR

SEQ ID NO:	Последовательность
46	GCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCC CAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCUCCAUAAAGUA GGAAACACUACAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (3'-НТО с сайтом связывания miR 142-3p)
79	UCCAUAAAGUAGGAAACACUACA (сайт связывания miR 142-3P)
78	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA (последовательность miR 142-3p)
80	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU (последовательность miR 142-5p)
87	CCUCUGAAAUUCAGUUCUUCAG (последовательность miR 146-3p)
88	UGAGAACUGAAUUCCAUGGGUU (последовательность miR 146-5p)
89	CUCCUACAUAUUAGCAUUAACA (последовательность miR 155-3p)
90	UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU (последовательность miR 155-5p)
83	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG (последовательность miR 126-3p)
85	CAUUAUUACUUUUGGUACGCG (последовательность miR 126-5p)
91	CCAGUAUUAACUGUGCUGCUGA (последовательность miR 16-3p)
92	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG (последовательность miR 16-5p)
93	CAACACCAGUCGAUGGGCUGU (последовательность miR 21-3p)
94	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA (последовательность miR 21-5p)

SEQ ID NO:	Последовательность
95	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA (последовательность miR 223-3p)
96	CGUGUAUUUGACAAGCUGAGUU (последовательность miR 223-5p)
97	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG (последовательность miR 24-3p)
98	UGCCUACUGAGCUGAUAUCAGU (последовательность miR 24-5p)
99	UUCACAGUGGCUAAGUUCCGC (последовательность miR 27-3p)
100	AGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCA (последовательность miR 27-5p)
84	CGCAUUAUUACUCACGGUACGA (сайт связывания miR126-3p)
47	**UGAUAAUAG**GCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUG GGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCC GCAUUAUUACUCACGGUACGAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAG UGGGCGGC (3'-HTO с сайтом связывания miR 126-3p)
37	**UGAUAAUAG**GCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUG GGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCG UGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (3'-HTO, сайты связывания miR отсутствуют)
29	**UGAUAAUAG**GCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUG GGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCU CCAUAAAGUAGGAAACACUACAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGA GUGGGCGGC (3'-HTO с сайтом связывания miR 142-3p)
44	**UGAUAAUAG**UCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGCCUCG GUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUC CCCUUCCUGCACCCGUACCCCCCGCAUUAUUACUCACGGUACGAG UGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (3'-HTO с сайтами связывания miR 142-3p и miR 126-3p, вариант 1)

SEQ ID NO:	Последовательность
101	UUAAUGCUAAUUGUGAUAGGGGU (последовательность miR 155-5p)
102	ACCCCUAUCACAAUUAGCAUUAA (сайт связывания miR155-5p)
49	**UGAUAAUAG**UCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (3'-HTO с 3 сайтами связывания miR 142-3p)
50	**UGAUAAUAG**GCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCCAGUAGUGCUUUCUACUUUAUGGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (3'-HTO с сайтом связывания miR 142-5p)
51	**UGAUAAUAG**AGUAGUGCUUUCUACUUUAUGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCAGUAGUGCUUUCUACUUUAUGUCCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCAGUAGUGCUUUCUACUUUAUGGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (3'-HTO с 3 сайтами связывания miR 142-5p)
52	**UGAUAAUAG**AGUAGUGCUUUCUACUUUAUGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCAGUAGUGCUUUCUACUUUAUGGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (3'-HTO с 2 сайтами связывания miR 142-5p и 1 сайтом связывания miR 142-3p)
53	**UGAUAAUAG**GCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCACCCCUAUCACAAUUAGCAUUAAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (3'-HTO с сайтом связывания miR 155-5p)

SEQ ID NO:	Последовательность
54	**UGAUAAUAG**ACCCCUAUCACAAUUAGCAUUAAGCUGGAGCCUCG GUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCACCCCUAUCACAAUUAG CAUUAAUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCC CACCCCUAUCACAAUUAGCAUUAAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCU GAGUGGGCGGC (3'-HTO с 3 сайтами связывания miR 155-5p)
55	**UGAUAAUAG**ACCCCUAUCACAAUUAGCAUUAAGCUGGAGCCUCG GUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCAUAAAGUAGGAAAC ACUACAUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCC CACCCCUAUCACAAUUAGCAUUAAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCU GAGUGGGCGGC (3'-HTO с 2 сайтами связывания miR 155-5p и 1 сайтом связывания miR 142-3p)
56	**UGAUAAUAG**UCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGCCUCG GUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUC CCCUUCCUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGA GUGGGCGGC (3'-HTO с сайтом связывания miR 142-3p, вставка P1)
57	**UGAUAAUAG**GCUGGAGCCUCGGUGGCUCCAUAAAGUAGGAAACA CUACACAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUC CCCUUCCUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGA GUGGGCGGC (3'-HTO с сайтом связывания miR 142-3p, вставка P2)
58	**UGAUAAUAG**GCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUG GGCCUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAUCCCCCCAGCCCCUCCUC CCCUUCCUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGA GUGGGCGGC (3'-HTO с сайтом связывания miR 142-3p, вставка P3)
81	AGUAGUGCUUUCUACUUUAUG (сайт связывания miR-142-5p)
77	GACAGUGCAGUCACCCAUAAAGUAGAAAGCACUACUAACAGCAC UGGAGGGUGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGAUGAGUGUACUGUG (miR-142)

SEQ ID NO:	Последовательность
2	GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGC CACC (5′-HTO)
21	GGGAAAUAAGAGUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAAGAAAAGAA GAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACC (5'-HTO с сайтом связывания miR142-3p в положении p1)
22	GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAUCCAUAAAGUAGGAAA CACUACAGAAGAAAUAUAAGAGCCACC (5'-HTO с сайтом связывания miR142-3p в положении p2)
23	GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAUCCA UAAAGUAGGAAACACUACAGAGCCACC (5'-HTO с сайтом связывания miR142-3p в положении p3)
103	ACCCCUAUCACAAUUAGCAUUAA (сайт связывания miR155-5p)
59	**UGAUAAUAG**AGUAGUGCUUUCUACUUUAUGGCUGGAGCCUCGGU GGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCAGUAGUGCUUUCUACUUUA UGUCCCCCCAGCCCCUCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCAGUA GUGCUUUCUACUUUAUGGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGG CGGC (3'-HTO с 3 сайтами связывания miR 142-5p)
60	**UGAUAAUAG**GCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUC CAUAAAGUAGGAAACACUACAUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUC CCCUUCCUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGA GUGGGCGGC (3'-HTO, включая сайт связывания miR142-3p)
61	**UGAUAAUAG**GCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUG GGCCUCCCCCCCAGUCCAUAAAGUAGGAAACACUACACCCCUCCUC CCCUUCCUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGA GUGGGCGGC (3'-HTO, включая сайт связывания miR142-3p)
62	**UGAUAAUAG**GCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUG GGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCUCCAUAAAGUAGGAAAC ACUACACUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGA

SEQ ID NO:	Последовательность
	GUGGGCGGC (3'-HTO, включая сайт связывания miR142-3p)
63	**UGAUAAUAG**GCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUG GGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCG UGGUCUUUGAAUAAAGUUCCAUAAAGUAGGAAACACUACACUGA GUGGGCGGC (3'-HTO, включая сайт связывания miR142-3p)
64	**UGAUAAUAG**UCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGCCUCG GUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUC CCCUUCCUGCACCCGUACCCCCCGCAUUAUUACUCACGGUACGAG UGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (3'-HTO с сайтами связывания miR 142-3p и miR 126-3p, вариант 2)
38	**UGAUAAUAG**GCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUG GGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCG UGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (3'-HTO, сайты связывания miR, вариант 2, отсутствуют)
41	**UGAUAAUAG**GCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUG GGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCU CCAUAAAGUAGGAAACACUACAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGA GUGGGCGGC (3'-HTO с вариантом 3 сайта связывания miR 142-3p)
42	**UGAUAAUAG**GCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUG GGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCC GCAUUAUUACUCACGGUACGAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAG UGGGCGGC (3'-HTO с вариантом 3 сайта связывания miR 126-3p)
43	**UGAUAAUAG**UCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGCCUCG GUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCAUAAAGUAGGAAAC ACUACAUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCC CUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCU GAGUGGGCGGC (3'-HTO с 3 сайтами связывания miR 142-3p, вариант 2)
65	**UGAUAAUAG**UCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGCCUCG

SEQ ID NO:	Последовательность
	GUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUC CCCUUCCUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGA GUGGGCGGC (3'-HTO с сайтом связывания miR 142-3p, вариант 2 вставка P1)
66	**UGAUAAUAG**GCUGGAGCCUCGGUGGCUCCAUAAAGUAGGAAACA CUACACUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUC CCCUUCCUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGA GUGGGCGGC (3'-HTO с сайтом связывания miR 142-3p, вариант 2 вставка P2)
67	**UGAUAAUAG**GCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUG GGCCUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAUCCCCCCAGCCCCUCCUC CCCUUCCUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGA GUGGGCGGC (3'-HTO с сайтом связывания miR 142-3p, вариант 2 вставка P3)
68	**UGAUAAUAG**GCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUG GGCCUCCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCA CCCCUAUCACAAUUAGCAUUAAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGA GUGGGCGGC (3'-HTO с вариантом 2 сайта связывания miR 155-5p)
69	**UGAUAAUAG**ACCCCUAUCACAAUUAGCAUUAAGCUGGAGCCUCG GUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCACCCCUAUCACAAUUAG CAUUAAUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCC CACCCCUAUCACAAUUAGCAUUAAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCU GAGUGGGCGGC (3'-HTO с 3 сайтами связывания miR 155-5p, вариант 2)
70	**UGAUAAUAG**ACCCCUAUCACAAUUAGCAUUAAGCUGGAGCCUCG GUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCAUAAAGUAGGAAAC ACUACAUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCC CACCCCUAUCACAAUUAGCAUUAAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCU GAGUGGGCGGC (3'-HTO с 2 сайтами связывания miR 155-5p и 1 сайтом связывания miR 142-3p, вариант 2)

Стоп-кодон = жирным шрифтом

Сайт связывания miR 142-3p = подчеркнут

Сайт связывания miR 126-3p = подчеркнут жирным шрифтом

Сайт связывания miR 155-5p = заштрихован

Сайт связывания miR 142-5p = заштрихован и подчеркнут жирным шрифтом

ТАБЛИЦА 4B. Примеры предпочтительных HTO

SEQ ID NO:	**Последовательность**
5’-HTO (v1) (SEQ ID NO:2)	GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAG AGCCACC
5’-HTO (v1 A) (SEQ ID NO:3)	AGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAG AGCCACC
5’-HTO (v1.1 A) (SEQ ID NO:4)	AGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAG **ACCCCGGCGCC**GCCACC
5’-HTO (v1.1) (SEQ ID NO:5)	GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAG A**CCCCGGCGCC**GCCACC
3’-HTO (v1) (SEQ ID NO:37)	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCC UUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUA CCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
3’-HTO (v1.1) (SEQ ID NO:38)	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCC UUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUA CCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
3’-HTO (miR122) (SEQ ID NO:39)	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCC UUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUA CCCCCCAAACACCAUUGUCACACUCCAGUGGUCUUUGAAUA AAGUCUGAGUGGGCGGC
3’-HTO (v1.1 miR122) (SEQ ID NO:40)	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCC UUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUA CCCCCCAAACACCAUUGUCACACUCCAGUGGUCUUUGAAUA AAGUCUGAGUGGGCGGC

3’-HTO (v1.1 mir142-3p) (SEQ ID NO:41)	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
3’-HTO (v1.1 mir 126-3p) (SEQ ID NO:42)	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCCGCAUUAUUACUCACGGUACGAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
3’-HTO (v.1.1 3x miR142-3p) (SEQ ID NO:43)	UGAUAAUAGUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
3’-HTO (mir-126, miR-142-3p) (SEQ ID NO:44)	UGAUAAUAGUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCCGCAUUAUUACUCACGGUACGAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC

[0302] В одном варианте осуществления полинуклеотид по изобретению содержит 5'-НТО, кодон-оптимизированную открытую рамку считывания, кодирующую интересующий полипептид, 3'-НТО, содержащую по меньшей мере один сайт связывания миРНК для miR, экспрессируемого в иммунных клетках, и 3'-хвостовую область связанных нуклеозидов. В различных вариантах осуществления 3'-НТО содержит 1-4, по меньшей мере два, один, два, три или четыре сайта связывания миРНК для miR, экспрессируемых в иммунных клетках, предпочтительно обильно или преимущественно экспрессируемых в иммунных клетках.

[0303] В одном варианте осуществления по меньшей мере одна миРНК, экспрессируемая в иммунных клетках, представляет собой сайт связывания микроРНК miR-142-3p. В одном варианте осуществления сайт связывания микроРНК miR-142-3p содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 79. В одном варианте осуществления 3'-НТО мРНК, содержащий сайт связывания

микроРНК miR-142-3p, содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 46.

[0304] В одном варианте осуществления по меньшей мере одна миРНК, экспрессируемая в иммунных клетках, представляет собой сайт связывания микроРНК miR-126. В одном варианте осуществления сайт связывания miR-126 представляет собой сайт связывания miR-126-3p. В одном варианте осуществления сайт связывания микроРНК miR-126-3p содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 84. В одном варианте осуществления 3'-НТО мРНК по изобретению, содержащая сайт связывания микроРНК miR-126-3p, содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 47.

[0305] Неограничивающие иллюстративные последовательности для miR, с которыми может связываться сайт(ы) связывания микроРНК по данному изобретению, включают следующие: miR-142-3p (SEQ ID NO: 78), miR-142-5p (SEQ ID NO: 80), miR-146-3p (SEQ ID NO: 87), miR-146-5p (SEQ ID NO: 88), miR-155-3p (SEQ ID NO: 89), miR-155-5p (SEQ ID NO: 90), miR-126-3p (SEQ ID NO: 83), miR-126-5p (SEQ ID NO: 85), miR-16-3p (SEQ ID NO: 91), miR-16-5p (SEQ ID NO: 92), miR-21-3p (SEQ ID NO: 93), miR-21-5p (SEQ ID NO: 94), miR-223-3p (SEQ ID NO: 95), miR-223-5p (SEQ ID NO: 96), miR-24-3p (SEQ ID NO: 97), miR-24-5p (SEQ ID NO: 98), miR-27-3p (SEQ ID NO: 99) и miR-27-5p (SEQ ID NO: 100). Другие подходящие последовательности miR, экспрессируемые в иммунных клетках (например, обильно или преимущественно экспрессируемые в иммунных клетках), известны и доступны в данной области техники, например, в базе данных микроРНК Манчестерского университета, miRBase. Сайты, которые связывают любую из вышеупомянутых miR, могут быть созданы на основе принципа комплементарности Уотсона-Крика к miR, обычно 100% комплементарности к miR, и вставлены в конструкцию мРНК по данному изобретению, как описано в данном документе.

[0306] В другом варианте осуществления полинуклеотид по данному изобретению (например, и мРНК, например, ее 3'-НТО) может содержать по меньшей мере один сайт связывания миРНК, тем самым снижая или ингибируя ускоренный клиренс из крови, например, путем снижения или ингибирования продукции IgM, например, в отношении ПЭГ, с помощью В-клеток и/или снижения или ингибирования пролиферации и/или активации pDC, и может содержать по меньшей мере один сайт связывания миРНК для модулирования тканевой экспрессии интересующего кодируемого белка.

[0307] На генную регуляцию миРНК может влиять последовательность, окружающая миРНК, такая как, но не ограничиваясь, вид окружающей

последовательности, тип последовательности (например, гетерологичная, гомологичная, экзогенная, эндогенная или искусственная), регуляторные элементы в окружающей последовательности и/или структурные элементы в окружающей последовательности. На миРНК может влиять 5'-НТО и/или 3'-НТО. В качестве неограничивающего примера, 3'-НТО, не принадлежащая человеку, может усиливать регуляторный эффект последовательности миРНК на экспрессию представляющего интерес полипептида по сравнению с 3'-НТО человека того же типа последовательности.

[0308] В одном варианте осуществления другие регуляторные элементы и/или структурные элементы 5'-НТО могут влиять на миРНК-опосредованную регуляцию генов. Одним из примеров регуляторного элемента и/или структурного элемента является структурированный IRES (участок внутренней посадки рибосомы) в 5'-НТО, который необходим для связывания фактор элонгации трансляции для инициации трансляции белка. Связывание EIF4A2 с этим вторично структурированным элементом в 5'-НТО является необходимым для миРНК-опосредованной экспрессии генов (Meijer HA et al., Science, 2013, 340, 82-85, включенная в данный документ во всей полноте посредством ссылки). Полинуклеотиды по изобретению могут, кроме того, содержать эту структурированную 5'-НТО для усиления микроРНК-опосредованной регуляции генов.

[0309] По меньшей мере один сайт связывания миРНК может быть встроен в 3'-НТО полинуклеотида по изобретению. В этом контексте по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять, по меньшей мере десять или более сайтов связывания миРНК могут быть встроены в 3'-НТО полинуклеотида по изобретению. Например, от 1 до 10, от 1 до 9, от 1 до 8, от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3, 2 или 1 сайтов связывания миРНК могут быть встроены в 3'-НТО полинуклеотида по изобретению. В одном варианте осуществления сайты связывания миРНК, включенные в полинуклеотид по изобретению, могут быть одинаковыми или могут быть разными сайтами миРНК. Комбинация различных сайтов связывания миРНК, включенных в полинуклеотид по изобретению, может содержать комбинации, в которые включено более одной копии любого из различных сайтов миРНК. В другом варианте осуществления сайты связывания миРНК, включенные в полинуклеотид по изобретению, могут нацеливаться на одни и те же или разные ткани в организме. В качестве

неограничивающего примера уровень экспрессии в определенных типах клеток (например, миелоидных клетках, эндотелиальных клетках и т. д.) может быть уменьшен посредством введения сайтов связывания миРНК, специфических для ткани, типа клеток или заболевания, в 3'-НТО полинуклеотида по изобретению.

[0310] В одном варианте осуществления сайт связывания миРНК может быть встроен вблизи 5'-конца 3'-НТО, примерно посередине между 5'-концом и 3'-концом 3'-НТО и/или рядом с 3'-концом 3'-НТО в полинуклеотиде согласно изобретнию. В качестве неограничивающего примера сайт связывания миРНК может быть встроен вблизи 5'-конца 3'-НТО и примерно посередине между 5'-концом и 3'-концом 3'-НТО. В качестве другого неограничивающего примера сайт связывания миРНК может быть встроен вблизи 3'-конца 3'-НТО и примерно посередине между 5'-концом и 3'-концом 3'-НТО. В качестве еще одного другого неограничивающего примера сайт связывания миРНК может быть встроен около 5'-конца 3'-НТО и около 3'-конца 3'-НТО.

[0311] В другом варианте осуществления 3'-НТО может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 сайтов связывания миРНК. Сайты связывания миРНК могут быть комплементарны последовательности миРНК, затравочной последовательности миРНК и/или последовательностям миРНК, фланкирующим затравочную последовательность.

[0312] В некоторых вариантах осуществления экспрессию полинуклеотида по изобретению можно контролировать путем включения по меньшей мере одной сенсорной последовательности в полинуклеотид и приготовления полинуклеотида в форме для введения. В качестве неограничивающего примера полинуклеотид по изобретению может быть нацелен на ткань или клетку путем включения сайта связывания миРНК и заключения полинуклеотида в липидную наночастицу, содержащую ионизируемый липид, включая любой из липидов, описанных в данном документе.

[0313] Полинуклеотид согласно изобретению может быть сконструирован для более локальной экспрессии в конкретных тканях, типах клеток или биологических условиях на основе паттернов экспрессии миРНК в различных тканях, типах клеток или биологических условий. Посредством введения тканеспецифических сайтов связывания миРНК полинуклеотид по изобретению может быть сконструирован для оптимальной экспрессии белка в ткани или клетке или в контексте биологического состояния.

[0314] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид согласно

изобретению может быть сконструирован так, чтобы содержать сайты связывания миРНК, которые или имеют 100 % идентичность с известными затравочными последовательностями миРНК, или имеют идентичность менее 100 % с затравочными последовательностями миРНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению может быть сконструирован так, чтобы содержать сайты связывания миРНК, которые имеют по меньшей мере: 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97 %, 98% или 99% идентичности с известными затравочными последовательностями миРНК. Затравочная последовательность миРНК может быть частично мутирована для уменьшения аффинности связывания миРНК и, как таковая, приводит к уменьшенной ингибирующей модуляции полинуклеотида. По сути, степень соответствия или несоответствия между сайтом связывания миРНК и затравочной областью миРНК может действовать как реостат для более тонкой настройки способности миРНК модулировать экспрессию белка. Кроме того, мутация в незатравочной области сайта связывания миРНК также может влиять на способность миРНК модулировать экспрессию белка.

[0315] В одном варианте осуществления последовательность миРНК может быть включена в петлю шпильки.

[0316] В другом варианте осуществления затравочная последовательность миРНК может быть включена в петлю шпильки, а сайт связывания миРНК может быть включена в 5' или 3' стебля шпильки.

[0317] В одном варианте осуществления последовательность миРНК в 5'-НТО может быть использована для стабилизации полинуклеотида по изобретению, описанному в данном документе.

[0318] В другом варианте осуществления последовательность миРНК в 5'-НТО полинуклеотида согласно изобретению может быть использована для уменьшения доступности сайта инициации трансляции, такого как, но не ограничиваясь, стартовый кодон. См., например, Matsuda et al., PLoS One. 2010 11(5):e15057; включенную в данное описание в полном объеме посредством ссылки, в которой используются олигонуклеотиды и комплексы соединения экзона (EJC) около стартового кодона (от -4 до +37, где A кодонов AUG равен +1) антисмысловых закрытых нуклеиновых кислот (ЗНК), чтобы уменьшить доступ к первому стартовому кодону (AUG). Matsuda продемонстрировал, что изменение последовательности около стартового кодона с помощью ЗНК или EJC влияет на эффективность, длину и структурную стабильность полинуклеотида.

Полинуклеотид по изобретению может содержать последовательность миРНК вместо последовательности ЗНК или EJC, описанной Matsuda et al., около сайта инициации трансляции, чтобы уменьшить доступ к сайту инициации трансляции. Сайт инициации трансляции может быть до, после или внутри последовательности миРНК. В качестве неограничивающего примера сайт инициации трансляции может быть расположен в последовательности миРНК, такой как затравочная последовательность или сайт связывания.

[0319] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению может содержать по меньшей мере одну миРНК для ослабления презентации антигена антигенпрезентирующими клетками. миРНК может представлять собой полную последовательность миРНК, затравочную последовательность миРНК, последовательность миРНК без затравочной области или их комбинацию. В качестве неограничивающего примера миРНК, включенная в полинуклеотид по изобретению, может быть специфической для системы кроветворения. В качестве другого неограничивающего примера миРНК, включенная в полинуклеотид по изобретению для ослабления презентации антигена, представляет собой miR-142-3p.

[0320] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению может содержать по меньшей мере одну миРНК для ослабления экспрессии кодируемого полипептида в представляющей интерес ткани или клетке. В качестве а неограничивающего примера полинуклеотид по изобретению может содержать по меньшей мере один сайт связывания miR-142-3p, затравочную последовательность miR-142-3p, сайт связывания miR-142-3p без затравочной области, сайт связывания miR-142-5p, затравочную последовательность miR-142-5p, сайт связывания miR-142-5p без затравочной области, сайт связывания miR-146, затравочную последовательность miR-146 и/или сайт связывания miR-146 без затравочной последовательности.

[0321] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид согласно изобретению может содержать по меньшей мере один сайт связывания миРНК в 3'-НТО для селективной деградации терапевтических средств на основе мРНК в иммунных клетках, чтобы вызывать нежелательные иммуногенные реакции, вызванные доставкой терапевтических средств. В качестве неограничивающего примера сайт связывания миРНК может сделать полинуклеотид по изобретению более нестабильным в антигенпрезентирующих клетках. Неограничивающие примеры этих миРНК включают miR-142-5p, miR-142-3p, miR-146a-5p и miR-146-3p.

[0322] В одном варианте осуществления полинуклеотид по изобретению содержит по меньшей мере одну последовательность миРНК в области полинуклеотида, которая может взаимодействовать с РНК-связывающим белком.

[0323] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению (например, РНК, например, мРНК), содержащий (i) нуклеотидную последовательность с оптимизированной последовательностью (например, ОРС), кодирующую полипептид CFTR (например, последовательность дикого типа, его функциональный фрагмент или вариант) и (ii) сайт связывания миРНК (например, сайт связывания миРНК, который связывается с miR-142) и/или сайт связывания миРНК, который связывается с miR-126.

12. 3′-НТО

[0324] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по данному изобретению (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR по изобретению) дополнительно содержит 3'-НТО.

[0325] 3′-НТО представляет собой участок мРНК, который следует сразу за кодоном терминации трансляции и часто содержит регуляторные области, которые посттранскрипционно влияют на экспрессию гена. Регуляторные области в 3′-НТО могут влиять на полиаденилирование, эффективность трансляции, локализацию и стабильность мРНК. В одном варианте осуществления 3′-НТО, применимая в изобретении, включает сайт связывания для регуляторных белков или микроРНК.

[0326] В некоторых вариантах осуществления 3'-НТО, подходящая для полинуклеотидов по изобретению, содержит 3'-НТО, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29-36 или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления 3'-НТО, подходящая для полинуклеотидов по изобретению, содержит 3'-НТО SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления 3'-НТО, подходящая для полинуклеотидов по изобретению, содержит 3'-НТО, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-44 или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления 3'-НТО содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 36 и 44. В некоторых вариантах осуществления 3'-НТО содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления 3'-НТО содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах

осуществления 3'-НТО содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления 3'-НТО содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления 3'-НТО содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления 3'-НТО содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления 3'-НТО содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления 3'-НТО содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления 3′ НТО содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 44.

[0327] В некоторых вариантах осуществления последовательность 3'-НТО, применимая по изобретению, содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей 3'-НТО, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29-36, или любой их комбинации.

[0328] В некоторых вариантах осуществления последовательность 3'-НТО, применимая по изобретению, содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 45.

[0329] В некоторых вариантах осуществления последовательность 3'-НТО, применимая по изобретению, содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей 3'-НТО, выбранных из группы, состоящей SEQ ID NO: 37- 44, или любой их

комбинации.

13. Области, имеющие 5′-кэп

[0330] Данное изобретение также включает полинуклеотид, который содержит как 5'-кэп, так и полинуклеотид по данному изобретению (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR).

[0331] 5′-кэп-структура природной мРНК задействована в ядерном экспорте, повышая стабильность мРНК и связывает кэп-связывающий белок (CBP) мРНК, который отвечает за стабильность мРНК в клетке и способность к трансляции за счет ассоциации CBP с поли(A) связывающим белком с образованием зрелых циклических видов мРНК. Кэп также способствует удалению 5′-проксимальных интронов в ходе сплайсинга мРНК.

[0332] Эндогенные молекулы мРНК могут иметь кэп на 5′-конце, образуя 5′-ppp-5′-трифосфатную связь между концевым остатком гуанозинового кэпа и 5′-концевым транскрибируемым смысловым нуклеотидом молекулы мРНК. Затем этот 5′ гуанилатный кэп может быть метилирован с образованием остатка N7-метилгуанилата. Сахара рибозы концевых и/или предконцевых транскрибируемых нуклеотидов 5′-конца мРНК Рак необязательно также быть 2′-O-метилированными. 5′-декэпирование посредством гидролиза и расщепления структуры гуанилатного кэпа может нацеливаться на молекулу нуклеиновой кислоты, такую как молекула мРНК, для деградации.

[0333] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по данному изобретению (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR) включают фрагмент кэп.

[0334] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по данному изобретению (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR) содержат негидролизуемую структуру кэпа, предотвращающую декэпирование и, таким образом, увеличивающую время полужизни мРНК. Поскольку гидролиз кэп-структуры требует расщепления 5′-ppp-5′ фосфородиэфирных связей, модифицированные нуклеотиды можно использовать в ходе реакции кэпирования. Например, кэпирующий фермент вируса коровьей оспы от New England Biolabs (Ипсвич, штат Массачусетс), можно использовать с нуклеотидами α-тио-гуанозина в соответствии с инструкциями производителя для создания фосфоротиоатной связи в 5′-ppp-5′-

кэпе. Можно использовать дополнительные модифицированные гуанозиновые нуклеотиды, такие как α-метилфосфонатные и селенофосфатные нуклеотиды.

[0335] Дополнительные модификации включают, но не ограничиваются ими, 2'-O-метилирование сахаров рибозы 5'-концевых и/или 5'-предконцевых нуклеотидов полинуклеотида (как упомянуто выше) по 2'-гидроксильной группе сахарного кольца. Для создания 5′-кэпа молекулы нуклеиновой кислоты, такой как полинуклеотид, который функционирует как молекула мРНК, можно использовать несколько различных 5′-кэп-структур. Аналоги кэпа, которые в данном документе также называются синтетическими аналогами кэпа, химическими кэпами, аналогами химического кэпа или структурными или функциональными аналогами кэпа, отличаются от природных (*то есть* эндогенных, дикого типа или физиологических) 5′-кэпов по своей химической структуре при сохранении функцию кэпа. Аналоги кэпа могут быть химически (*то есть* неферментативно) или ферментативно синтезированы и/или связаны с полинуклеотидами по изобретению.

[0336] Например, антиинвертированный аналог кэпа (ARCA) содержит два гуанина, связанных 5′-5′-трифосфатной группой, где один гуанин содержит метильную группу N7, а также 3′-O-метильную группу (*то есть* N7,3′-O-диметилгуанозин-5′-трифосфат-5′-гуанозин (m^7G-3'mppp-G; который может быть эквивалентно обозначен 3′ O-Me-m7G(5′)ppp(5′)G). 3′-O атом другого немодифицированного гуанина становится связанным с 5′-концевым нуклеотидом кэпированного полинуклеотида. N7- и 3′-O-метилированный гуанин обеспечивает концевой фрагмент кэпированного полинуклеотида.

[0337] Другим примером кэпа является мКЭП, который подобен ARCA, но имеет 2′-O-метильную группу на гуанозине (*то есть* N7,2′-O-диметилгуанозин-5′-трифосфат-5′-гуанозин, m^7Gm-ppp-G).

[0338] Другим иллюстративным кэпом является m^7G-ppp-Gm-AG (*m.e.* N7, гуанозин-5'-трифосфат-2'-O-диметил-гуанозин-аденозин-гуанозин).

[0339] В некоторых вариантах осуществления кэп представляет собой аналог динуклеотидного кэпа. В качестве неограничивающего примера аналог динуклеотидного кэпа может быть модифицирован в различных положениях фосфата с помощью боранофосфатной группы или фосфоселеноатной группы, такой как аналоги динуклеотидного кэпа, описанные в патенте США № 8 519 110, содержание которого полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[0340] В другом варианте осуществления кэп представляет собой аналог кэпа, представляющий собой N7-(4-хлорфеноксиэтил)-замещенную динуклеотидную

форму аналога кэпа, известного в данной области техники и/или описанного в данном документе. Неограничивающие примеры N7-(4-хлорфеноксиэтил)-замещенной динуклеотидной формы аналога кэпа включают N7-(4-хлорфеноксиэтил)-G(5′)ppp(5′)G и N7-(4-хлорфеноксиэтил)-$m^{3'-O}$G(5′)ppp(5′)G (см., *например,* различные аналоги кэпа и способы синтеза аналогов кэпа, описанные в Kore et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2013 21:4570-4574; содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки). В другом варианте осуществления аналог кэпа по изобретению представляет собой аналог 4-хлор/бромфеноксиэтила.

[0341] Хотя аналоги кэпа допускают сопутствующее кэпирование полинуклеотида или его области, в реакции транскрипции *in vitro* до 20% транскриптов могут оставаться некэпированными. Это, а также структурные отличия аналога кэпа от эндогенных 5′-кэп-структур нуклеиновых кислот, продуцируемых эндогенным механизмом клеточной транскрипции, могут приводить к снижению трансляционной способности и снижению клеточной стабильности.

[0342] Полинуклеотиды по изобретению (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR) также могут быть кэпированы после производства (будь то IVT или химический синтез) с использованием ферментов для создания более аутентичных структур 5'-кэпа. В контексте данного документа фраза «более аутентичный» относится к признаку, который точно отражает или имитирует, структурно или функционально, признак эндогенного или дикого типа. То есть «более аутентичный» признак лучше отражает эндогенную, дикого типа, природную или физиологическую клеточную функцию и/или структуру по сравнению с синтетическими признаками или аналогами и т. д., известными из уровня техники, или который превосходит соответствующий эндогенный, дикого типа, природный или физиологический признак в одном или более отношениях. Неограничивающими примерами более аутентичных 5'кэп-структур согласно изобретению являются те, которые, среди прочего, обладают улучшенным связыванием белков, связывающих кэп, увеличенным периодом полужизни, сниженной восприимчивостью к 5′-эндонуклеазам и/или уменьшенным 5′-декэпированием по сравнению с синтетическими 5′-кэп-структурами, известными в данной области техники (или с 5′-кэп-структурами дикого типа, природными или физиологическими). Например, рекомбинантный кэпирующий фермент вируса коровьей оспы и рекомбинантный фермент 2′-О-метилтрансфераза, могут создавать каноническую 5′-5′-трифосфатную связь между 5′-концевым нуклеотидом

полинуклеотида и нуклеотидом гуанинового кэпа, где гуаниновый кэп содержит N7 метилирование, а 5′-концевой нуклеотид мРНК содержит 2′-О-метил. Такая структура называется структурой кэп 1. Этот кэп приводит к более высокой трансляционной способности и клеточной стабильности, а также к пониженной активации клеточных провоспалительных цитокинов по сравнению, *например,* с другими структурами аналога 5'-кэп, известными в данной области техники. Кэп-структуры включают, но не ограничиваются ими, 7mG(5′)ppp(5′)N,pN2p (кэп 0), 7mG(5′)ppp(5′)NlmpNp (кэп 1), и 7mG(5′)-ppp(5′)NlmpN2mp (кэп 2).

[0343] В качестве неограничивающего примера, кэпирование химерных полинуклеотидов после производства может быть более эффективным, поскольку практически 100% химерных нуклеиновых кислот могут быть кэпированы. В этом заключается отличие от ~80%, когда аналог кэпа связан с химерным полинуклеотидом в ходе реакции транскрипции *in vitro*.

[0344] Согласно настоящему изобретению 5′-концевые кэпы могут включать эндогенные кэпы или аналоги кэпов. Согласно настоящему изобретению 5′-концевой кэп может содержать аналог гуанина. Подходящие аналоги гуанина включают, но не ограничиваются ими, инозин, N1-метилгуанозин, 2′-фторгуанозин, 7-деазагуанозин, 8-оксогуанозин, 2-аминогуанозин, ЗНК-гуанозин и 2-азидогуанозин.

14. Поли(А)-хвосты

[0345] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по данному изобретению (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR) дополнительно содержат хвост поли-А. В дополнительных вариантах осуществления концевые группы поли(А)-хвоста могут быть включены для стабилизации. В других вариантах осуществления поли(А)-хвост содержит дез-3'-гидроксильные хвосты.

[0346] В ходе процессинга РНК длинная цепь адениновых нуклеотидов (поли(А)-хвост) может быть добавлена к полинуклеотиду, такому как молекула мРНК, для повышения стабильности. Сразу после транскрипции 3'-конец транскрипта может быть расщеплен для освобождения 3'-гидроксила. Затем поли(А)-полимераза добавляет к РНК цепь адениновых нуклеотидов. Процесс, называемый полиаденилированием, добавляет поли(А)-хвост, который может иметь длину, например, от приблизительно 80 до приблизительно 250 остатков, включая

приблизительно 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240 или 250 остатков. В одном варианте осуществления длина хвоста поли-А составляет 100 нуклеотидов (SEQ ID NO: 127).

[0347] Хвосты поли-А также могут быть добавлены после экспорта конструкции из ядра.

[0348] В соответствии с данным изобретением концевые группы на хвосте поли-А могут быть включены для стабилизации. Полинуклеотиды по данному изобретение могут включать дез-3'-гидроксильные хвосты. Они также могут включать структурные фрагменты или 2'-Ометильные модификации, как описано Junjie Li, et al. (Current Biology, Vol. 15, 1501–1507, August 23, 2005, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки).

[0349] Полинуклеотиды по данному изобретению могут быть сконструированы для кодирования транскриптов с альтернативными структурами хвостов поли-А, включая мРНК гистонов. Согласно Norbury, «концевое уридилирование также было обнаружено на мРНК гистонов человека, зависимых от репликации. Считается, что оборот этих мРНК важен для предотвращения потенциально токсичного накопления гистонов после завершения или ингибирования репликации хромосомной ДНК. Эти мРНК отличаются отсутствием 3′-поли(А)-хвоста, функцию которого вместо этого принимают на себя стабильная структура «петля-на-стебле» и родственный ей белок, связывающий «петлю-на-стебле» (SLBP); последний выполняет те же функции, что и PABP на полиаденилированных мРНК (Norbury, “Cytoplasmic RNA: a case of the tail wagging the dog,” Nature Reviews Molecular Cell Biology; AOP, опубликовано в Интернете 29 августа 2013 г.; doi:10.1038/nrm3645), содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0350] Уникальные длины поли(А)-хвоста обеспечивают определенные преимущества полинуклеотидам по настоящему изобретению. Как правило, длина поли(А)-хвоста, в случае его наличия, превышает 30 нуклеотидов. В другом варианте осуществления поли(А)-хвост имеет длину более 35 нуклеотидов (например, по меньшей мере или более около 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).

[0351] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид или его область включает от около 30 до около 3000 нуклеотидов (*например*, от 30 до 50, от 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

1000, от 50 до 1500, от 50 до 2000, от 50 до 2500, от 50 до 3000, от 100 до 500, от 100 до 750, от 100 до 1000, от 100 до 1500, от 100 до 2000, от 100 до 2500, от 100 до 3000, от 500 до 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).

[0352] В некоторых вариантах осуществления поли(А)-хвост сконструирован относительно длины всего полинуклеотида или длины конкретной области полинуклеотида. Этот дизайн может быть основан на длине кодирующей области, длине конкретного признака или области или может быть основан на длине конечного продукта, экспрессируемого из полинуклеотидов.

[0353] В этом контексте поли(А)-хвост может быть на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 % больше по длине, чем полинуклеотид или его элемент. Поли(А)-хвост может быть также сконструирован в качестве части полинуклеотида, которому он принадлежит. В этом контексте поли(А)-хвост может составлять 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90 % или более от общей длины конструкции, области конструкции или общей длины конструкции минус поли-А-хвост. Кроме того, сконструированные сайты связывания и конъюгация полинуклеотидов для связывающего поли(А) белка могут усиливать экспрессию.

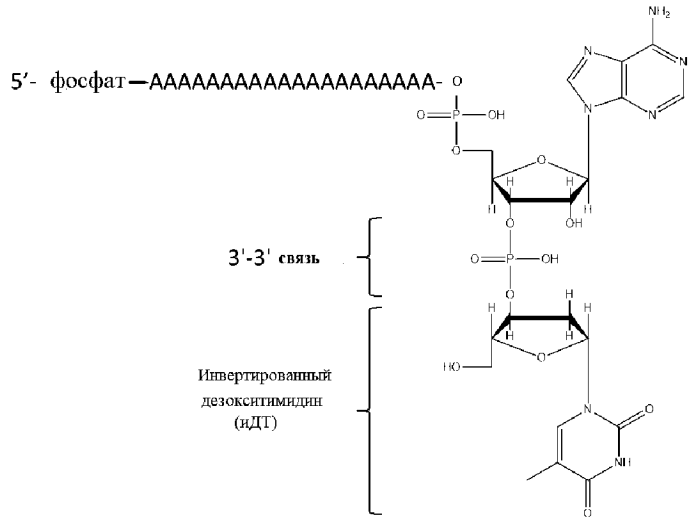
[0354] Кроме того, несколько различных полинуклеотидов могут быть связаны вместе через PABP (поли(А)-связывающий белок) через 3'-конец с использованием модифицированных нуклеотидов на 3'-конце поли(А)-хвоста. Эксперименты по трансфекции могут быть проведены в соответствующих клеточных линиях, а продукция белка может быть проанализирована с помощью ELISA через 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа и на 7-й день после трансфекции.

[0355] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по настоящему изобретению предназначены для включения области квартета поли-A-G. G-квартет представляет собой массив из четырех нуклеотидов гуанина с циклическими водородными связями, который может быть образован G-богатыми последовательностями как в ДНК, так и в РНК. В этом варианте осуществления G-квартет включен в конец поли(А)-хвоста. Полученный полинуклеотид анализируют на стабильность, продукцию белка и другие параметры, включая период полужизни, в различные моменты времени. Было обнаружено, что квартет полиA-G приводит к продукции белка из мРНК, эквивалентной, по меньшей мере, 75% от продукции, наблюдаемой при использовании одного хвоста поли-А из 120 нуклеотидов (SEQ ID

NO: 128).

[0356] В некоторых вариантах осуществления хвост поли-А содержит альтернативный нуклеозид, например инвертированный тимидин. Хвосты поли-А, содержащие альтернативный нуклеозид, например инвертированный тимидин, могут быть получены, как описано в данном документе (см. Пример 5 ниже). Например, конструкции мРНК можно модифицировать лигированием для стабилизации хвоста поли-А. Лигирование может быть выполнено с использованием 0,5-1,5 мг/мл мРНК (5' кэп 1, 3' А100), 50 мМ Трис-HCl pH 7,5, 10 мМ MgCl2, 1 мМ ТСЕР, 1000 единиц/мл Т4 РНК-лигазы 1, 1 мМ АТФ, 20% мас./об. полиэтиленгликоля 8000 и молярное соотношение модифицирующего олигонуклеотид к мРНК 5:1. Модифицирующий олигонуклеотид имеет последовательность 5'-фосфат-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-(инвертированный дезокситимидин (idT)) (SEQ ID NO: 212) (см. ниже). Реакции лигирования смешивают и инкубируют при комнатной температуре (~22°C) в течение, например, 4 часов. Стабильную мРНК, содержащую хвост, очищают, например, очисткой dT, очисткой с обращенной фазой, очисткой с помощью гидроксиапатита, ультрафильтрацией в воде и стерилизующей фильтрацией. Полученные стабильные мРНК, содержащие хвост, содержат следующую структуру на 3'-конце, начиная с области поли-А: A100-UCUAGAAAAAAAAAAAAAAAAAA-инвертированный дезокситимидин (SEQ ID NO: 211).

[0357] Модификация олигонуклеотида для стабилизации хвоста (5'-фосфат-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-(инвертированный дезокситимидин) (SEQ ID NO: 212)):



[0358] В некоторых случаях хвост поли-А содержит A100-UCUAG-A20-инвертированный дезокситимидин (SEQ ID NO: 211). В некоторых случаях хвост

поли-А состоит из А100-UCUAG-А20-инвертированного дезокситимидина (SEQ ID NO: 211).

15. Область старт-кодона

[0359] Изобретение также включает полинуклеотид, который содержит как область старт-кодона, так и полинуклеотид, описанный в данном документе (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по данному изобретению могут иметь области, которые аналогичны области старт-кодона или функционируют как область старт-кодона.

[0360] В некоторых вариантах осуществления трансляция полинуклеотида может инициироваться на кодоне, который не является старт-кодоном AUG. Трансляция полинуклеотида может инициироваться на альтернативном старт-кодоне, таком как, помимо прочего, ACG, AGG, AAG, CTG/CUG, GTG/GUG, ATA/AUA, ATT/AUU, TTG/UUG (см. Touriol et al. Biology of the Cell 95 (2003) 169-178 и Matsuda and Mauro PLoS ONE, 2010 5:11;содержание каждой из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки).

[0361] В качестве неограничивающего примера трансляция полинуклеотида начинается на альтернативном старт-кодоне ACG. В качестве другого неограничивающего примера трансляция полинуклеотида начинается на альтернативном старт-кодоне CTG или CUG. В качестве еще одного неограничивающего примера трансляция полинуклеотида начинается на альтернативном старт-кодоне GTG или GUG.

[0362] Известно, что нуклеотиды, фланкирующие кодон, который инициирует трансляцию, такой как, помимо прочего, старт-кодон или альтернативный старт-кодон, влияют на эффективность трансляции, длину и/или структуру полинуклеотида (*См., например,* Matsuda and Mauro PLoS ONE, 2010 5:11; содержание которого полностью включено в данный документ описание посредством ссылки). Маскирование любого из нуклеотидов, фланкирующих кодон, который инициирует трансляцию, можно использовать для изменения положения инициации трансляции, эффективности трансляции, длины и/или структуры полинуклеотида.

[0363] В некоторых вариантах осуществления маскирующий агент может

использоваться рядом со старт-кодоном или альтернативным старт-кодоном, чтобы замаскировать или скрыть кодон, чтобы уменьшить вероятность инициации трансляции в замаскированном старт-кодоне или альтернативном старт-кодоне. Неограничивающие примеры маскирующих агентов включают антисмысловые полинуклеотиды закрытых нуклеиновых кислот (ЗНК) и комплексы экзон-соединения (EJC) (см., *например,* Matsuda и Mauro, описывающие маскирующие агенты, полинуклеотиды ЗНК и EJC (PLoS ONE, 2010 5:11); содержание которого полностью включено в данный документ посредством ссылки).

[0364] В другом варианте осуществления маскирующий агент может быть использован для маскировки старт-кодона полинуклеотида, чтобы увеличить вероятность того, что трансляция будет инициирована на альтернативном старт-кодоне. В некоторых вариантах осуществления маскирующий агент может использоваться для маскировки первого старт-кодона или альтернативного старт-кодона, чтобы увеличить вероятность того, что трансляция будет инициирована на старт-кодоне или альтернативном старт-кодоне, расположенном ниже замаскированного старт-кодона или альтернативного старт-кодона.

[0365] В некоторых вариантах осуществления старт-кодон или альтернативный старт-кодон может находиться в идеальном комплементарном месте для сайта связывания миРНК. Идеальное комплементарное место связывания миРНК может помочь контролировать трансляцию, длину и/или структуру полинуклеотида, подобно маскирующему агенту. В качестве неограничивающего примера старт-кодон или альтернативный старт-кодон может быть расположен в середине идеального комплементарного места для сайта связывания миРНК. Старт-кодон или альтернативный старт-кодон может быть расположен после первого нуклеотида, второго нуклеотида, третьего нуклеотида, четвертого нуклеотида, пятого нуклеотида, шестого нуклеотида, седьмого нуклеотида, восьмого нуклеотида, девятого нуклеотида, десятого нуклеотида, одиннадцатого нуклеотида, двенадцатого нуклеотида, тринадцатого нуклеотида, четырнадцатого нуклеотида, пятнадцатого нуклеотида, шестнадцатого нуклеотида, семнадцатого нуклеотида, восемнадцатого нуклеотида, девятнадцатого нуклеотида, двадцатого нуклеотида или двадцать первого нуклеотида.

[0366] В другом варианте осуществления старт-кодон полинуклеотида может быть удален из последовательности полинуклеотида, чтобы трансляция полинуклеотида начиналась с кодона, который не является старт-кодоном. Трансляция полинуклеотида может начинаться на кодоне, следующем за удаленным старт-

кодоном, или на расположенном ниже старт-кодоне, или альтернативном старт-кодоне. В неограничивающем примере старт-кодон ATG или AUG удаляется как первые 3 нуклеотида последовательности полинуклеотида для того, чтобы инициировать трансляцию на расположенном ниже старт-кодоне или альтернативном старт-кодоне. Последовательность полинуклеотида, из которой был удален старт-кодон, может дополнительно содержать по меньшей мере один маскирующий агент для расположенного ниже старт-кодона и/или альтернативных стартовых кодонов с целью контроля или попытки контроля инициации трансляции, длины полинуклеотида и/или структуры полинуклеотида.

16. Область стоп-кодона

[0367] Изобретение также включает полинуклеотид, который содержит как область стоп-кодона, так и полинуклеотид, описанный в данном документе (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по данному изобретению могут включать по меньшей мере два стоп-кодона перед 3′-нетранслируемой областью (НТО). Стоп-кодон может быть выбран из TGA, TAA и TAG в случае ДНК или из UGA, UAA и UAG в случае РНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидов по настоящему изобретению включают стоп-кодон TGA в случае или ДНК, или стоп-кодон UGA в случае РНК, и один дополнительный стоп-кодон. В дополнительном варианте осуществления дополнительный стоп-кодон может представлять собой TAA или UAA. В другом варианте осуществления полинуклеотиды по данному изобретению включают три последовательных стоп-кодона, четыре стоп-кодона или более.

17. Полинуклеотид, содержащий мРНК, кодирующую полипептид CFTR

[0368] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по данному изобретению, например полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность мРНК, кодирующую полипептид CFTR, содержит от 5'-конца к 3'-концу:

(i) 5'-кэп, представленный выше;

(ii) 5'-НТО, такую как последовательности, представленные выше;

(iii) ОРС, кодирующую полипептид CFTR человека, при этом ОРС имеет по

меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID №: 142;

(iv) по меньшей мере один стоп-кодон;

(v) 3'-НТО, такую как последовательности, представленные выше; и

(vi) хвост поли-А, представленный выше.

[0369] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно содержит сайт связывания миРНК, например, сайт связывания миРНК, который связывает миРНК-142. В некоторых вариантах осуществления 5′-НТО содержит сайт связывания миРНК. В некоторых вариантах осуществления 3′-НТО содержит сайт связывания миРНК.

[0370] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по данному изобретению содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую последовательность полипептида по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86 %, по меньшей мере на 87 %, по меньшей мере на 88 %, по меньшей мере на 89 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 91 %, по меньшей мере на 92 %, по меньшей мере на 93 %, по меньшей мере на 94 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную белковой последовательности изоформы 1 CFTR человека дикого типа (SEQ ID NO: 1) или ее изоформы.

[0371] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по данному изобретению, например полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность мРНК, кодирующую полипептид, содержит (1) 5'-кэп, представленный выше, например, m^7G-ppp-Gm-AG, (2) 5'-НТО, (3) ОРС нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 142, (3) стоп-кодон, (4) 3'-НТО и (5) хвост поли-А, представленный выше, например, хвост поли-А A100-UCUAG-A20-инвертированного дезокситимидина (SEQ ID NO: 211).

[0372] Примеры нуклеотидных конструкций CFTR описаны ниже:

[0373] SEQ ID NO: 153 от 5'-конца к 3'-концу состоит из: 5'-НТО SEQ ID NO: 25, ОРС нуклеотидной последовательности CFTR SEQ ID NO: 142 и 3'-НТО SEQ ID NO: 45.

[0374] SEQ ID NO: 152 от 5'-конца к 3'-концу состоит из: 5′-НТО SEQ ID NO: 24, ОРС нуклеотидной последовательности CFTR SEQ ID NO: 142 и 3′-НТО SEQ ID

NO: 45.

[0375] В некоторых вариантах осуществления в конструкции с SEQ ID NO: 152 или 153 все урацилы заменены N1-метилпсевдоурацилом. В некоторых вариантах осуществления в конструкции с SEQ ID NO: 152 или 153 все урацилы заменены N1-метилпсевдоурацилом.

[0376] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по данному изобретению, например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность мРНК, кодирующую полипептид CFTR, содержит (1) 5'-кэп, представленный выше, например, m7G-ppp-Gm-AG, (2) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 152 или 153, и (3) хвост поли-A, представленный выше, например, хвост поли-A из ~100 остатков, например, A100-UCUAG-A20-инвертированного дезокситимидина (SEQ ID NO: 211). В некоторых вариантах осуществления в конструкциях с SEQ ID NO: 152 или 153 все урацилы заменены N1-метилпсевдоурацилом. В некоторых вариантах осуществления в конструкциях с SEQ ID NO: 152 или 153 все урацилы заменены 5-метоксиурацилом.

ТАБЛИЦА 5 – Модифицированные конструкции мРНК, включающие ОРС, кодирующие CFTR человека (каждая из конструкций №1 и №2 содержит 5'-концевой кэп m^7G-ppp-Gm-AG и 3'-концевую область поли-A)

Конструкция мРНК CFTR	**5′-НТО SEQ ID NO**	**ОРС CFTR**		**3' НТО, SEQ ID NO:**
		Название (Биохимическое)	**SEQ ID NO**	
№ 1(SEQ ID NO: 153)	25	CFTR-03 (G5)	142	45
№ 2(SEQ ID NO: 152)	24	CFTR-04 (G5)	142	45

18. Способы получения полинуклеотидов

[0377] В данном изобретении также предложены способы получения полинуклеотида по изобретению (например, полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR) или его комплемента.

[0378] В некоторых аспектах полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК),

описанный в данном документе и кодирующий полипептид CFTR, может быть сконструирован с использованием транскрипции *in vitro* (IVT). В других аспектах полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК), описанный в данном документе и кодирующий полипептид CFTR, может быть сконструирован путем химического синтеза с использованием синтезатора олигонуклеотидов.

[0379] В других аспектах полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК), описанный в данном документе и кодирующий полипептид CFTR, получают с использованием клетки-хозяина. В некоторых аспектах полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК), описанный в данном документе и кодирующий полипептид CFTR, получают с помощью одной или нескольких комбинаций IVT, химического синтеза, экспрессии в клетке-хозяине или любых других способов, известных в данной области техники.

[0380] Нуклеозиды природного происхождения, нуклеозиды неприродного происхождения или их комбинации могут полностью или частично заменять встречающиеся в природе нуклеозиды, присутствующие в последовательности потенциальных нуклеотидов, и могут быть включены в нуклеотидную последовательность с оптимизированной последовательностью (например, РНК, например, мРНК) кодирующий полипептид CFTR. Затем полученные полинуклеотиды, например, мРНК, можно исследовать на их способность продуцировать белок и/или оказывать терапевтическое воздействие.

a. Транскрипция in vitro / ферментативный синтез

[0381] Полинуклеотиды по данному изобретению, описанные в данном документе (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR), могут быть транскрибированы с использованием системы транскрипции *in vitro* (IVT). Система обычно включает буфер для транскрипции, нуклеотидтрифосфаты (NTP), ингибитор РНКазы и полимеразу. NTP могут быть выбраны из описанных в данном документе, помимо прочего, включая природные и неприродные (модифицированные) NTP. Полимераза может быть выбрана из, помимо прочего, РНК-полимеразы T7, РНК-полимеразы T3 и мутантных полимераз, таких как, помимо прочего, полимеразы, способные включать описанные в данном документе полинуклеотиды. См. публикацию США № US20130259923, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[0382] В синтезе полинуклеотидов по данному изобретению можно использовать

любое количество РНК-полимераз или их вариантов. РНК-полимеразы можно модифицировать, вставляя или удаляя аминокислоты из последовательности РНК-полимеразы. В качестве неограничивающего примера, РНК-полимераза может быть модифицирована для проявления повышенной способности включать 2'-модифицированный нуклеотидтрифосфат по сравнению с немодифицированной РНК-полимеразой (см. международную публикацию WO 2008078180 и патент США 8101385; содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки).

[0383] Варианты могут быть получены путем эволюции РНК-полимеразы, оптимизации последовательности аминокислот и/или нуклеиновых кислот РНК-полимеразы и/или использования других способов, известных в данной области техники. В качестве неограничивающего примера, варианты РНК-полимеразы T7 могут быть получены с использованием системы непрерывной направленной эволюции, изложенной в Esvelt et al. (Nature 472:499-503 (2011); полностью включенной в данный документ посредством ссылки), где клоны РНК-полимеразы T7 могут кодировать по меньшей мере одну мутацию, такую как, помимо прочего, лизин в положении 93, замененный треонином (K93T), I4M, A7T, E63V, V64D, A65E, D66Y, T76N, C125R, S128R, A136T, N165S, G175R, H176L, Y178H, F182L, L196F, G198V, D208Y, E222K, S228A, Q239R, T243N, G259D, M267I, G280C, H300R, D351A, A354S, E356D, L360P, A383V, Y385C, D388Y, S397R, M401T, N410S, K450R, P451T, G452V, E484A, H523L, H524N, G542V, E565K, K577E, K577M, N601S, S684Y, L699I, K713E, N748D, Q754R, E775K, A827V, D851N или L864F. В качестве еще одного неограничивающего примера варианты РНК-полимеразы T7 могут кодировать по меньшей мере мутацию, как описано в публикациях США № 20100120024 и 20070117112; включенный в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Варианты РНК-полимеразы также могут включать, помимо прочего, варианты с заменами, замены консервативными аминокислотами, варианты с инсерциями и/или варианты с делециями.

[0384] В одном аспекте полинуклеотид можно сконструировать таким образом, чтобы он распознавался РНК-полимеразами дикого типа или их вариантами. При этом полинуклеотид можно модифицировать, чтобы он содержал сайты или области изменений последовательности по сравнению с исходным химерным полинуклеотидом или химерным полинуклеотидом дикого типа.

[0385] Реакции синтеза полинуклеотидов или нуклеиновых кислот можно проводить ферментативными методами с использованием полимераз. Полимеразы

катализируют образование фосфодиэфирных связей между нуклеотидами в полинуклеотидной цепи или цепи нуклеиновой кислоты. Известные в настоящее время ДНК-полимеразы можно разделить на различные семейства на основе сравнения аминокислотных последовательностей и анализа кристаллической структуры. ДНК-полимераза I (pol I) или семейство A-полимеразы, включая фрагменты Klenow *E. coli*, ДНК-полимеразу I *Bacillus*, ДНК-полимеразы *Thermus aquaticus* (Taq) и РНК- и ДНК-полимеразы T7, является одним из наиболее изученных из этих семейств. Другим большим семейством является ДНК-полимераза α (pol α) или семейство B-полимеразы, включая все эукариотические реплицирующиеся ДНК-полимеразы и полимеразы из фагов T4 и RB69. Хотя они используют сходный каталитический механизм, эти семейства полимераз различаются субстратной специфичностью, эффективностью включения аналога субстрата, степенью и скоростью удлинения праймера, способом синтеза ДНК, экзонуклеазной активностью и чувствительностью к ингибиторам.

[0386] ДНК-полимеразы также выбирают на основе оптимальных условий реакции, которые им необходимы, таких как температура реакции, pH и концентрации матрицы и праймера. Иногда используют комбинацию более чем одной ДНК-полимеразы для достижения желаемого размера фрагмента ДНК и эффективности синтеза. Например, в Cheng et al. увеличивают pH, добавляют глицерин и диметилсульфоксид, уменьшают время денатурации, увеличивают время удлинения и используют вторичную термостабильную ДНК-полимеразу, которая обладает экзонуклеазной активностью от 3′ к 5′ для эффективной амплификации длинных мишеней из клонированных вставок и геномной ДНК человека. (Cheng et al., PNAS 91:5695-5699 (1994), содержание которого полностью включено в данный документ посредством ссылки). РНК-полимеразы бактериофагов T3, T7 и SP6 широко используют для получения РНК для биохимических и биофизических исследований. РНК-полимеразы, кэпирующие ферменты и поли-A-полимеразы описаны в одновременно находящейся на рассмотрении международной публикации № WO 2014/028429, содержание которой полностью включено в данное описание посредством ссылки.

[0387] В одном аспекте РНК-полимераза, которую можно использовать в синтезе полинуклеотидов по данному изобретению, представляет собой РНК-полимеразу Syn5 (см. Zhu et al. Nucleic Acids Research 2013, doi:10.1093/nar/gkt1193, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). РНК-полимераза Syn5 была недавно охарактеризована из морского цианофага Syn5 в Zhu et al., где

они также идентифицировали последовательность промотора (см. Zhu et al. Nucleic Acids Research 2013, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки). Zhu et al. обнаружили, что РНК-полимераза Syn5 катализирует синтез РНК в более широком диапазоне температур и солености по сравнению с РНК-полимеразой Т7. Кроме того, было обнаружено, что требование к инициирующему нуклеотиду на промоторе является менее строгим для РНК-полимеразы Syn5 по сравнению с РНК-полимеразой Т7, что делает РНК-полимеразу Syn5 перспективной для синтеза РНК.

[0388] В одном аспекте РНК-полимераза Syn5 может быть использована в синтезе полинуклеотидов, описанных в данном документе. В качестве неограничивающего примера можно использовать РНК-полимеразу Syn5 для синтеза полинуклеотида, требующего точного 3'-конца.

[0389] В одном аспекте в синтезе полинуклеотидов можно использовать промотор Syn5. В качестве неограничивающего примера промотор Syn5 может представлять собой 5'-ATTGGGCACCCGTAAGGG-3' (SEQ ID NO: 114, как описано Zhu et al. (Nucleic Acids Research 2013).

[0390] В одном аспекте РНК-полимераза Syn5 может быть использована для синтеза полинуклеотидов, содержащих по меньшей мере одну химическую модификацию, описанную в данном документе и/или известную в данной области техники (см., например, включение псевдо-UTP и 5Me-CTP, описанных Zhu et al. Nucleic Acids Research 2013).

[0391] В одном аспекте полинуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть синтезированы с использованием РНК-полимеразы Syn5, очищенной с использованием модифицированной и улучшенной процедуры очистки, описанной Zhu et al. (Nucleic Acids Research 2013).

[0392] Различные инструменты генной инженерии основаны на ферментативной амплификации целевого гена, который действует как матрица. Для изучения последовательностей отдельных генов или конкретных интересующих областей и других исследовательских нужд необходимо создать несколько копий целевого гена из небольшого образца полинуклеотидов или нуклеиновых кислот. Такие способы можно применять при производстве полинуклеотидов по изобретению. Например, полимеразная цепная реакция (ПЦР), амплификация со смещением цепи (SDA), амплификация на основе последовательности нуклеиновых кислот (NASBA), также называемая амплификация, опосредованная транскрипцией (TMA), и/или амплификация по методу катящегося круга (RCA) могут быть использованы в

изготовление одного или нескольких участков полинуклеотидов по данному изобретению. Сборка полинуклеотидов или нуклеиновых кислот с помощью лигазы также широко используется.

b. Химический синтез

[0393] Для синтеза выделенной полинуклеотидной последовательности, кодирующей интересующий выделенный полипептид, такой как полинуклеотид по изобретению (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR), можно применять стандартные способы. Например, может быть синтезирован один олигомер ДНК или РНК, содержащий кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность, кодирующую конкретный выделенный полипептид. В других аспектах можно синтезировать и затем лигировать несколько небольших олигонуклеотидов, кодирующих части желаемого полипептида. В некоторых аспектах отдельные олигонуклеотиды обычно содержат 5'- или 3'-липкие концы для комплементарной сборки.

[0394] Полинуклеотид, описанный в данном документе (например, РНК, например, мРНК), может быть химически синтезирован с использованием способов химического синтеза и потенциальных замен азотистых оснований, известных в данной области техники. См., например, международные публикации №№ WO 2014093924, WO 2013052523; WO 2013039857, WO 2012135805, WO 2013151671; публикацию США № US 20130115272; или патенты США №№ US 8999380 или US 8710200, все из которых полностью включены в данный документ посредством ссылки.

c. Очистка полинуклеотидов, кодирующих CFTR

[0395] Очистка полинуклеотидов, описанных в данном документе (например, полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR), может включать, помимо прочего, очистку полинуклеотида, обеспечение качества и контроль качества. Очистку можно проводить способами, известными в данной области техники, такими как, помимо прочего, гранулы AGENCOURT® (Beckman Coulter Genomics, Дэнверс, штат Массачусетс), гранулы поли-Т, субстраты захвата олиго-Т ЗНК ™ (EXIQON® Inc., Видбэк, Дания), или

способов очистки на основе ВЭЖХ, таких как, помимо прочего, ВЭЖХ для сильного катионного обмена, ВЭЖХ для слабого анионного обмена, обращенно-фазовая ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ) и ВЭЖХ гидрофобных взаимодействий (HIC-ВЭЖХ).

[0396] Термин «очищенный» при употреблении в отношении полинуклеотида, например, «очищенный полинуклеотид» относится к полинуклеотиду, отделенному от по меньшей мере одного загрязнителя. В контексте данного документа «загрязнитель» представляет собой любое вещество, которое делает другое вещество непригодным, неочищенным или низкокачественным. Таким образом, очищенный полинуклеотид (*например*, ДНК и РНК) присутствует в форме или состоянии, отличном от того, в котором он встречается в природе, или в форме или состоянии, отличном от того, которое существовало до того, как его подвергли обработке или способу очистки.

[0397] В некоторых вариантах осуществления очистка полинуклеотида по изобретению (например, полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR) удаляет примеси, которые могут ослабить или устранить нежелательный иммунный ответ, *например*, снижая активность цитокинов.

[0398] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR) перед введением очищают с помощью колоночной хроматографии (*например*, ВЭЖХ для сильного анионообмена, ВЭЖХ для слабого анионообмена, обращенно-фазовая ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ) и ВЭЖХ с гидрофобным взаимодействием (HIC-ВЭЖХ) или (ЖХМС)).

[0399] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR), очищенный с использованием колоночной хроматографии (*например*, ВЭЖХ для сильного анионообмена, ВЭЖХ для слабого анионообмена, обращено-фазой ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ, ВЭЖХ гидрофобных взаимодействий (HIC-ВЭЖХ) или (ЖХМС)), демонстрирует повышенную экспрессию кодируемого белка CFTR по сравнению с уровнем экспрессии, полученным с тем же полинуклеотидом по данному изобретению, очищенным другим методом очистки.

[0400] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, очищенный с помощью колоночной хроматографии (*например*, ВЭЖХ для сильного анионообмена, ВЭЖХ для слабого анионообмена, обращено-фазой ВЭЖХ (ОФ-

ВЭЖХ, ВЭЖХ гидрофобных взаимодействий (HIC-ВЭЖХ) или (ЖХМС))) содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR, содержащий одну или несколько точечных мутаций, известных в данной области техники.

[0401] В некоторых вариантах осуществления применение полинуклеотида, очищенного с помощью ОФ-ВЭЖХ, повышает уровни экспрессии белка CFTR в клетках при введении в эти клетки, *например*, на 10-100%, т.е. по меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 55%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65% , по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95% или по меньшей мере на около 100%, по отношению к уровням экспрессии белка CFTR в клетках до введения в клетки полинуклеотида, очищенного с помощью ОФ-ВЭЖХ, или после введения в клетки полинуклеотида, очищенного не с помощью ОФ-ВЭЖХ.

[0402] В некоторых вариантах осуществления применение полинуклеотида, очищенного с помощью ОФ-ВЭЖХ, повышает уровни экспрессии функционального белка CFTR в клетках при введении в эти клетки, *например*, на 10-100%, т.е. по меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 55%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65% , по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95% или по меньшей мере на около 100%, по отношению к уровням экспрессии белка CFTR в клетках до введения в клетки полинуклеотида, очищенного с помощью ОФ-ВЭЖХ, или после введения в клетки полинуклеотида, очищенного не с помощью ОФ-ВЭЖХ.

[0403] В некоторых вариантах осуществления применение полинуклеотида, очищенного с помощью ОФ-ВЭЖХ, увеличивает обнаруживаемую активность CFTR в клетках при введении в эти клетки, *например*, на 10-100%, т.е. по меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45%, по меньшей мере на около 50%, по

меньшей мере на около 55%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65% , по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95% или по меньшей мере на около 100%, по отношению к уровням активности функционального CFTR в клетках до введения в клетки полинуклеотида, очищенного с помощью ОФ-ВЭЖХ, или после введения в клетки полинуклеотида, очищенного не с помощью ОФ-ВЭЖХ.

[0404] В некоторых вариантах осуществления очищенный полинуклеотид имеет чистоту по меньшей мере около 80 %, чистоту по меньшей мере около 85 %, чистоту по меньшей мере около 90 %, чистоту по меньшей мере около 95 %, чистоту по меньшей мере около 96 %, чистоту по меньшей мере около 97 %, чистоту по меньшей мере около 98%, чистоту по меньшей мере около 99% или чистоту около 100%.

[0405] Проверка по обеспечению качества и/или контролю качества может проводиться с помощью способов, таких как, помимо прочего, гель-электрофорез, УФ-поглощение или аналитическая ВЭЖХ. В другом варианте осуществления полинуклеотид можно секвенировать способами, включая, помимо прочего, ПЦР с обратной транскриптазой.

d. Количественная оценка экспрессированных полинуклеотидов, кодирующих CFTR

[0406] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по данному изобретению (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR), продукты их экспрессии, а также продукты деградации и метаболиты можно количественно определить в соответствии со способами, известными в данной области техники.

[0407] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по данному изобретению могут быть количественно определены в экзосомах или получены из одной или нескольких биологических жидкостей. Используемый в данном документе термин «биологические жидкости» включают в себя периферическую кровь, сыворотку, плазму, асцит, мочу, спинномозговую жидкость (СМЖ), мокроту, слюну, костный мозг, синовиальную жидкость, водянистую влагу, амниотическую жидкость, ушную серу, грудное молоко, жидкость бронхоальвеолярного лаважа, сперму, секрет простаты, жидкость Каупера или предэякуляторную жидкость, пот, кал, волосы, слезы, жидкость кисты, плевральную и перитонеальную жидкость,

перикардиальную жидкость, лимфу, химус, хилус, желчь, интерстициальную жидкость, менструацию, гной, кожное сало, рвотные массы, вагинальные выделения, выделения слизистых оболочек, содержащуюся в стуле воду, поджелудочный сок, жидкость лаважа из носовых пазух, бронхолегочный аспират, жидкость бластоцеля и пуповинную кровь. Альтернативно, экзосомы могут быть получены из органа, выбранного из группы, состоящей из легкого, сердца, поджелудочной железы, желудка, кишечника, мочевого пузыря, почки, яичника, яичка, кожи, толстой кишки, молочной железы, предстательной железы, головного мозга, пищевода, печени и плаценты.

[0408] В способе количественного определения экзосом от субъекта получают образец объемом не более 2 мл, а экзосомы выделяют с помощью эксклюзионной хроматографии, центрифугирования в градиенте плотности, дифференциального центрифугирования, наномембранной ультрафильтрации, иммуноабсорбционного захвата, аффинной очистки, микрофлюидного разделения или их комбинации. В анализе уровень или концентрация полинуклеотида может быть уровнем экспрессии, присутствием, отсутствием, укорочением или изменением вводимой конструкции. Целесообразно коррелировать уровень с одним или несколькими клиническими фенотипами или с анализом биомаркера заболевания человека.

[0409] Анализ может быть выполнен с использованием зондов, специфических для конструкции, цитометрии, кРВ-ПЦР, ПЦР в реальном времени, ПЦР, проточной цитометрии, электрофореза, масс-спектрометрии или их комбинации, тогда как экзосомы могут быть выделены с помощью иммуногистохимических методов, таких как иммуноферментный анализ (ИФА). Экзосомы также могут быть выделены с помощью эксклюзионной хроматографии, центрифугирования в градиенте плотности, дифференциального центрифугирования, ультрафильтрации с использованием наномембраны, иммуноабсорбентного захвата, аффинной очистки, микрофлюидного разделения или их комбинаций.

[0410] Эти способы позволяют исследователю осуществлять в режиме реального времени мониторинг уровня оставшихся или доставленных полинуклеотидов. Это возможно, поскольку полинуклеотид по данному изобретению отличается от эндогенных форм вследствие структурных или химических модификаций.

[0411] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид может быть количественно определен с помощью способов, таких как, помимо прочего, спектроскопия в видимой и ультрафиолетовой областях спектра (УФ/вид.). Неограничивающим примером спектрометра УФ/вид. является спектрометр

NANODROP® (ThermoFisher, Уолтем, штат Массачусетс). Количественно определенный полинуклеотид можно проанализировать, чтобы определить, может ли полинуклеотид иметь надлежащий размер, проверить, не произошло ли деградации полинуклеотида. Разрушение полинуклеотида можно проверить с помощью способов, таких как, помимо прочего, электрофорез в агарозном геле, способов очистки на основе ВЭЖХ, таких как, помимо прочего, ВЭЖХ для сильного катионного обмена, ВЭЖХ для слабого анионного обмена, обращенно-фазовая ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ) и ВЭЖХ гидрофобных взаимодействий (HIC-ВЭЖХ), жидкостная хроматография-масс-спектрометрия (ЖХ-МС), капиллярный электрофорез (КЭ) и капиллярный гель-электрофорез (КГЭ).

19. Дополнительные молекулы полезной нагрузки

[0412] В дополнение к молекулам полезной нагрузки мРНК, подробно описанным выше, средства доставки ЛНЧ по изобретению можно использовать для доставки других молекул полезной нагрузки. Композиции по данному изобретению могут быть использованы для доставки широкого спектра различных агентов для лечения МВ в клетку дыхательных путей. Клетка дыхательных путей может быть клеткой, выстилающей дыхательные пути. Терапевтический агент способно опосредовать (например, непосредственно опосредовать или через эффект свидетеля) терапевтический эффект в такой клетке дыхательных путей. Обычно терапевтический агент, доставляемое композицией, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая увеличивает экспрессию полипептида CFTR, например, молекулу мРНК, как указано выше, хотя другие типы молекул, которые могут вызывать генетические изменения в клетках субъекта для улучшения экспрессии полипептид CFTR, также можно вводить с использованием рассматриваемых ЛНЧ.

[0413] Например, в одном варианте осуществления терапевтический агент представляет собой агент, который усиливает (т. е. повышает, стимулирует, активирует) экспрессию белка. Неограничивающие примеры типов терапевтических средств, которые можно применять для усиления экспрессии белка, включают РНК, мРНК, дцРНК, технологию CRISPR/Cas9, оцДНК и ДНК (например, векторы экспрессии).

[0414] В одном варианте осуществления терапевтический агент представляет собой терапевтический агент на основе ДНК. Молекула ДНК может представлять собой двухцепочечную ДНК, одноцепочечную ДНК (оцДНК) или молекулу, которая представляет собой частично двухцепочечную ДНК, т. е. имеет часть, которая является двухцепочечной, и часть, которая является одноцепочечной. В некоторых случаях молекула ДНК является трехцепочечной или частично трехцепочечной, т. е. имеет часть, которая является трехцепочечной, и часть, которая является двухцепочечной. Молекула ДНК может представлять собой кольцевую молекулу ДНК или линейную молекулу ДНК.

[0415] Терапевтический агент на основе ДНК может представлять собой молекулу ДНК, которая способна переносить ген в клетку, например, которая кодирует и может экспрессировать транскрипт. Например, терапевтический агент на основе ДНК может кодировать интересующий белок, чтобы тем самым увеличить экспрессию интересующего белка в дыхательных путях при доставке с помощью ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления молекула ДНК может быть природного происхождения, например, выделена из природного источника. В других вариантах осуществления молекула ДНК представляет собой синтетическую молекулу, например, синтетическую молекулу ДНК, полученную in vitro. В некоторых вариантах осуществления молекула ДНК представляет собой рекомбинантную молекулу. Неограничивающие иллюстративные терапевтические средства на основе ДНК включают плазмидные векторы экспрессии и вирусные векторы экспрессии.

[0416] Терапевтические средства на основе ДНК, описанные в данном документе, например, векторы ДНК, могут включать ряд различных характеристик. Терапевтические средства на основе ДНК, описанные в данном документе, например, вектор ДНК, может включать не кодирующую последовательность ДНК. Например, последовательность ДНК может включать по меньшей мере один регуляторный элемент для гена, например, промотор, энхансер, элемент терминации, сигнальный элемент полиаденилирования, сигнальный элемент сплайсинга и т.п. В некоторых вариантах осуществления некодирующая последовательность ДНК представляет собой интрон. В некоторых вариантах осуществления некодирующая последовательность ДНК представляет собой

транспозон. В некоторых вариантах осуществления последовательность ДНК, описанная в данном документе, может иметь некодирующую последовательность ДНК, которая функционально связана с геном, который транскрипционно активен. В других вариантах осуществления последовательность ДНК, описанная в данном документе, может иметь некодирующую последовательность ДНК, которая не связана с геном, т. е. некодирующая ДНК не регулирует ген на последовательности ДНК.

[0417] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка содержит генетический модулятор, т. е. по меньшей мере один компонент системы, которая модифицирует последовательность нуклеиновой кислоты в молекуле ДНК, *например*, путем изменения азотистого основания, *например*, введения вставки, делеции, мутации (*например*, миссенс-мутация, молчащая мутация или нонсенс-мутация), дупликации или инверсии, или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления генетический модулятор содержит редактор оснований ДНК, систему редактирования генов CRISPR/Cas, систему нуклеазы цинковых пальцев (ZFN), систему эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN), систему мегануклеазы или систему транспозазы, или любую их комбинацию.

[0418] В некоторых вариантах осуществления генетический модулятор содержит матрицу ДНК. В некоторых вариантах осуществления генетический модулятор не содержит матрицу ДНК. В некоторых вариантах осуществления генетический модулятор содержит матрицу РНК. В некоторых вариантах осуществления генетический модулятор не содержит матрицу РНК.

[0419] В некоторых вариантах осуществления генетический модулятор представляет собой систему редактирования генов CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов CRISPR/Cas содержит молекулу направляющей РНК (нРНК), содержащую нацеливающую последовательность, специфичную для последовательности целевого гена, и пептид, обладающий нуклеазной активностью, *например*, эндонуклеазной активностью, *например*, белок Cas или его фрагмент (*например*, биологически активный фрагмент) или его вариант, *например*, белок Cas9, его фрагмент (*например*, биологически активный фрагмент) или его вариант; белок Cas3, его фрагмент

(*например*, биологически активный фрагмент) или его вариант; белок Cas12a, его фрагмент (*например*, биологически активный фрагмент) или его вариант; белок Cas 12e, его фрагмент (*например*, биологически активный фрагмент) или его вариант; белок Cas 13, его фрагмент (*например*, биологически активный фрагмент) или его вариант; или белок Cas14, его фрагмент (*например*, биологически активный фрагмент) или его вариант.

[0420] В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов CRISPR/Cas содержит молекулу нРНК, содержащую нацеливающую последовательность, специфичную для последовательности целевого гена, и нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, обладающий нуклеазной активностью, *например*, эндонуклеазной активностью, *например*, белок Cas или его фрагмент (*например*, биологически активный фрагмент) или его вариант, *например*, белок Cas9, его фрагмент (*например*, биологически активный фрагмент) или его вариант; белок Cas3, его фрагмент (*например*, биологически активный фрагмент) или его вариант; белок Cas12a, его фрагмент (*например*, биологически активный фрагмент) или его вариант; белок Cas12e, его фрагмент (*например*, биологически активный фрагмент) или его вариант; белок Cas13, его фрагмент (*например*, биологически активный фрагмент) или его вариант; или белок Cas14, его фрагмент (*например*, биологически активный фрагмент) или его вариант.

[0421] В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов CRISPR/Cas содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу нРНК, содержащую нацеливающую последовательность, специфичную для последовательности целевого гена, и белок Cas9, его фрагмент (*например*, биологически активный фрагмент) или его вариант.

[0422] В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов CRISPR/Cas содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу нРНК, содержащую нацеливающую последовательность, специфичную для последовательности целевого гена, и нуклеиновую кислоту, кодирующую белок Cas9, его фрагмент (*например*, биологически активный фрагмент) или его вариант.

[0423] В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов CRISPR/Cas дополнительно содержит матрицу ДНК. В некоторых вариантах

осуществления система редактирования генов CRISPR/Cas дополнительно содержит матрицу РНК. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов CRISPR/Cas дополнительно содержит обратную транскриптазу.

[0424] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, композиций или клеток, описанных в данном документе, генетический модулятор представляет собой систему нуклеазы цинковых пальцев (ZFN). В некоторых вариантах осуществления система ZFN содержит пептид, имеющий: ДНК-связывающий домен цинкового пальца, его фрагмент (*например*, биологически активный фрагмент) или его вариант; и/или активность нуклеазы, *например*, активность эндонуклеазы. В некоторых вариантах осуществления система ZFN содержит пептид, имеющий ДНК-связывающий домен Zn-пальца. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен цинковых пальцев содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более цинковых пальцев. В некоторых вариантах осуществления система ZFN содержит пептид, обладающий нуклеазной активностью, *например*, эндонуклеазной активностью. В некоторых вариантах осуществления пептид, обладающий нуклеазной активностью, представляет собой рестрикционная 1-подобная эндонуклеаза II типа, *например*, эндонуклеазу FokI. В некоторых вариантах осуществления система ZFN содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, имеющий: ДНК-связывающий домен цинкового пальца, его фрагмент (*например*, биологически активный фрагмент) или его вариант; и/или активность нуклеазы, *например*, активность эндонуклеазы.

[0425] В некоторых вариантах осуществления система ZFN содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, имеющий ДНК-связывающий домен Zn-пальца. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен цинковых пальцев содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более цинковых пальцев. В некоторых вариантах осуществления система ZFN содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, обладающий нуклеазной активностью, *например*, эндонуклеазной активностью. В некоторых вариантах осуществления пептид, обладающий нуклеазной активностью, представляет собой рестрикционная 1-подобная эндонуклеаза II типа, *например*, эндонуклеазу FokI.

[0426] В некоторых вариантах осуществления система дополнительно содержит матрицу, *например*, матрицу ДНК.

[0427] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, композиций или клеток, описанных в данном документе, генетический модулятор представляет собой систему эффекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции (TALEN). В некоторых вариантах осуществления система содержит пептид, имеющий: эффекторный ДНК-связывающий домен, подобный активатору транскрипции (TAL), его фрагмент (*например*, биологически активный фрагмент) или его вариант; и/или активность нуклеазы, *например*, активность эндонуклеазы. В некоторых вариантах осуществления система содержит пептид, содержащий эффекторный ДНК-связывающий домен TAL, его фрагмент (*например*, биологически активный фрагмент) или его вариант. В некоторых вариантах осуществления система содержит пептид, обладающий нуклеазной активностью, , *например*, эндонуклеазной активностью. В некоторых вариантах осуществления пептид, обладающий нуклеазной активностью, представляет собой рестрикционная 1-подобная эндонуклеаза II типа, *например*, эндонуклеазу FokI.

[0428] В некоторых вариантах осуществления система содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, имеющий: эффекторный ДНК-связывающий домен, подобный активатору транскрипции (TAL), его фрагмент (*например*, биологически активный фрагмент) или его вариант; и/или активность нуклеазы, *например*, активность эндонуклеазы. В некоторых вариантах осуществления система содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, содержащий эффекторный ДНК-связывающий домен, подобный активатору транскрипции (TAL), его фрагмент (*например*, биологически активный фрагмент) или его вариант. В некоторых вариантах осуществления система содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, обладающий нуклеазной активностью, , *например*, эндонуклеазной активностью. В некоторых вариантах осуществления пептид, обладающий нуклеазной активностью, представляет собой рестрикционная 1-подобная эндонуклеаза II типа, *например*, эндонуклеазу FokI.

[0429] В некоторых вариантах осуществления система дополнительно содержит матрицу, *например*, а матрицу ДНК.

[0430] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, композиций или клеток, описанных в данном документе, генетический модулятор представляет

собой систему мегануклеазы. В некоторых вариантах осуществления система мегануклеазы содержит пептид, имеющий ДНК-связывающий домен и нуклеазную активность, *например*, эндонуклеазу хоуминга. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза хоуминга содержит эндонуклеазу LAGLIDADG, эндонуклеазу GIY-YIG, эндонуклеазу HNH, эндонуклеазу His-Cys box или эндонуклеазу PD-(D/E)XK, или их фрагмент (*например*, биологически активный фрагмент) или вариант, *например*, как описано в Silva G. et al, (2011) Curr Gene Therapy 11(1): 11-27.

[0431] В некоторых вариантах осуществления система мегануклеазы содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, имеющий ДНК-связывающий домен и нуклеазную активность, *например*, эндонуклеазу хоуминга. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза хоуминга содержит эндонуклеазу LAGLIDADG, эндонуклеазу GIY-YIG, эндонуклеазу HNH, эндонуклеазу His-Cys box или эндонуклеазу PD-(D/E)XK, или их фрагмент (*например*, биологически активный фрагмент) или вариант, *например*, как описано в Silva G. et al, (2011) Curr Gene Therapy 11(1): 11-27.

[0432] В некоторых вариантах осуществления система дополнительно содержит матрицу, *например*, а матрицу ДНК.

[0433] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, композиций или клеток, описанных в данном документе, генетический модулятор представляет собой систему транспозазы. В некоторых вариантах осуществления система транспозазы содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пептид, обладающий активностью обратной транскриптазв и/или нуклеазы, *например*, ретротранспозон, *например*, LTR-ретротранспозон или не-LTR-ретротранспозон. В некоторых вариантах осуществления система транспозазы содержит матрицу, *например*, матрицу РНК.

[0434] В одном варианте осуществления терапевтический агент представляет собой терапевтический агент на основе РНК. Молекула РНК может быть одноцепочечной РНК, двухцепочечной РНК (дцРНК) или молекулой, которая представляет собой частично двухцепочечную РНК, т.е. имеет часть, которая является двухцепочечной, и часть, которая является одноцепочечной. Молекула РНК может быть кольцевой

молекулой РНК или линейной молекулой РНК.

[0435] Терапевтический агент на основе РНК может представлять собой терапевтический агент на основе РНК, которое способно переносить ген в клетку, например, кодирующий интересующий белок, чтобы таким образом повысить экспрессию интересующего белка в клетке дыхательных путей. В некоторых вариантах осуществления молекула РНК может быть природного происхождения, например, выделена из природного источника. В других вариантах осуществления молекула РНК представляет собой синтетическую молекулу, например, синтетическую молекулу РНК, полученную in vitro.

[0436] Неограничивающие примеры терапевтических агентов на основе РНК включают матричные РНК (мРНК) (например, кодирующие интересующий белок), модифицированные мРНК (ммРНК), мРНК, которые включают сайт(ы) связывания микро-РНК (сайт(ы) связывания miR), модифицированные РНК, содержащие функциональные элементы РНК, микроРНК (миРНК), антагомиры, малые (короткие) интерферирующие РНК (миРНК) (в том числе шортмеры и дайсер-субстратные РНК), молекулы РНК-интерференции (РНКи), антисмысловые РНК, рибозимы, короткие шпилечные РНК (кшРНК), закрытые нуклеиновые кислоты (ЗНК) и кодирующие компоненты технологии CRISPR/Cas9, каждая из которых подробно описана в подразделах ниже. В некоторых вариантах осуществления модулятор РНК содержит систему редактирования оснований РНК. В некоторых вариантах осуществления система редактирования оснований РНК содержит: дезаминазу, *например*, РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR); белок Cas, его фрагмент (*например*, биологически активный фрагмент) или вариант; и/или направляющую РНК. В некоторых вариантах осуществления система редактирования оснований РНК дополнительно содержит матрицу, *например*, матрицу ДНК или РНК. Типичные молекулы мРНК для применения при лечении МВ подробно описаны выше.

20. Фармацевтические композиции и составы

[0437] В данном изобретении предложены фармацевтические композиции и составы, которые содержат любую из полезных нагрузок, изложенных в данном

документе, например, любой из полинуклеотидов, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления композиция или состав дополнительно содержит средство доставки.

[0438] В некоторых вариантах осуществления композиция или состав могут содержать полезную нагрузку, например, полинуклеотид, содержащий описанную в данном документе последовательность нуклеиновой кислоты с оптимизированной последовательностью, которая кодирует полипептид CFTR. В некоторых вариантах осуществления композиция или состав могут содержать полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК), содержащий полинуклеотид (например, ОРС), обладающий значительной идентичностью последовательности с оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе, которая кодирует полипептид CFTR. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно содержит сайт связывания миРНК, например, сайт связывания миРНК, который связывает miR-126, miR-142, miR-144, miR-146, miR-150, miR-155, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24, miR-27 и miR-26a.

[0439] Фармацевтические композиции или составы могут необязательно содержать одно или несколько дополнительных активных веществ, *например*, терапевтически и/или профилактически активные вещества. Фармацевтические композиции или препараты по данному изобретению могут быть стерильными и/или апирогенными. Общие подходы по составлению и/или изготовлению фармацевтических агентов, можно найти, например, в публикации *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005 (включенной в данный документ посредством ссылки в полном объеме). В некоторых вариантах осуществления композиции вводят людям, пациентам-людям или субъектам-людям. Для целей данного описания фраза «активный ингредиент» обычно относится к полинуклеотидам, которые должны быть доставлены, как описано в данном документе.

[0440] Составы и фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть получены любым способом, известным или разработанным в дальнейшем в области фармакологии. В целом, такие способы приготовления могут включать этап объединения активного ингредиента с эксципиентом или одним и/или более другими вспомогательными ингредиентами, а затем, при необходимости, и/или желательно, разделения, формования и/или упаковку продукта в желаемую емкость однократной или многократной дозы.

[0441] Фармацевтическую композицию или состав по изобретению можно

получать, упаковывать и/или реализовывать большими партиями, в виде стандартной единичной дозы и/или в виде множества стандартных единичных доз. Используемый в данном документе термин «единичная доза» относится к дискретному количеству фармацевтической композиции, содержащему заданное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента обычно равно дозировке активного ингредиента, который вводится субъекту и/или удобной фракции такой дозы, такой как, например, половина или треть такой дозы.

[0442] Относительные количества активного ингредиента, фармацевтически приемлемого наполнителя и/или любых дополнительных ингредиентов в фармацевтической композиции в соответствии с данным изобретением могут варьироваться в зависимости от индивидуальных особенностей, телосложения и/или состояния субъекта, которого лечат, и, кроме того, в зависимости от пути введения композиции.

[0443] В некоторых вариантах осуществления композиции и составы, описанные в данном документе, могут содержать по меньшей мере один полинуклеотид по изобретению. В качестве неограничивающего примера композиция или состав могут содержать 1, 2, 3, 4 или 5 полинуклеотидов по изобретению. В некоторых вариантах осуществления композиции или составы, описанные в данном документе, могут содержать более одного типа полинуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления композиция или состав могут содержать полинуклеотид в линейной или кольцевой форме. В другом варианте осуществления композиция или состав может содержать кольцевой полинуклеотид и полинуклеотид, транскрибируемый in vitro (IVT). В еще одном варианте осуществления композиция или состав может содержать полинуклеотид IVT, химерный полинуклеотид и кольцевой полинуклеотид.

[0444] Хотя описания фармацевтических композиций и составов, предложенных в данном документе, в основном направлены на фармацевтические композиции и составы, которые подходят для введения людям, специалисту в данной области техники должно быть понятно, что такие композиции обычно подходят для введения любому другому животному, *например,* животным, отличным от человека, *например*, млекопитающему, отличному от человека.

[0445] В данном изобретении предложены фармацевтические препараты, которые содержат описанный в данном документе полинуклеотид (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR). Полинуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть

составлены с использованием одного или нескольких наполнителей для: (1) повышения стабильности; (2) увеличения трансфекции клеток; (3) обеспечения пролонгированного или отсроченного высвобождения (*например,* из состава депо полинуклеотида); (4) изменения биораспределения (*например,* нацеливания полинуклеотида на определенные ткани или типы клеток); (5) увеличения трансляции кодируемого белка *in vivo*; и/или (6) изменения профиля высвобождения кодируемого белка *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав дополнительно содержит средство доставки, содержащее ЛНЧ-01. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав дополнительно содержит средство доставки, содержащее ЛНЧ-02. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав дополнительно содержит средство доставки, содержащее ЛНЧ-03, ЛНЧ-04, ЛНЧ-05 или ЛНЧ-06. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав дополнительно содержит средство доставки, содержащее, например, соединение формулы (I), например, любое из Соединений 1-232, например, Соединение II; соединение формулы (III), (IV), (V) или (VI), например, любое из Соединений 233-342, например, Соединение VI; или соединение формулы (VIII), например, любое из Соединений 419-428, например, Соединение I, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 50:10:38,5:1,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 47,5:10,5:39,0:3,0. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 50:10:38,5:1,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 47,5:10,5:39,0:3,0.

[0446] Фармацевтически приемлемый вспомогательные вещества, применяемые в настоящем изобретении, включают, помимо прочего, любые и все растворители, дисперсионные среды или другие жидкие носители, дисперсионные или суспензионные добавки, разбавители, гранулирующие и/или диспергирующие вещества, поверхностно-активные вещества, изотонические вещества, загустители или эмульгирующие вещества, консерванты, связующие вещества, смазывающие вещества или масла, красители, подсластители или ароматизаторы, стабилизаторы,

антиоксиданты, противомикробные или противогрибковые вещества, вещества, регулирующие осмоляльность, вещества, регулирующие pH, буферы, хелатирующие вещества, криопротекторы и/или объемообразующие вещества, которые подходят для конкретной желаемой лекарственной формы. В данной области известны различные вспомогательные вещества для составления фармацевтических композиций и методы получения композиции (см. публикацию Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006; которая полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0447] Примеры разбавителей включают, помимо прочего, карбонат кальция или натрия, фосфат кальция, гидрофосфат кальция, фосфат натрия, лактозу, сахарозу, целлюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, каолин, маннит, сорбит и т.д. и/или их комбинации.

[0448] Типичные гранулирующие и/или диспергирующие агенты включают, помимо прочего, крахмалы, прежелатинизированные крахмалы или микрокристаллический крахмал, альгиновую кислоту, гуаровую камедь, агар, поли(винилпирролидон), (провидон), перекрестно-сшитый поли(винилпирролидон) (кросповидон), целлюлозу, метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, перекрестно-сшитую карбоксиметилцеллюлозу натрия (кроскармеллозу), алюмосиликат магния (VEEGUM®), лаурилсульфат натрия и т.д. и/или их комбинации.

[0449] Примеры поверхностно-активных веществ и/или эмульгаторов включают, помимо прочего, натуральные эмульгаторы (например, аравийскую камедь, агар, альгиновую кислоту, альгинат натрия, трагакант, хондракс, холестерин, ксантан, пектин, желатин, яичный желток, казеин, шерстяной жир, холестерин, воск и лецитин), сложные эфиры сорбитана и жирных кислот (например, полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат [TWEEN®80], сорбитанмонопальмитат [SPAN®40], глицерилмоноолеат, сложные эфиры полиоксиэтилена, сложные эфиры полиэтиленгликоля и жирных кислот (например, CREMOPHOR®), простые эфиры полиоксиэтилена (например, лауриловый эфир полиоксиэтилена [BRIJ®30]), PLUORINC®F 68, POLOXAMER®188 и т. д. и/или их комбинации.

[0450] Примеры связующих агентов включают, помимо прочего, крахмал, желатин, сахара (например, сахарозу, глюкозу, декстрозу, декстрин, патоку, лактозу, лактит, маннит), аминокислоты (например, глицин), натуральные и синтетические камеди (например, гуммиарабик, альгинат натрия), этилцеллюлозу,

гидроксиэтилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу и т.д., и их комбинации.

[0451] Окисление является потенциальным путем деградации мРНК, особенно для жидких составов мРНК. Для предотвращения окисления в составы могут быть добавлены антиоксиданты. Примеры антиоксидантов включают, помимо прочего, альфа-токоферол, аскорбиновую кислоту, аскорбилпальмитат, бензиловый спирт, бутилированный гидроксианизол, m-крезол, метионин, бутилированный гидрокситолуол, монотиоглицерин, метабисульфит натрия или калия, пропионовую кислоту, пропилгаллат, аскорбат натрия и т.д., и их комбинации.

[0452] Типичные хелатирующие агенты включают, помимо прочего, этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), моногидрат лимонной кислоты, динатрийэдетат, фумаровую кислоту, яблочную кислоту, фосфорную кислоту, эдетат натрия, винную кислоту, тринатрийэдетат и т.д., и их комбинации.

[0453] Примеры противомикробных или противогрибковых агентов включают, помимо прочего, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, метилпарабен, этилпарабен, пропилпарабен, бутилпарабен, бензойную кислоту, гидроксибензойную кислоту, бензоат калия или натрия, сорбат калия или натрия, пропионат натрия, сорбиновая кислота и т.д., и их комбинации.

[0454] Примеры консервантов включают, помимо прочего, витамин А, витамин С, витамин Е, бета-каротин, лимонную кислоту, аскорбиновую кислоту, бутилированный гидроксианизол, этилендиамин, лаурилсульфат натрия (SLS), лаурилэфирсульфат натрия (SLES) и т. д., и их комбинации.

[0455] В некоторых вариантах осуществления pH растворов полинуклеотидов поддерживают между pH 5 и pH 8 для улучшения стабильности. Примеры буферов для регулирования pH могут включать, помимо прочего, фосфат натрия, цитрат натрия, сукцинат натрия, гистидин (или гистидин-HCl), малат натрия, карбонат натрия и т.д., и/или их комбинации.

[0456] Примеры смазывающих агентов включают, помимо прочего, стеарат магния, стеарат кальция, стеариновую кислоту, диоксид кремния, тальк, солод, гидрогенизированные растительные масла, полиэтиленгликоль, бензоат натрия, лаурилсульфат натрия или магния и т.д., и их комбинации.

[0457] Фармацевтическая композиция или состав, описанные в данном документе, могут содержать криопротектор для стабилизации описанного в данном документе полинуклеотида во время замораживания. Примеры криопротекторов включают, помимо прочего, маннит, сахарозу, трегалозу, лактозу, глицерин, декстрозу и т.д., и их комбинации.

[0458] Фармацевтическая композиция или состав, описанные в данном документе, могут содержать наполнитель в лиофилизированных полинуклеотидных композициях для получения «фармацевтически оптимальной» лепешки, стабилизации лиофилизированных полинуклеотиды при длительном (например, 36 месяцев) хранении. Типичные наполнители по данному изобретению могут включать, помимо прочего, сахарозу, трегалозу, маннит, глицин, лактозу, раффинозу и их комбинации.

[0459] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция или состав дополнительно содержит средство доставки. Средство доставки по данному изобретению может включать, без ограничений, липосомы, липидные наночастицы, липоиды, полимеры, липоплексы, микровезикулы, экзосомы, пептиды, белки, клетки, трансфицированные полинуклеотидами, гиалуронидазу, имитаторы наночастиц, нанотрубки, конъюгаты и их комбинации.

21. Средства доставки

a. Липидное соединение

[0460] Данное раскрытие обеспечивает фармацевтические композиции с предпочтительными свойствами. Липидные композиции, описанные в данном документе липиды могут преимущественно использоваться в композициях липидных наночастиц для доставки терапевтических и/или профилактических агентов, например, мРНК, в клетки или органы млекопитающих. Например, липиды, описанные в данном документе, имеют небольшую иммуногенность или не имеют ее вообще. Например, описанные в данном документе липидные соединения обладают более низкой иммуногенностью по сравнению с эталонным липидом (*например*, MC3, KC2 или DLinDMA). Например, состав, содержащий описанный в данном документе липид и терапевтический или профилактический агент, например, мРНК, имеет повышенный терапевтический индекс по сравнению с соответствующей композицией, которая содержит эталонный липид (*например*, MC3, KC2 или DLinDMA) и такой же терапевтический или профилактический агент.

[0461] В определенных вариантах осуществления, в данной заявке предложены фармацевтические композиции, содержащие:

(a) полезную нагрузку для лечения MB, например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR; и

(b) средство доставки.

Составы липидных наночастиц

[0462] В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства по изобретению (например, полезные нагрузки для лечения МВ, такие как мРНК CFTR) составляют в виде липидных наночастиц (ЛНЧ). Липидные наночастицы обычно содержат ионизируемый липид, некатионный липид, стерин и ПЭГ-липидные компоненты вместе с представляющим интерес переносимым материалом нуклеиновой кислоты. Липидные наночастицы по изобретению могут быть получены с помощью компонентов, композиций и способов, как общеизвестно в данной области техники, см. например PCT/US2016/052352; PCT/US2016/068300; PCT/US2017/037551; PCT/US2015/027400; PCT/US2016/047406; PCT/US2016000129; PCT/US2016/014280; PCT/US2016/014280; PCT/US2017/038426; PCT/US2014/027077; PCT/US2014/055394; PCT/US2016/52117; PCT/US2012/069610; PCT/US2017/027492; PCT/US2016/059575 и PCT/US2016/069491, полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки.

[0463] Полезные нагрузки для лечения МВ по данному изобретению (например, мРНК CFTR) обычно составляют в виде липидных наночастиц. В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица содержит по меньшей мере один ионизируемый катионный липид, по меньшей мере один некатионный липид, по меньшей мере один стерин и/или по меньшей мере один липид, модифицированный полиэтиленгликолем (ПЭГ).

[0464] В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица имеет молярное соотношение 20-60% ионизируемого катионного липида. Например, липидная наночастица может иметь молярное соотношение 20-50 %, 20-40 %, 20-30 %, 30-60 %, 30-50 %, 30-40 %, 40-60 %, 40-50 % или 50-60 % ионизируемого катионного липида. В некоторых аспектах липидная наночастица имеет молярное соотношение около 20 %, 30 %, 40 %, 50 или 60 % ионизируемого катионного липида.

[0465] В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица имеет молярное соотношение 5-25% некатионного липида. Например, липидная наночастица может иметь молярное соотношение 5-20%, 5-15%, 5-10%, 10-25%, 10-20%, 10-25%, 15-25%, 15-20% или 20-25% некатионного липида. В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица имеет молярное соотношение 5%,

10%, 15%, 20% или 25% некатионного липида.

[0466] В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица имеет молярное соотношение 25-55 % стерина. Например, липидная наночастица может иметь молярное соотношение 25-50 %, 25-45 %, 25-40 %, 25-35 %, 25-30 %, 30-55 %, 30-50 %, 30-45 %, 30-40 %, 30-35 %, 35-55 %, 35-50 %, 35-45 %, 35-40 %, 40-55 %, 40-50 %, 40-45 %, 45-55 %, 45-50 % или 50-55 % стерина. В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица имеет молярное соотношение 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 % или 55 % стерина.

[0467] В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица содержит молярное соотношение 0,5-15% ПЭГ-модифицированного липида. Например, липидная наночастица может иметь молярное соотношение 0,5-10%, 0,5-5%, 1-15%, 1-10%, 1-5%, 2-15%, 2-10%, 2-5%, 5-15%, 5-10% или 10-15%. В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица имеет молярное соотношение 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% или 15% ПЭГ-модифицированного липида.

[0468] В некоторых вариантах осуществления ядро липидной наночастицы содержит молярное соотношение 20-60 % ионизируемого аминолипида, 5-25 % некатионного липида, 25-55 % стерина и 0,5-15 % ПЭГ-модифицированного липида. В некоторых вариантах осуществления ядро липидной наночастицы содержит молярное соотношение 40–60 % ионизируемого катионного липида, 5–15 % некатионного липида, 30–50 % стерина и 0,5–10 % ПЭГ-модифицированного липида. В некоторых вариантах осуществления ядро липидной наночастицы содержит молярное соотношение 45-55% ионизируемого катионного липида, 7,5-12,5% некатионного липида, 35-45% стерола и 0,5-5% модифицированного ПЭГ-липида.

Катионный агент

[0469] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ, предложенный в данном документе, содержит ядро липидной наночастицы, полезную нагрузку, например, полинуклеотид по изобретению (например, мРНК CFTR), инкапсулированный в ядро для доставки в клетку, и катионный агент, расположенный преимущественно на внешней поверхности ядра. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, ЛНЧ с катионным агентом, расположенным преимущественно на внешней поверхности ядра, может улучшать накопление ЛНЧ в клетках, таких как бронхиальный эпителий человека (HBE), а также улучшать функцию

полинуклеотида, например, при измерении экспрессии мРНК в клетках, например эпителиальных клетках дыхательных путей.

[0470] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена наночастица, содержащая:

(a) ядро липидной наночастицы,

(b) полезную нагрузку для лечения МВ, например, полинуклеотид (например, мРНК CFTR), и

(c) катионный агент, расположенный преимущественно на наружной поверхности ядра,

причем наночастица имеет более чем нейтральный дзета-потенциал при физиологическом pH.

[0471] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена наночастица, содержащая:

(a) ядро липидной наночастицы, содержащее:

(i) ионизируемый липид,

(ii) фосфолипид,

(iii) структурный липид и

(iv) ПЭГ-липид и

(b) полезную нагрузку для лечения МВ, например, полинуклеотид по изобретению (например, мРНК CFTR), инкапсулированный в ядро для доставки в клетку, и

(c) катионный агент.

[0472] В одним аспекте в данном документе предложена наночастица, содержащая:

(a) ядро липидной наночастицы,

(b) полезную нагрузку для лечения МВ, например, полинуклеотид по изобретению (например, мРНК CFTR), инкапсулированный в ядро для доставки в клетку, и

(c) катионный агент,

причем наночастица демонстрирует клеточное накопление по меньшей мере около 20% в клетках HBE и демонстрирует экспрессию около 5% или более в клетках HBE.

[0473] Катионный агент может включать любую растворимую в воде молекулу или вещество, которое имеет суммарный положительный заряд при физиологических значениях pH и может прилипать к поверхности ядра липидной наночастицы. Такой агент также может быть растворимым в липидах, но также будет растворим в водном растворе. Вообще говоря, катионный агент имеет суммарный положительный заряд при физиологическом pH, поскольку он содержит одну или несколько основных функциональных групп, которые протонируются при физиологическом pH в водной

среде. Например, катионный агент может содержать одну или несколько аминогрупп, например первичные, вторичные или третичные амины, каждый из которых имеет pKa 8,0 или выше. pKa может быть больше около 9.

[0474] В некоторых вариантах осуществления катионный агент может представлять собой катионный липид, который представляет собой водорастворимую амфифильную молекулу, в которой одна часть молекулы является гидрофобной, содержащей, например, липидный фрагмент, а другая часть молекулы является гидрофильной, содержащей одну или несколько функциональных групп, которые обычно заряжены при физиологических значениях pH. Гидрофобная часть, содержащая липидный фрагмент, может служить для закрепления катионного агента на ядре липидной наночастицы. Гидрофильная часть может служить для увеличения заряда на поверхности ядра липидной наночастицы. Например, растворимость катионного агента в спирте может быть выше около 1 мг/мл. Растворимость в спирте может быть выше около 5 мг/мл. Растворимость в спирте может быть выше около 10 мг/мл. Растворимость в спирте может быть выше около 20 мг/мл в спирте. Спиртом может быть C_{1-6} спирт, такой как этанол.

[0475] Липидная часть молекулы может быть, например, структурным липидом, жирной кислотой или подобной гидрокарбильной группой.

[0476] Структурный липид может быть выбран из стероида, дитерпениода, тритерпеноида, холестана, урсоловой кислоты или их производных, но не ограничивается ими.

[0477] В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой стероид, выбранный, помимо прочего, из холестерина или фистостерола. В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой аналог холестерина. В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой ситостерол, кампестерол или стигмастерол. В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой аналог ситостерола, кампестерола или стигмастерола.

[0478] Жирная кислота содержит от 1 до 4 C_{6-20} углеводородных цепей. Жирная кислота может быть полностью насыщенной или содержать от 1 до 7 двойных связей. Жирная кислота может содержать от 1 до 5 гетероатомов либо вдоль основной цепи, либо сбоку от основной цепи.

[0479] В некоторых вариантах осуществления жирная кислота содержит две C_{10-18} углеводородные цепи. В некоторых вариантах осуществления жирная кислота содержит две насыщенные C_{10-18} углеводородные цепи. В некоторых вариантах

осуществления жирная кислота содержит две насыщенные C_{16} углеводородные цепи. В некоторых вариантах осуществления жирная кислота содержит две насыщенные C_{14} углеводородные цепи. В некоторых вариантах осуществления жирная кислота содержит две ненасыщенные C_{10-18} углеводородные цепи. В некоторых вариантах осуществления жирная кислота содержит две C_{16-18} углеводородные цепи, каждая с одной двойной связью. В некоторых вариантах осуществления жирная кислота содержит три насыщенные C_{8-18} углеводородные цепи.

[0480] Гидрокарбильная группа состоит из 1-4 C_{6-20} алкильных, алкенильных или алкинильных цепей или 3-10-членных циклоалкильных, циклоалкенильных или циклоалкинильных групп.

[0481] В некоторых вариантах осуществления гидрокарбильная цепь представляет собой C_{8-10} алкил. В некоторых вариантах осуществления гидрокарбильная цепь представляет собой C_{8-10} алкенил.

[0482] Гидрофильная часть может содержать 1-5 функциональных групп, которые будут заряжены при физиологических значениях pH от 7,3 до 7,4. Гидрофильная группа может включать основную функциональную группу, которая будет протонирована и положительно заряжена при физиологических значениях pH. По меньшей мере, одна из основных функциональных групп имеет pKa 8 или выше.

[0483] В некоторых вариантах осуществления гидрофильная часть содержит аминогруппу. Группа аминов может включать от одного до четырех первичных, вторичных или третичных аминов и их смесей. Первичные, вторичные или третичные амины могут быть частью более крупного амина, содержащего функциональную группу, выбранную из, помимо прочего, -C(=N-)-N-, -C=C-N-, -C=N- или -N-C(=N-)-N-. Амин может содержаться в трех-восьмичленном гетероалкильном или гетероарильном кольце.

[0484] В некоторых вариантах осуществления аминогруппа включает один или два концевых первичных амина. В некоторых вариантах осуществления аминогруппа включает один или два концевых первичных амина и один внутренний вторичный амин. В некоторых вариантах осуществления аминогруппа включает один или два третичных амина. В некоторых вариантах осуществления третичный амин представляет собой $(CH_3)_2N$-. В некоторых вариантах осуществления аминогруппа содержит от одного до двух концевых $(CH_3)_2N$-.

[0485] Гидрофильная часть может содержать фосфониевую группу. Противоион иона фосфония состоит из аниона с зарядом, равным единице.

[0486] В некоторых вариантах осуществления три заместителя фосфония представляют собой изопропильные группы. В некоторых вариантах осуществления противоион представляет собой галоген, гидросульфат, нитрит, хлорат или гидрокарбонат. В некоторых вариантах осуществления противоион представляет собой бромид.

[0487] В некоторых вариантах осуществления катионный агент представляет собой катионный липид, который представляет собой стеринамин. стеринамин имеет в качестве гидрофобной части стерол, а в качестве гидрофильной части - аминогруппу. Группа стеролов выбрана из холестерина, ситостерола, кампестерола, стигмастерола или их производных, но не ограничивается ими. Аминогруппа может включать от одного до пяти первичных, вторичных, третичных аминов или их смесей. По меньшей мере, один из аминов имеет pKa 8 или выше и заряжен при физиологическом pH. Первичные, вторичные или третичные амины могут быть частью более крупного амина, содержащего функциональную группу, выбранную из, помимо прочего, -C(=N-)-N-, -C=C-N-, -C=N- или -N-C(=N-)-N-. Амин может содержаться в трех-восьмичленном гетероалкильном или гетероарильном кольце.

[0488] В некоторых вариантах осуществления аминогруппа стеринамина включает один или два концевых первичных амина. В некоторых вариантах осуществления аминогруппа включает один или два концевых первичных амина и один внутренний вторичный амин. В некоторых вариантах осуществления аминогруппа включает один или два третичных амина. В некоторых вариантах осуществления третичный амин представляет собой $(CH_3)_2N$-. В некоторых вариантах осуществления аминогруппа содержит от одного до двух концевых $(CH_3)_2N$-.

[0489] стеринамины, используемые в наночастицах по изобретению, включают молекулы, имеющие формулу (A1):

A-L-B (A1)

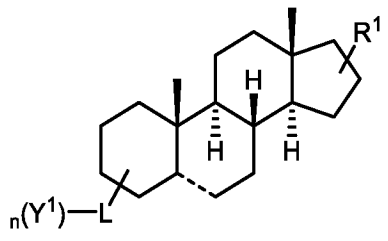
или его соль, где

A представляет собой аминогруппу, L представляет собой необязательный линкер и B представляет собой стерол.

[0490] В некоторых вариантах осуществления аминогруппа представляет собой алкил (например, C_{1-14}алкил, C_{1-12} алкил, C_{1-10} алкил и т.д.), 3-8-членный гетероциклоалкил, 5-6-членный гетероарил, C_{1-6}алкил-(3-8-членный гетероциклоалкил), или C_{1-6}алкил-(5-6-членный гетероарил), где алкил, 3-8-членный гетероциклоалкил, 5-6-членный гетероарил, C_{1-6}алкил-(3-8-членный гетероциклоалкил), и C_{1-6}алкил-(5-6-членный гетероарил) включает от одного до

пяти первичных, вторичных или третичных аминов или их комбинацию, где алкил, 3-8-членный гетероциклоалкил, 5-6-членный гетероарил, C_{1-6}алкил-(3-8-членный гетероциклоалкил), и C_{1-6}алкил-(5-6-членный гетероарил), каждый из которых необязательно замещен 1, 2, 3 или 4 заместителями, выбранными из C_{1-6}алкила, галогена, OH, O(C_{1-6} алкила), C_{1-6} алкил-OH, NH_2, NH(C_{1-6} алкила), N(C_{1-6} алкила)$_2$, 3-8-членного гетероциклоалкила (необязательно замещенный C_{1-14}алкил, содержащий от одного до пяти первичных, вторичных или третичных аминов или их комбинацию), 5-6-членного гетероарила, NH(3-8-членного гетероциклоалкила) и NH(5-6-членного гетероарила). В некоторых вариантах осуществления линкер отсутствует, представляет собой -O-, -S-S-, -OC(=O), -C(=O)N-, -OC(=O)N-, CH_2-NH-C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-CH_2-CH_2-C(=O)N-, -S-S-CH_2 или -SS-CH_2-CH_2-C(O)N-. В некоторых вариантах осуществления группа стерола представляет собой холестерин, ситостерол, кампестерол, стигмастерол или их производные.

[0491] В некоторых вариантах осуществления стеринамин имеет формулу A2:



(A2)

или его соль, где

---- представляет собой одинарную или двойную связь

R^1 представляет собой C_{1-14} алкил или C_{1-14} алкенил;

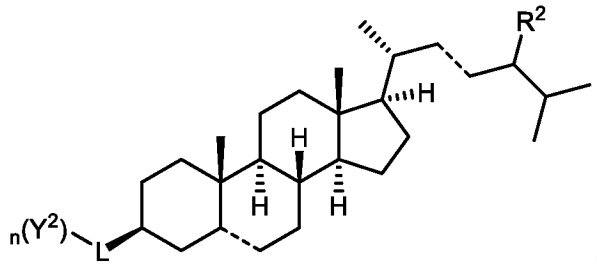
L отсутствует, представляет собой -O-, -S-S-, -OC(=O), -C(=O)N-, -OC(=O)N-, CH_2-NH-C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-CH_2-CH_2-C(=O)N-, -S-S-CH_2 или -SS-CH_2-CH_2-C(O)N-;

Y^1 представляет собой C_{1-10} алкил, 3-8-членный гетероциклоалкил, 5-6-членный гетероарил, C_{1-6}алкил-(3-8-членный гетероциклоалкил), или C_{1-6}алкил-(5-6-членный гетероарил), где алкил, 3-8-членный гетероциклоалкил, 5-6-членный гетероарил, C_{1-6}алкил-(3-8-членный гетероциклоалкил), и C_{1-6}алкил-(5-6-членный гетероарил) включает от одного до пяти первичных, вторичных или третичных аминов или их комбинацию, где алкил, 3-8-членный гетероциклоалкил, 5-6-членный гетероарил, C_{1-6}алкил-(3-8-членный гетероциклоалкил), и C_{1-6}алкил-(5-6-членный гетероарил), каждый из которых необязательно замещен 1, 2, 3 или 4 заместителями, выбранными из C_{1-6}алкила, галогена, OH, O(C_{1-6} алкила), C_{1-6} алкил-OH, NH_2, NH(C_{1-6} алкила), N(C_{1-6} алкила)$_2$, 3-8-членного гетероциклоалкила (необязательно замещенный C_{1-}

$_{14}$алкил, содержащий от одного до пяти первичных, вторичных или третичных аминов или их комбинацию), 5-6-членного гетероарила, NH(3-8-членного гетероциклоалкила) и NH(5-6-членного гетероарила); и

п = 1 или 2.

[0492] В некоторых вариантах осуществления стеринамин имеет формулу A3:



(A3)

или его соль, где

---- представляет собой одинарную или двойную связь;

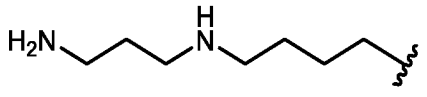
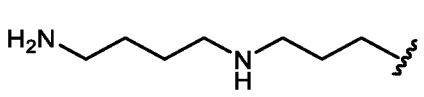
R^2 представляет собой H или C_{1-6} алкил;

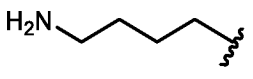
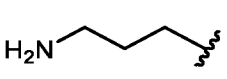
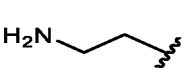
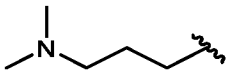
L отсутствует, представляет собой -O-, -S-S-, -OC(=O), -C(=O)N-, -OC(=O)N-, CH_2-NH-C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-CH_2-CH_2-C(=O)N-, -S-S-CH_2 или -SS-CH_2-CH_2-C(O)N-;

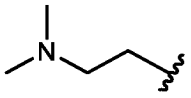
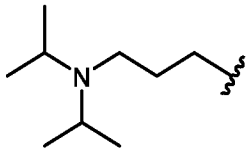
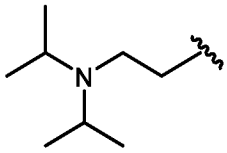
Y^1 представляет собой C_{1-10} алкил, 3-8-членный гетероциклоалкил, 5-6-членный гетероарил, C_{1-6}алкил-(3-8-членный гетероциклоалкил), или C_{1-6}алкил-(5-6-членный гетероарил), где алкил, 3-8-членный гетероциклоалкил, 5-6-членный гетероарил, C_{1-6}алкил-(3-8-членный гетероциклоалкил), и C_{1-6}алкил-(5-6-членный гетероарил) включает от одного до пяти первичных, вторичных или третичных аминов или их комбинацию, где алкил, 3-8-членный гетероциклоалкил, 5-6-членный гетероарил, C_{1-6}алкил-(3-8-членный гетероциклоалкил), и C_{1-6}алкил-(5-6-членный гетероарил), каждый из которых необязательно замещен 1, 2, 3 или 4 заместителями, выбранными из C_{1-6}алкила, галогена, OH, O(C_{1-6} алкила), C_{1-6} алкил-OH, NH_2, NH(C_{1-6} алкила), N(C_{1-6} алкила)$_2$, 3-8-членного гетероциклоалкила (необязательно замещенный C_{1-14}алкил, содержащий от одного до пяти первичных, вторичных или третичных аминов или их комбинацию), 5-6-членного гетероарила, NH(3-8-членного гетероциклоалкила) и NH(5-6-членного гетероарила); и

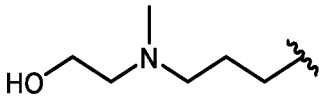
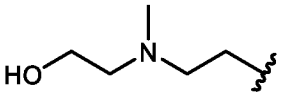
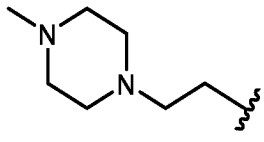
п = 1 или 2.

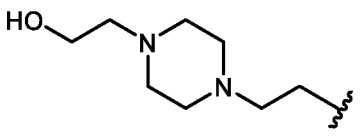
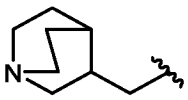
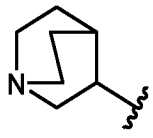
[0493] В некоторых вариантах осуществления Y^2 выбран из:

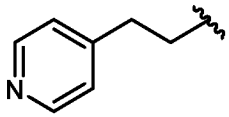
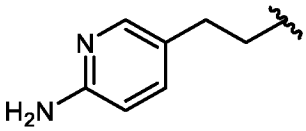
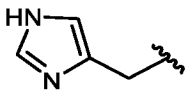
(1)  ; (2)  ; (3)

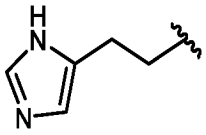
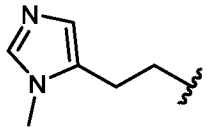
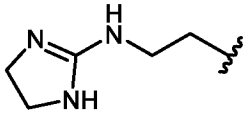
; (4) ; (5) ; (6) ; (7)

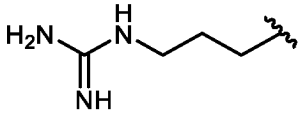
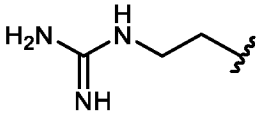
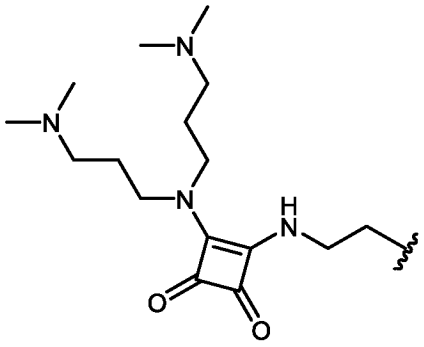
; (8) ; (9) ; (10)

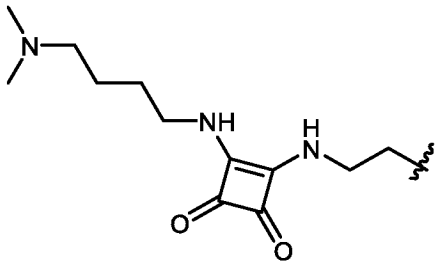
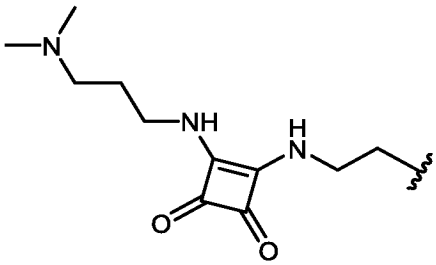
; (11) ; (12) ; (13)

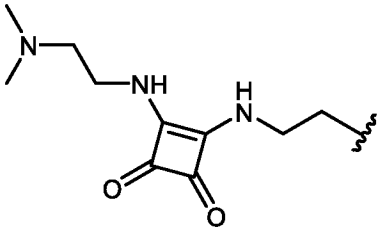
; (14) ; (15) ; (16)

; (17) ; (18) ; (19)

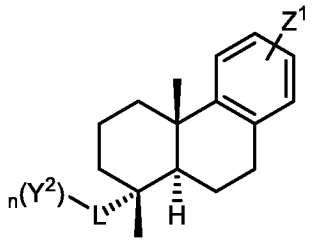
; (20) (21) ; (22)

; (23) ; (24) ;

(25); (26) ; (27)

; (28) $N(CH_3)_2$.

[0494] В некоторых вариантах осуществления стеринамин имеет формулу A4:



(A4)

или его соль, где

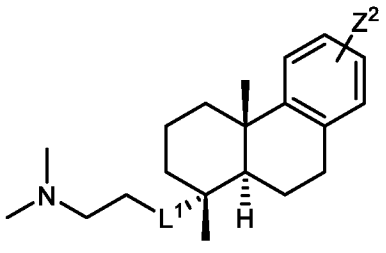
Z^1 представляет собой OH или C_{3-6} алкил;

L отсутствует, представляет собой -O-, -S-S-, -OC(=O), -C(=O)N-, -OC(=O)N-, CH_2-NH-C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-CH_2-CH_2-C(=O)N-, -S-S-CH_2 или -SS-CH_2-CH_2-C(O)N-;

Y^1 представляет собой C_{1-10} алкил, 3-8-членный гетероциклоалкил, 5-6-членный гетероарил, C_{1-6}алкил-(3-8-членный гетероциклоалкил), или C_{1-6}алкил-(5-6-членный гетероарил), где алкил, 3-8-членный гетероциклоалкил, 5-6-членный гетероарил, C_{1-6}алкил-(3-8-членный гетероциклоалкил), и C_{1-6}алкил-(5-6-членный гетероарил) включает от одного до пяти первичных, вторичных или третичных аминов или их комбинацию, где алкил, 3-8-членный гетероциклоалкил, 5-6-членный гетероарил, C_{1-6}алкил-(3-8-членный гетероциклоалкил), и C_{1-6}алкил-(5-6-членный гетероарил), каждый из которых необязательно замещен 1, 2, 3 или 4 заместителями, выбранными из C_{1-6}алкила, галогена, OH, O(C_{1-6} алкила), C_{1-6} алкил-OH, NH_2, NH(C_{1-6} алкила), N(C_{1-6} алкила)$_2$, 3-8-членного гетероциклоалкила (необязательно замещенный C_{1-14}алкил, содержащий от одного до пяти первичных, вторичных или третичных аминов или их комбинацию), 5-6-членного гетероарила, NH(3-8-членного гетероциклоалкила) и NH(5-6-членного гетероарила); и

n = 1 или 2.

[0495] В некоторых вариантах осуществления стеринамин имеет формулу A5:



(A5)

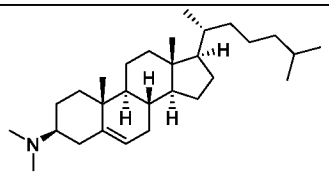
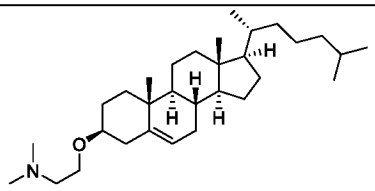
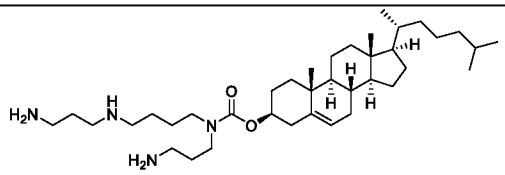
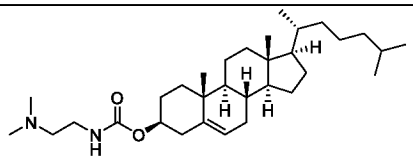
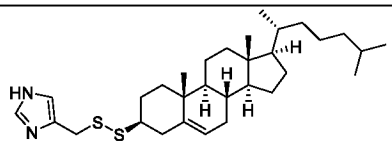
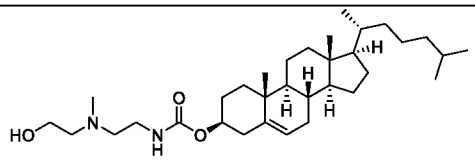
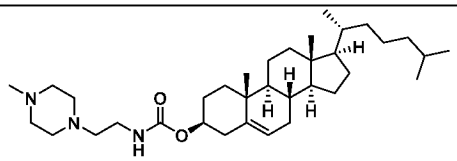
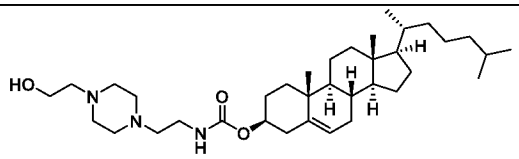
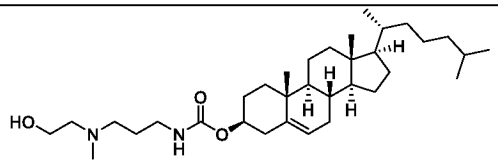
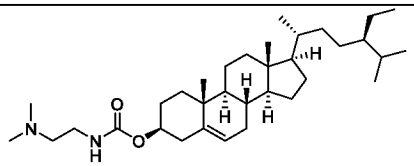
или его соль, где

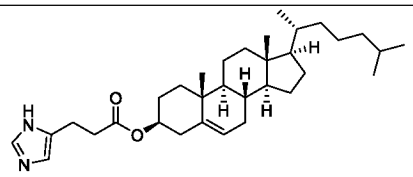
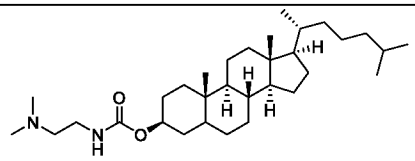
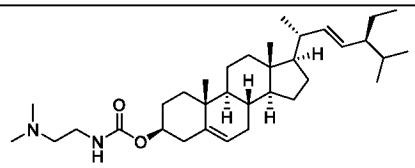
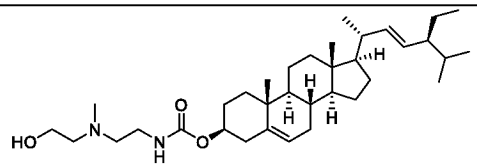
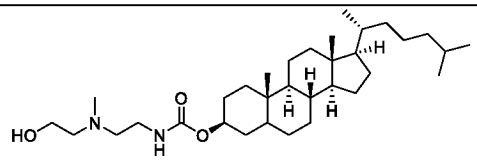
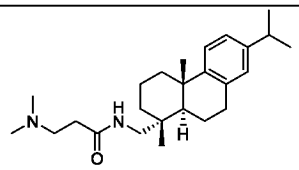
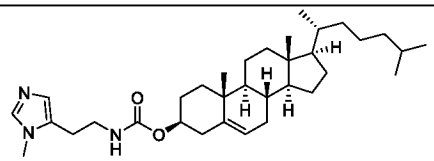
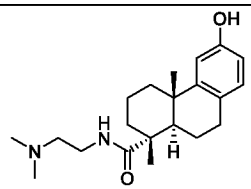
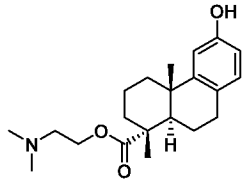
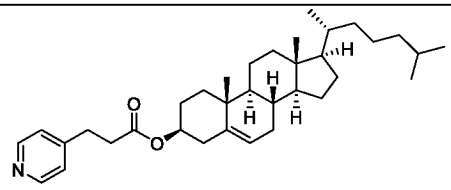
Z^2 представляет собой OH или изопропил;

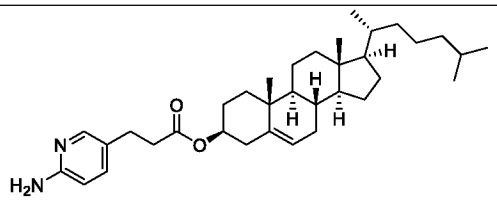
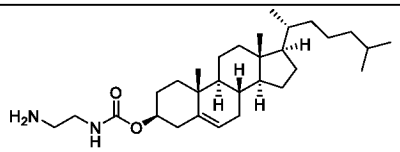
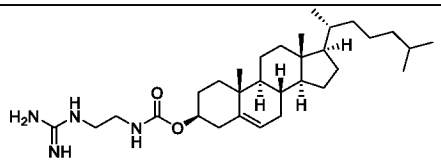
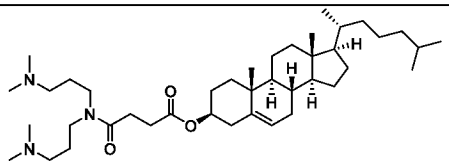
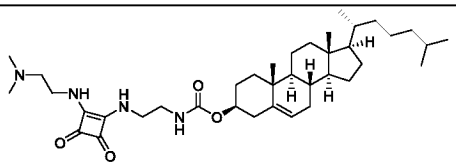
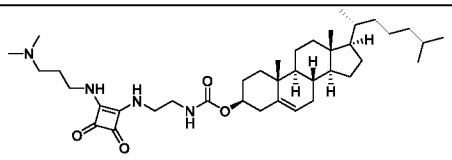
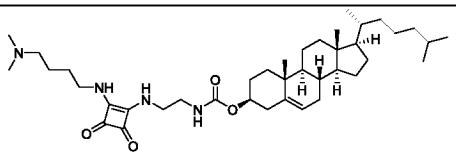
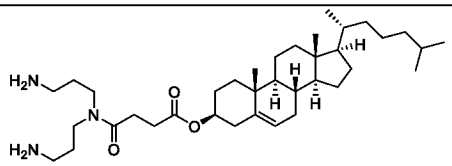
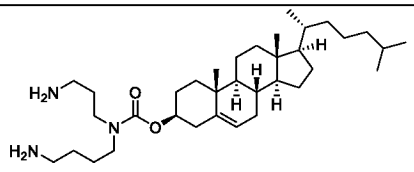
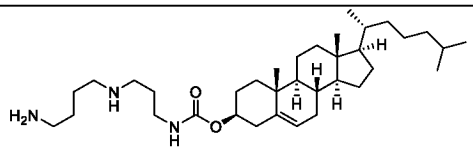
L^1представляет собой -CH_2-NH-C(O)-, -C(O)NH- или -C(O)O-.

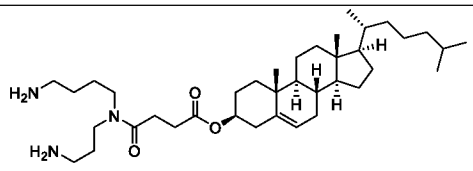
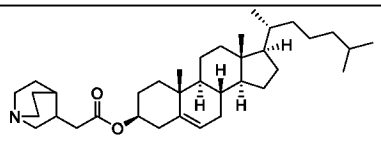
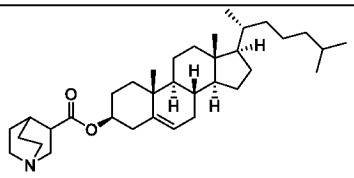
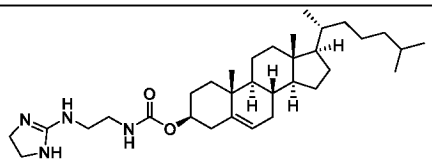
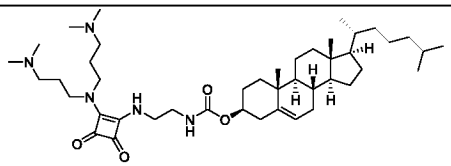
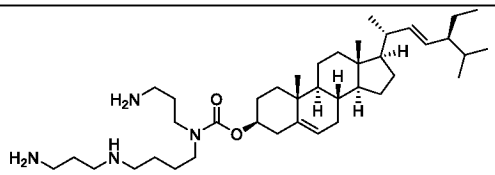
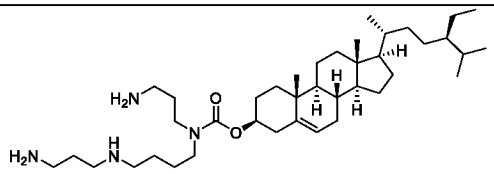
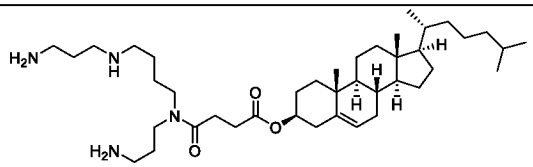
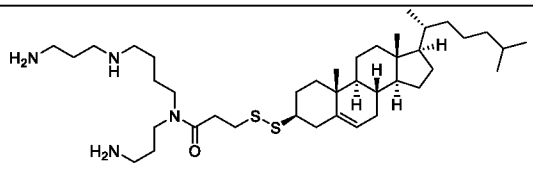
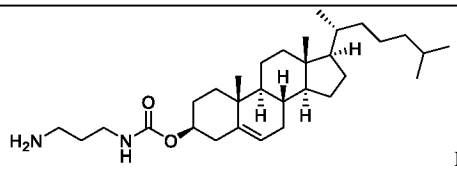
В некоторых вариантах осуществления стеринамин выбран из:

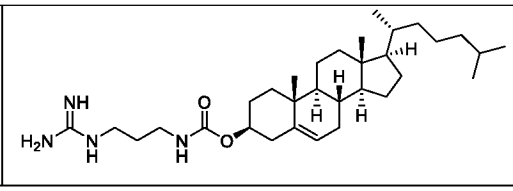
Таблица SA1

стеринамин №	Структура
SA1	
SA2	
SA3	
SA4	
SA5	
SA6	
SA7	
SA8	
SA9	
SA10	

SA11	
SA12	
SA13	
SA14	
SA15	
SA16	
SA17	
SA18	
SA19	
SA20	

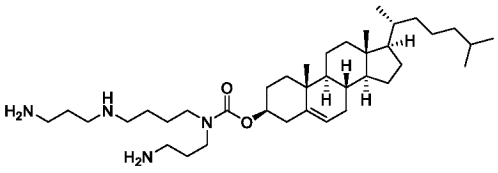
SA21	
SA22	
SA23	
SA24	
SA25	
SA26	
SA27	
SA28	
SA29	
SA30	

SA31	
SA32	
SA33	
SA34	
SA35	
SA36	
SA37	
SA38	
SA39	
SA40	 и

SA41	

или его соль.

В некоторых вариантах осуществления стеринамин представляет собой SA3:



, или его соль, которая также упоминается как GL-67. SA3 или GL-67 можно получить в соответствии с известными в данной области техники способами или приобрести у коммерческого поставщика, такого как Avanti® Polar Lipids, Inc. (SKU 890893).

[0496] В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой модифицированную аминокислоту, такую как модифицированный аргинин, в котором аминокислотный остаток, имеющий аминосодержащую боковую цепь, присоединен к гидрофобной группе, такой как стерол (например, холестерин или его производное), жирная кислота или аналогичная углеводородная группа. По меньшей мере один амин модифицированной аминокислотной части имеет pKa 8,0 или выше. По меньшей мере, один амин из модифицированной аминокислотной части является положительно заряженным при физиологическом pH. Аминокислотный остаток может включать, помимо прочего, аргинин, гистидин, лизин, триптофан, орнитин и 5-гидроксилизин. Аминокислота связана с гидрофобной группой через линкер.

[0497] В некоторых вариантах осуществления модифицированная аминокислота представляет собой модифицированный аргинин.

[0498] В некоторых вариантах осуществления катионный агент представляет собой нелипидный катионный агент. Примеры нелипидного катионного агента включают, например, хлорид бензалкония, хлорид цетилпиридина, моногидрат L-лизина или трометамин.

[0499] В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица содержит катионный агент (например, стеринамин) в молярном соотношении 2-15%, 3-10%, 4-10%, 5-10%, 6-10%, 2-3%, 2-4%, 2-5%, 2-6%, 2-7%, 2-8%, 3-4%, 3-5%, 3-6%, 3-7%, 3-8%, 4-5%, 4-6%, 4-7%, 4-8%, 5-6%, 5-7%, 5-8%, 6-7%, 6-8%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5%, 10%, не менее 2%, не менее 3%, не менее 4%, не менее 5%, не менее 6%, не менее 7%, не менее 8%, менее 15 %, менее 14 %, менее 13 %, менее 12 %, менее 11 % или менее чем 10%. В

некоторых вариантах осуществления липидная наночастица содержит молярное соотношение 20-60% ионизируемого катионного липида, 5-25% некатионного липида, 25-55% стерола, 0,5-15% модифицированного ПЭГ-липида и 2-10% катионного агента (например, стеринамина). В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица содержит молярное соотношение 40-60% ионизируемого катионного липида, 5-15% некатионного липида, 30-50% стерина, 0,5-10% модифицированного ПЭГ-липида и 3-7% катионного агента. В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица содержит молярное соотношение 45-55% ионизируемого катионного липида, 7,5-12,5% некатионного липида, 35-45% стерина, 0,5-5% модифицированного ПЭГ-липида и 4,5-6% катионного агента. В некоторых случаях катионный агент представляет собой GL-67 или его соль.

[0500] В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение катионного агента к полинуклеотиду составляет от около 0,1:1 до около 15:1. В некоторых вариантах осуществления массовое отношение катионного агента к полинуклеотиду составляет от около 0,2:1 до около 10:1. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение катионного агента к полинуклеотиду составляет от около 1:1 до около 10:1. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение катионного агента к полинуклеотиду составляет от около 1:1 до около 8:1. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение катионного агента к полинуклеотиду составляет от около 1:1 до около 7:1. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение катионного агента к полинуклеотиду составляет от около 1:1 до около 6:1. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение катионного агента к полинуклеотиду составляет от около 1:1 до около 5:1. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение катионного агента к полинуклеотиду составляет от около 1:1 до около 4:1. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение катионного агента к полинуклеотиду составляет от около 1,25:1 до около 3,75:1. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение катионного агента к полинуклеотиду составляет около 1,25:1. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение катионного агента к полинуклеотиду составляет около 2,5:1. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение катионного агента к полинуклеотиду составляет около 3,75:1.

[0501] В некоторых вариантах осуществления молярное соотношение катионного агента к полинуклеотиду составляет от около 0,1:1 до около 20:1. В некоторых вариантах осуществления молярное соотношение катионного агента к

полинуклеотиду составляет от около 1,5:1 до около 10:1. В некоторых вариантах осуществления молярное соотношение катионного агента к полинуклеотиду составляет от около 1,5:1 до около 9:1. В некоторых вариантах осуществления молярное соотношение катионного агента к полинуклеотиду составляет от около 1,5:1 до около 8:1. В некоторых вариантах осуществления молярное соотношение катионного агента к полинуклеотиду составляет от около 1,5:1 до около 7:1. В некоторых вариантах осуществления молярное соотношение катионного агента к полинуклеотиду составляет от около 1,5:1 до около 6:1. В некоторых вариантах осуществления молярное соотношение катионного агента к полинуклеотиду составляет от около 1,5:1 до около 5:1. В некоторых вариантах осуществления молярное соотношение катионного агента к полинуклеотиду составляет около 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления молярное соотношение катионного агента к полинуклеотиду составляет около 2:1. В некоторых вариантах осуществления молярное соотношение катионного агента к полинуклеотиду составляет около 3:1. В некоторых вариантах осуществления молярное соотношение катионного агента к полинуклеотиду составляет около 4:1. В некоторых вариантах осуществления молярное соотношение катионного агента к полинуклеотиду составляет около 5:1.

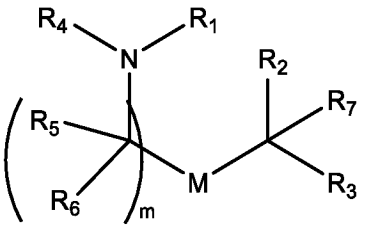
[0502] В некоторых вариантах осуществления наночастица имеет дзета-потенциал от около 5 мВ до около 20 мВ. В некоторых вариантах осуществления наночастица имеет дзета-потенциал от около 5 мВ до около 20 мВ. В некоторых вариантах осуществления наночастица имеет дзета-потенциал от около 5 мВ до около 15 мВ. В некоторых вариантах осуществления наночастица имеет дзета-потенциал от около 5 мВ до около 10 мВ.

[0503] В некоторых вариантах осуществления ядро липидной наночастицы имеет нейтральный заряд при нейтральном pH.

[0504] В некоторых вариантах осуществления более около 80% катионного агента находится на поверхности наночастицы. В некоторых вариантах осуществления более около 90% катионного агента находится на поверхности наночастицы. В некоторых вариантах осуществления более около 95% катионного агента находится на поверхности наночастицы.

Ионизируемые липиды

[0505] В некоторых аспектах ионизируемые липиды по данному изобретению могут представлять собой одно или более соединений формулы (I):



(I),

или их N-оксиды, или соли, или изомеры, где

R_1 выбран из группы, состоящей из C_{5-30} алкила, C_{5-20} алкенила, -R*YR", -YR" и -R"M'R';

R_2 и R_3 независимо выбраны из группы, состоящей из H, C_{1-14} алкила, C_{2-14} алкенила, -R*YR", -YR" и -R*OR", или R_2 и R_3, вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют гетероцикл или карбоцикл;

R_4 выбран из группы, состоящей из водорода, карбоцикла C_{3-6}, $-(CH_2)_nQ$, $-(CH_2)_nCHQR$,

-CHQR, $-CQ(R)_2$, и незамещенного C_{1-6}алкила, где Q выбран из карбоцикла, гетероцикла, -OR, $-O(CH_2)_nN(R)_2$, -C(O)OR, -OC(O)R, $-CX_3$, $-CX_2H$, $-CXH_2$, -CN, $-N(R)_2$, $-C(O)N(R)_2$, $-N(R)C(O)R$, $-N(R)S(O)_2R$, $-N(R)C(O)N(R)_2$, $-N(R)C(S)N(R)_2$, $-N(R)R_8$,

$-N(R)S(O)_2R_8$, $-O(CH_2)_nOR$, $-N(R)C(=NR_9)N(R)_2$, $-N(R)C(=CHR_9)N(R)_2$, $-OC(O)N(R)_2$, $-N(R)C(O)OR$, $-N(OR)C(O)R$, $-N(OR)S(O)_2R$, $-N(OR)C(O)OR$, $-N(OR)C(O)N(R)_2$, $-N(OR)C(S)N(R)_2$, $-N(OR)C(=NR_9)N(R)_2$, $-N(OR)C(=CHR_9)N(R)_2$, $-C(=NR_9)N(R)_2$, $-C(=NR_9)R$, -C(O)N(R)OR, и $-C(R)N(R)_2C(O)OR$, и каждый n независимо выбран из 1, 2, 3, 4 и 5;

каждый R_5 независимо выбран из группы, состоящей из C_{1-3} алкила, C_{2-3} алкенила и H;

каждый R_6 независимо выбран из группы, состоящей из C_{1-3} алкила, C_{2-3} алкенила и H;

M и M' независимо выбраны из -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)-M"-C(O)O-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, $-S(O)_2$-, -S-S-, арильной группы и гетероарильной группы, в которой M" представляет собой связь, C_{1-13}алкил или C_{2-13}алкенил;

R_7 выбран из группы, состоящей из C_{1-3} алкила, C_{2-3} алкенила и H;

R_8 выбран из группы, состоящей из C_{3-6} карбоцикла и гетероцикла;

R_9 выбран из группы, состоящей из H, CN, NO_2, C_{1-6} алкила, -OR, $-S(O)_2R$, $-S(O)_2N(R)_2$, C_{2-6} алкенила, C_{3-6} карбоцикла и гетероцикла;

каждый R независимо выбран из группы, состоящей из C_{1-3} алкила, C_{2-3} алкенила и

H;

каждый R’ независимо выбран из группы, состоящей из C_{1-18} алкила, C_{2-18} алкенила,-R*YR”,- YR” и H;

каждый R” независимо выбран из группы, состоящей из C_{3-15} алкила и C_{3-15} алкенила;

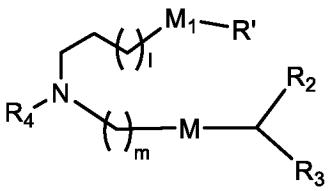
каждый R* независимо выбран из группы, состоящей из C_{1-12} алкила и C_{2-12} алкенила;

каждый Y независимо представляет собой C_{3-6} карбоцикл;

каждый X независимо выбран из группы, состоящей из F, Cl, Br и I; и

m выбран из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 и 13; и при этом если R_4 представляет собой $-(CH_2)_nQ$, $-(CH_2)_nCHQR$, –CHQR или $-CQ(R)_2$, то (i) Q не является $-N(R)_2$, если n равен 1, 2, 3, 4 или 5, или (ii) Q не является 5, 6 или 7-членным гетероциклоалкилом, если n равен 1 или 2.

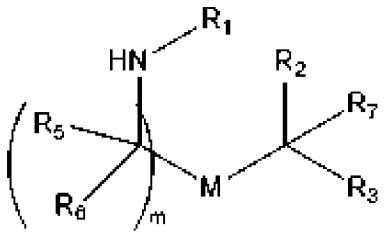
[0506] В определенных вариантах осуществления поднабор соединений формулы (I) включает соединения формулы (IA):



(IA),

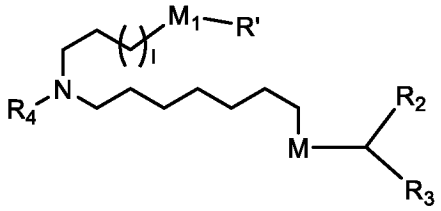
или их N-оксид, или их соль, или изомер, где l выбран из 1, 2, 3, 4 и 5; m выбран из 5, 6, 7, 8 и 9; M_1 представляет собой связь или M’; R_4 представляет собой водород, незамещенный C_{1-3}алкил или $-(CH_2)_nQ$, где Q представляет собой –OH, $-NHC(S)N(R)_2$, $-NHC(O)N(R)_2$, $-N(R)C(O)R$, $-N(R)S(O)_2R$, $-N(R)R_8$, $-NHC(=NR_9)N(R)_2$, $-NHC(=CHR_9)N(R)_2$, $-OC(O)N(R)_2$, $-N(R)C(O)OR$, гетероарил или гетероциклоалкил; M и M’ независимо выбраны из -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)-M”-C(O)O-, -C(O)N(R’)-, -P(O)(OR’)O-, -S-S-, арильной группы и гетероарильной группы; и R_2 и R_3 независимо выбраны из группы, состоящей из H, C_{1-14}алкила и C_{2-14}алкенила. Например, m равен 5, 7 или 9. Например, Q представляет собой OH, $-NHC(S)N(R)_2$ или $-NHC(O)N(R)_2$. Например, Q представляет собой $-N(R)C(O)R$ или $-N(R)S(O)_2R$.

[0507] В определенных вариантах осуществления поднабор соединений формулы (I) включает соединения формулы (IB):



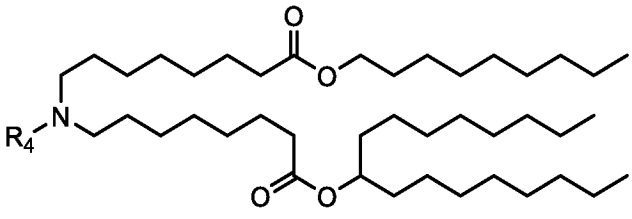
(IB), или их N-оксид, или их соль или изомер, в которых все переменные являются такими, как определено в данном документе. Например, m выбран из 5, 6, 7, 8 и 9; R_4 представляет собой водород, незамещенный C_{1-3}алкил или $-(CH_2)_nQ$, где Q представляет собой –OH, $-NHC(S)N(R)_2$, $-NHC(O)N(R)_2$, $-N(R)C(O)R$, $-N(R)S(O)_2R$, $-N(R)R_8$, $-NHC(=NR_9)N(R)_2$, $-NHC(=CHR_9)N(R)_2$, $-OC(O)N(R)_2$, $-N(R)C(O)OR$, гетероарил или гетероциклоалкил; M и M' независимо выбраны из -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)-M"- C(O)O-, -C(O)N(R')-, -P(O)(OR')O-, -S-S-, арильной группы и гетероарильной группы; и R_2 и R_3 независимо выбраны из группы, состоящей из H, C_{1-14}алкила и C_{2-14}алкенила. Например, m равен 5, 7 или 9. Например, Q представляет собой OH, $-NHC(S)N(R)_2$ или $-NHC(O)N(R)_2$. Например, Q представляет собой $-N(R)C(O)R$ или $-N(R)S(O)_2R$.

[0508] В определенных вариантах осуществления поднабор соединений формулы (I) включает соединения формулы (II):



(II), или их N-оксид, или их соль, или изомер, где l выбран из 1, 2, 3, 4 и 5; M_1 представляет собой связь или M'; R_4 представляет собой водород, незамещенный C_{1-3}алкил или $-(CH_2)_nQ$, где n равно 2, 3 или 4, и Q представляет собой –OH, $-NHC(S)N(R)_2$, $-NHC(O)N(R)_2$, $-N(R)C(O)R$, $-N(R)S(O)_2R$, $-N(R)R_8$, $-NHC(=NR_9)N(R)_2$, $-NHC(=CHR_9)N(R)_2$, $-OC(O)N(R)_2$, $-N(R)C(O)OR$, гетероарил или гетероциклоалкил; M и M' независимо выбраны из -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)-M"- C(O)O-, -C(O)N(R')-, -P(O)(OR')O-, -S-S-, арильной группы и гетероарильной группы; и R_2 и R_3 независимо выбраны из группы, состоящей из H, C_{1-14}алкила и C_{2-14}алкенила.

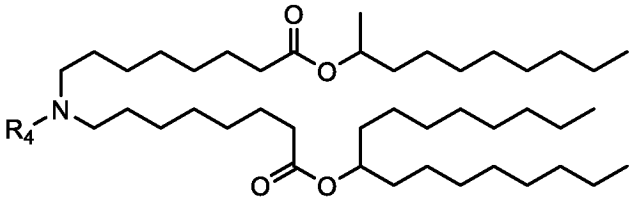
[0509] В одном варианте осуществления соединения формулы (I) представляют собой соединения формулы (IIa),



(IIa),

или их N-оксиды, или соли, или изомеры, где R_4 является таким, как описано в данном документе.

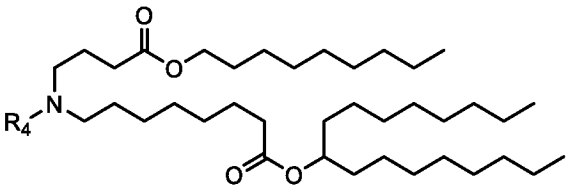
[0510] В другом варианте осуществления соединения формулы (I) представляют собой соединения формулы (IIb),



(IIb),

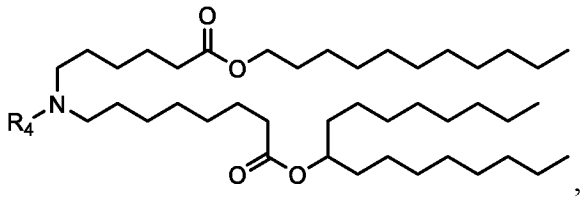
или их N-оксиды, или соли, или изомеры, где R_4 является таким, как описано в данном документе.

[0511] В другом варианте осуществления соединения формулы (I) представляют собой соединения формулы (IIc) или (IIe):



(IIc)

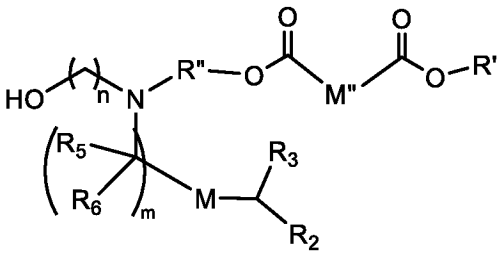
или



(IIe),

или их N-оксиды, или соли, или изомеры, где R_4 является таким, как описано в данном документе.

[0512] В другом варианте осуществления соединения формулы (I) представляют собой соединения формулы (IIf),

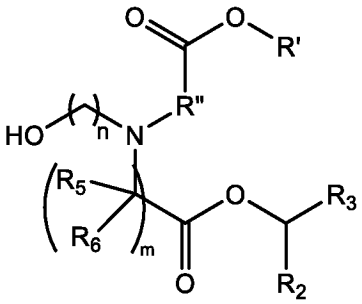


(IIf) или их N-оксиды, или соли, или изомеры,

где M представляет собой –C(O)O- или –OC(O)-, M" представляет собой C_{1-6}алкил или C_{2-6}алкенил, R_2 и R_3 независимо выбраны из группы, состоящей из C_{5-14}алкила и C_{5-14}алкенила, и n выбран из 2, 3 и 4.

[0513] В следующем варианте осуществления соединения формулы (I)

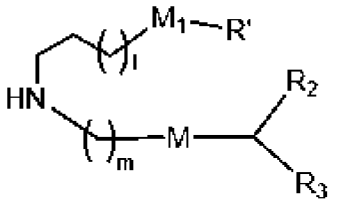
представляют собой соединения формулы (IId),



(IId),

или их N-оксиды, или соли, или изомеры, где n равен 2, 3 или 4; и m, R', R" и R_2-R_6 являются такими, как описано в данном документе. Например, каждый из R_2 и R_3 может быть независимо выбран из группы, состоящей из C_{5-14} алкила и C_{5-14} алкенила.

[0514] В следующем варианте осуществления соединения формулы (I) представляют собой соединения формулы (IIg),

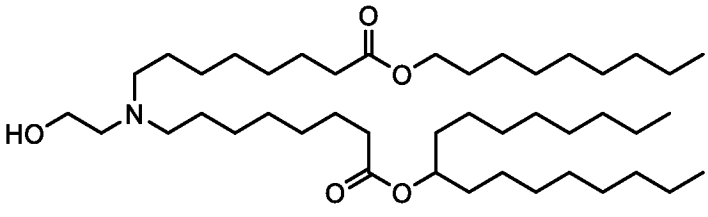


(IIg), или их N-оксиды, или их соли, или изомеры, где l выбран из 1, 2, 3, 4 и 5; m выбран из 5, 6, 7, 8 и 9; M_1 представляет собой связь или M'; M и M' независимо выбраны из -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)-M"-C(O)O-, -C(O)N(R')-, -P(O)(OR')O-, -S-S-, арильной группы и гетероарильной группы; и R_2 и R_3 независимо выбраны из группы, состоящей из H, C_{1-14}алкила и C_{2-14}алкенила. Например, M" представляет собой C_{1-6}алкил (например, C_{1-4}алкил) или C_{2-6}алкенил (например, C_{2-4}алкенил). Например, R_2 и R_3 могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из C_{5-14}алкила и C_{5-14}алкенила.

[0515] В некоторых вариантах осуществления ионизируемые липиды представляют собой одно или несколько соединений, описанных в заявках США №№ 62/220 091, 62/252 316, 62/253 433, 62/266 460, 62/333 557, 62/382 740, 62/393 940, 62/471 937, 62/471 949, 62/475 140 и 62/475 166, и заявке PCT № PCT/US2016/052352.

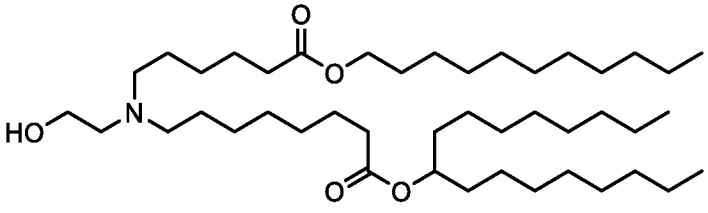
[0516] В некоторых вариантах осуществления ионизируемые липиды выбраны из соединений 1-280, описанных в заявке на патент США № 62/475166.

[0517] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой



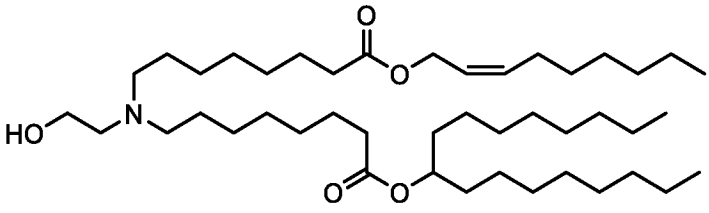
(Соединение II) или его соль.

[0518] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой



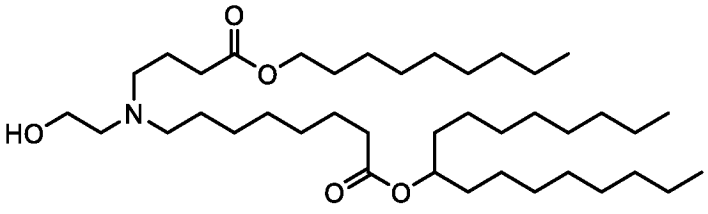
(Соединение III) или его соль.

[0519] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой



(Соединение IV) или его соль.

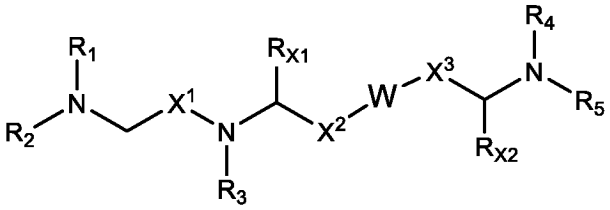
[0520] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой



(Соединение V) или его соль.

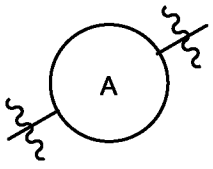
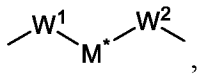
[0521] Центральный аминофрагмент липида в соответствии с формулами (I), (IA), (IB), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe), (IIf), или (IIg) может быть протонирован при физиологическом pH. Таким образом, липид может иметь положительный или частичный положительный заряд при физиологическом pH. Такие липиды можно назвать катионными или ионизируемыми (амино)липидами. Липиды также могут быть цвиттерионными, т. е., нейтральные молекулы как с положительным, так и отрицательным зарядом.

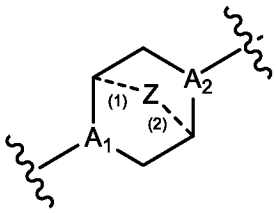
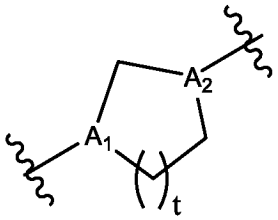
[0522] В некоторых аспектах ионизируемые липиды по настоящему раскрытию могут представлять собой одно или более соединений формулы (III):



(III),

или их соли или изомеры, где

W представляет собой  или ,

кольцо A представляет собой  или ;

t равен 1 или 2;

A_1 и A_2 каждый независимо выбирают из CH или N;

Z представляет собой CH_2 или отсутствует, при этом когда Z представляет собой CH_2, пунктирные линии (1) и (2), каждая, представляют собой одинарную связь; и когда Z отсутствует, пунктирные линии (1) и (2) обе отсутствуют;

R_1, R_2, R_3, R_4 и R_5 независимо выбраны из группы, состоящей из $C_{5\text{-}20}$алкила, $C_{5\text{-}20}$алкенила, -R"MR', -R*YR", -YR" и -R*OR";

каждый из R_{X1} и R_{X2} независимо представляет собой H или $C_{1\text{-}3}$алкил;

каждый M независимо выбран из группы, состоящей из -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)O-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, $-S(O)_2-$, -C(O)S-, -SC(O)-, арильной группы и гетероарильной группы;

M* представляет собой C_1-C_6алкил,

каждый из W^1 и W^2 независимо выбраны из группы, состоящей из -O- и $-N(R_6)-$;

каждый R_6 независимо выбран из группы, состоящей из H и $C_{1\text{-}5}$алкила;

X^1, X^2, и X^3 независимо выбраны из группы, состоящей из связи, $-CH_2-$, $-(CH_2)_2-$, -CHR-, -CHY-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, $-(CH_2)_n$-C(O)-, -C(O)-$(CH_2)_n$-, $-(CH_2)_n$-C(O)O-, -OC(O)-$(CH_2)_n$-, $-(CH_2)_n$-OC(O)-, -C(O)O-$(CH_2)_n$-, -CH(OH)-, -C(S)- и -CH(SH)-;

каждый Y независимо представляет собой $C_{3\text{-}6}$ карбоцикл;

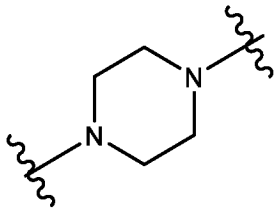
каждый R* независимо выбран из группы, состоящей из $C_{1\text{-}12}$ алкила и $C_{2\text{-}12}$ алкенила;

каждый R независимо выбирают из группы, состоящей из C_{1-3} алкила и C_{3-6} карбоцикла;

каждый R' независимо выбран из группы, состоящей из C_{1-12}алкила, C_{2-12}алкенила и H;

каждый R" независимо выбран из группы, состоящей из C_{3-12}алкила, C_{3-12}алкенила и -R*MR'; и

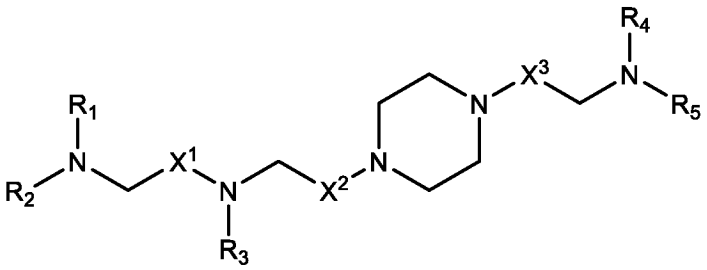
n представляет собой целое число от 1 до 6;

когда кольцо A представляет собой , то

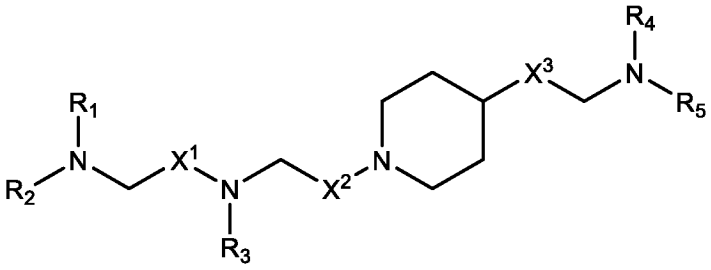
i) по меньшей мере один из X^1, X^2, и X^3 не является $-CH_2-$; и/или

ii) по меньшей мере один из R_1, R_2, R_3, R_4 и R_5 представляет собой -R"MR'.

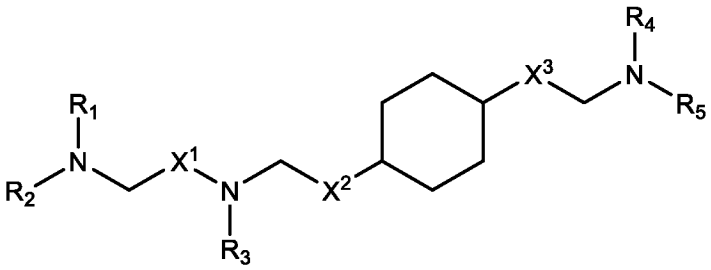
[0523] В некоторых вариантах осуществления соединение имеет любую из формул (IIIa1)-(IIIa8):



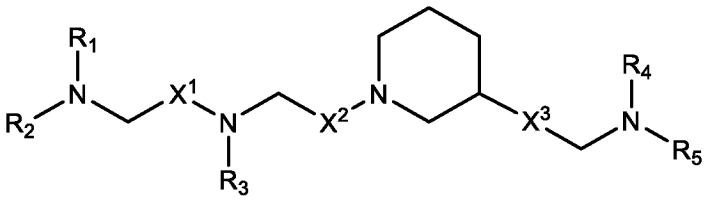
(IIIa1),



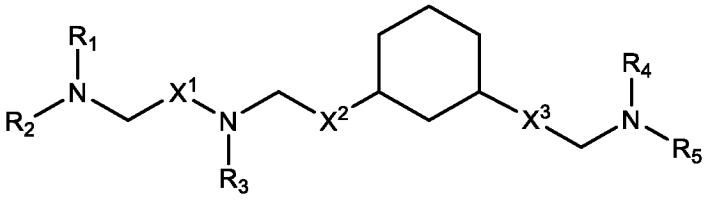
(IIIa2),



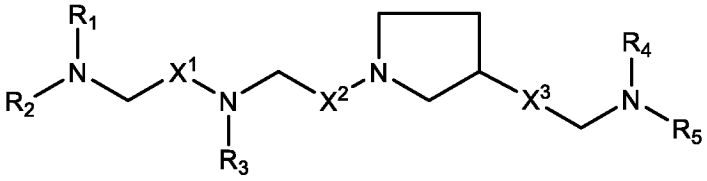
(IIIa3),



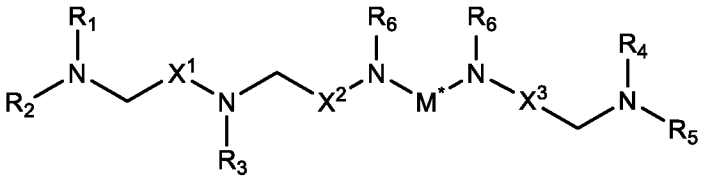
(IIIa4),



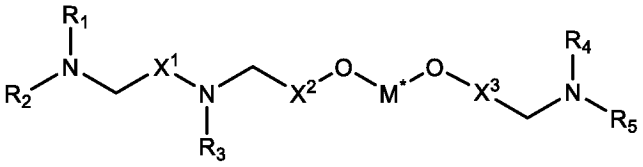
(IIIa5′),



(IIIa6),



(IIIa7), или



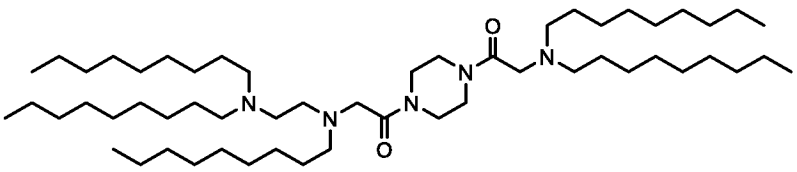
(IIIa8).

[0524] В некоторых вариантах осуществления ионизируемые липиды представляют собой одно или несколько соединений, описанных в заявках США №№ 62/271 146, 62/338 474, 62/413 345 и 62/519 826, и заявке PCT № PCT/US2016/068300.

[0525] В некоторых вариантах осуществления ионизируемые липиды выбраны из соединений 1-156, описанных в заявке на патент США № 62/519826.

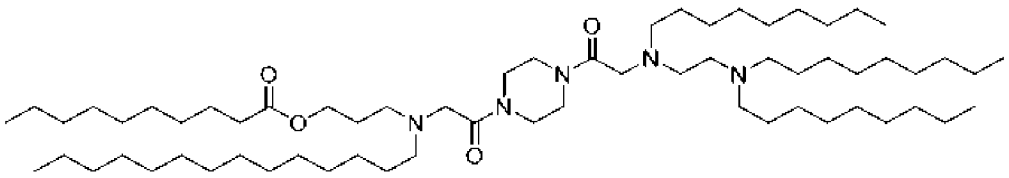
[0526] В некоторых вариантах осуществления ионизируемые липиды выбраны из соединений 1-16, 42-66, 68-76 и 78-156, описанных в заявке США № 62/519 826.

[0527] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой



(Соединение VI) или его соль.

[0528] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой



(Соединение VII) или его соль.

[0529] Центральный аминофрагмент липида в соответствии с формулами (III), (IIIa1), (IIIa2), (IIIa3), (IIIa4), (IIIa5), (IIIa6), (IIIa7) или (IIIa8) может быть протонирован при физиологическом pH. Таким образом, липид может иметь положительный или частичный положительный заряд при физиологическом pH. Такие липиды можно назвать катионными или ионизируемыми (амино)липидами. Липиды также могут быть цвиттерионными, т. е., нейтральные молекулы как с положительным, так и отрицательным зарядом.

Фосфолипиды

[0530] Липидная композиция композиции липидных наночастиц, описанная в данном документе, может содержать один или несколько фосфолипидов, например, один или несколько насыщенных или (поли)ненасыщенных фосфолипидов, или их комбинацию. Как правило, фосфолипиды содержат фосфолипидный фрагмент и один или более фрагментов жирных кислот.

[0531] Фосфолипидный фрагмент может быть выбран, например, из неограничивающей группы, состоящей из фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилглицерина, фосфатидилсерина, фосфатидовой кислоты, 2-лизофосфатидилхолина и сфингомиелина.

[0532] Фрагмент жирной кислоты может быть выбран, например, из неограничивающей группы, состоящей из лауриновой кислоты, миристиновой кислоты, миристолевой кислоты, пальмитиновой кислоты, пальмитолеиновой кислоты, стеариновой кислоты, олеиновой кислоты, линолевой кислоты, альфа-линоленовой кислоты, эруковой кислоты, фитановой кислоты, арахидиновой кислоты, арахидоновой кислоты, эйкозапентаеновой кислоты, бегеновой кислоты, докозапентаеновой кислоты и докозагексаеновой кислоты.

[0533] Конкретные фосфолипиды могут облегчать слияние с мембраной. Например, катионный фосфолипид может взаимодействовать с одним или более отрицательно заряженными фосфолипидами мембраны (например, клеточной или внутриклеточной мембраны). Слияние фосфолипида с мембраной может позволить одному или более элементам (например, терапевтическому агенту)

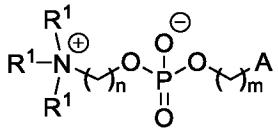
липидсодержащей композиции (например, ЛНЧ) проходить через мембрану, обеспечивая, например, доставку одного или более элементов к целевой ткани.

[0534] Также предусмотрены неприродные виды фосфолипидов, включая природные виды с модификациями и заменами, включая разветвление, окисление, циклизацию и алкины. Например, фосфолипид может быть функционализован или перекрестно-сшит с одним или более алкинами (например, алкенильной группой, в которой одна или более двойных связей заменены тройной связью). При соответствующих условиях реакции алкиновая группа может подвергаться катализируемой медью циклоприсоединению при воздействии азида. Такие реакции могут быть полезны для функционализации липидного бислоя композиции наночастиц для облегчения проникновения через мембрану или клеточного распознавания или для конъюгации композиции наночастиц с полезным компонентом, таким как нацеливающий фрагмент или фрагмент для визуализации (например, краситель).

[0535] Фосфолипиды включают в себя, помимо прочего, глицерофосфолипиды, такие как фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины, фосфатидилсерины, фосфатидилинозитолы, фосфатидилглицерины и фосфатидные кислоты. Фосфолипиды также включают фосфосфинголипид, такой как сфингомиелин.

[0536] В некоторых вариантах осуществления фосфолипид по изобретению включает 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE), 1,2-дилинолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DLPC), 1,2-димиристоил-sn-глицерофосфохолин (DMPC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC), 1,2-диундеканоил-sn-глицеро-фосфохолин (DUPC), 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (POPC), 1,2-ди-O-октадеценил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:0 Diether PC), 1-олеоил-2-холестерилгемисукциноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (OChemsPC), 1-гексадецил-sn-глицеро-3-фосфохолин (C16 Lyso PC), 1,2-дилиноленоил-sn-глицеро-3-фосфохолин, 1,2-диарахидоноил-sn-глицеро-3-фосфохолин, 1,2-дидокозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин, 1,2-дифитаноил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ME 16.0 PE), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин, 1,2-дилинолеил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин, 1,2-дилиноленоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин, 1,2-диарахидоноил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин, 1,2-дидокозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин, 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфо-рац-(1-глицерин) натриевая соль (DOPG), сфингомиелин и их смеси.

[0537] В определенных вариантах осуществления фосфолипид, применимый или потенциально применимый в данном изобретении, представляет собой аналог или вариант DSPC. В определенных вариантах осуществления фосфолипид, полезный или потенциально полезный в данном изобретении, представляет собой соединение формулы (**IV**):



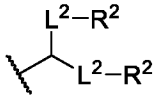
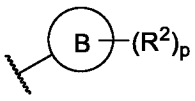
(**IV**),

или его соль, где

каждый R^1 независимо представляет собой необязательно замещенный алкил; или необязательно два R^1 соединены вместе с промежуточными атомами с образованием необязательно замещенного моноциклического карбоциклила или необязательно замещенного моноциклического гетероциклила; или необязательно три R^1 соединены вместе с промежуточными атомами с образованием необязательно замещенного бициклического карбоциклила или необязательно замещенного бициклического гетероциклила;

n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

A имеет формулу  или ;

каждый пример L^2 независимо представляет собой связь или необязательно замещенный C_{1-6} алкилен, где одно метиленовое звено необязательно замещенного C_{1-6} алкилена необязательно заменено O, $N(R^N)$, S, C(O), $C(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)$, C(O)O, OC(O), OC(O)O, $OC(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)O$, или $NR^NC(O)N(R^N)$;

каждый пример R^2 независимо представляет собой необязательно замещенный C_{1-30} алкил, необязательно замещенный C_{1-30} алкенил или необязательно замещенный C_{1-30} алкинил; необязательно, где одно или более метиленовых звеньев R^2 независимо замещены необязательно замещенным карбоциклиленом, необязательно замещенным гетероциклиленом, необязательно замещенным ариленом, необязательно замещенным гетероариленом, $N(R^N)$, O, S, C(O), $C(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)$, $NR^NC(O)N(R^N)$, C(O)O, OC(O), OC(O)O, $OC(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)O$, C(O)S, SC(O), $C(=NR^N)$, $C(=NR^N)N(R^N)$, $NR^NC(=NR^N)$, $NR^NC(=NR^N)N(R^N)$, C(S), $C(S)N(R^N)$, $NR^NC(S)$, $NR^NC(S)N(R^N)$, S(O), OS(O), S(O)O, OS(O)O, $OS(O)_2$, $S(O)_2O$, $OS(O)_2O$, $N(R^N)S(O)$, $S(O)N(R^N)$, $N(R^N)S(O)N(R^N)$, $OS(O)N(R^N)$,

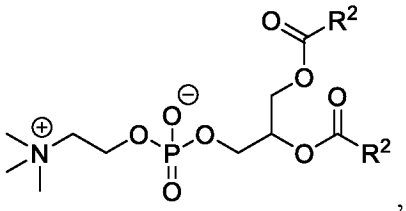
$N(R^N)S(O)O$, $S(O)_2$, $N(R^N)S(O)_2$, $S(O)_2N(R^N)$, $N(R^N)S(O)_2N(R^N)$, $OS(O)_2N(R^N)$ или $N(R^N)S(O)_2O$;

каждый пример R^N независимо представляет собой водород, необязательно замещенный алкил или защитную группу азота;

Кольцо B представляет собой необязательно замещенный карбоциклил, необязательно замещенный гетероциклил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил; и

p представляет собой 1 или 2;

при условии, что соединение не имеет формулу:



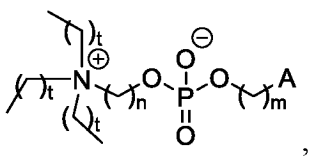
,

где каждый пример R^2 независимо представляет собой незамещенный алкил, незамещенный алкенил или незамещенный алкинил.

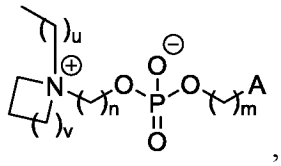
[0538] В некоторых вариантах осуществления фосфолипиды могут представлять собой один или более из фосфолипидов, описанных в заявке на патент США № 62/520530.

i) Модификации фосфолипидной головки

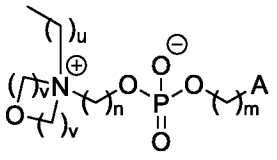
[0539] В некоторых вариантах осуществления фосфолипид, полезный или потенциально полезный в данном изобретении, содержит модифицированную фосфолипидную головку (*например*, модифицированную холиновую группу). В некоторых вариантах осуществления фосфолипид с модифицированной головкой представляет собой DSPC или его аналог с модифицированным четвертичным амином. Например, в вариантах осуществления формулы (**IV**) по меньшей мере один из R^1 не является метилом. В некоторых вариантах по меньшей мере один из R^1 не является водородом или метилом. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (**IV**) имеет одну из следующих формул:



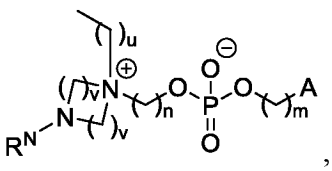
,



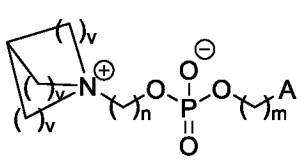
,



,



,



,

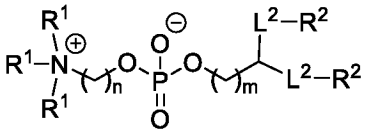
или его соль, где

каждый t независимо представляет собой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

каждый u независимо представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10; и

каждый v независимо представляет собой 1, 2 или 3.

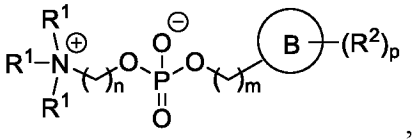
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (**IV**) имеет формулу (**IV-a**):



(**IV-a**),

или его соль.

[0540] В определенных вариантах осуществления фосфолипид, полезный или потенциально полезный в данном изобретении, содержит циклический фрагмент вместо глицеридного фрагмента. В конкретных вариантах осуществления фосфолипид, применимый в данном изобретении, представляет собой DSPC или его аналог, с циклическим фрагментом на месте глицеринового фрагмента. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (**IV**) имеет формулу (**IV-b**):



,

(**IV-b**),

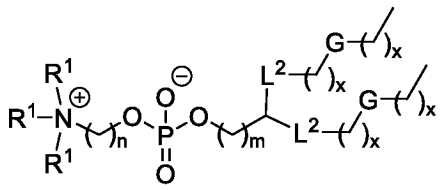
или его соль.

(ii) Модификации фосфолипидного хвоста

[0541] В определенных вариантах осуществления фосфолипид, полезный или потенциально полезный в данном изобретении, содержит модифицированный хвост. В определенных вариантах осуществления фосфолипид, подходящий или потенциально подходящий для настоящего изобретения, представляет собой DSPC или его аналог, с модифицированным хвостом. Как описано в данном документе, «модифицированный хвост» может быть хвостом с более короткими или более длинными алифатическими цепями, алифатическими цепями с введенным разветвлением, алифатическими цепями с введенными заместителями, алифатическими цепями, в которых один или более метиленов замещены циклическими или гетероатомными группами, или с любой их комбинацией. Например, в некоторых вариантах осуществления соединение (**IV**) имеет формулу

(**IV-a**) или его соль, где по меньшей мере один пример R^2 представляет собой каждый пример R^2, необязательно замещенный C_{1-30} алкилом, причем один или больше метиленовых звеньев R^2 независимо замещены необязательно замещенным карбоциклиленом, необязательно замещенным гетероциклиленом, необязательно замещенным ариленом, необязательно замещенным гетероариленом, $N(R^N)$, O, S, C(O), $C(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)$, $NR^NC(O)N(R^N)$, C(O)O, OC(O), OC(O)O, $OC(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)O$, C(O)S, SC(O), $C(=NR^N)$, $C(=NR^N)N(R^N)$, $NR^NC(=NR^N)$, $NR^NC(=NR^N)N(R^N)$, C(S), $C(S)N(R^N)$, $NR^NC(S)$, $NR^NC(S)N(R^N)$, S(O), OS(O), S(O)O, OS(O)O, $OS(O)_2$, $S(O)_2O$, $OS(O)_2O$, $N(R^N)S(O)$, $S(O)N(R^N)$, $N(R^N)S(O)N(R^N)$, $OS(O)N(R^N)$, $N(R^N)S(O)O$, $S(O)_2$, $N(R^N)S(O)_2$, $S(O)_2N(R^N)$, $N(R^N)S(O)_2N(R^N)$, $OS(O)_2N(R^N)$ или $N(R^N)S(O)_2O$.

[0542] В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (**IV**) имеет формулу (**IV-c**):



(**IV-c**),

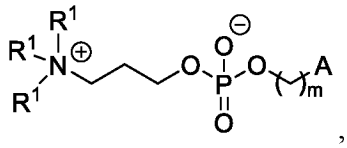
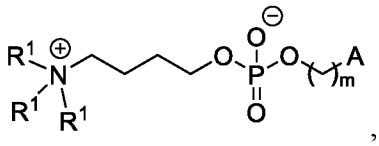
или его соль, где

каждый x независимо представляет собой целое число от 0 до 30 включительно; и

каждый пример G независимо выбирают из группы, состоящей из необязательно замещенного карбоциклилена, необязательно замещенного гетероциклилена, необязательно замещенного арилена, необязательно замещенного гетероарилена, $N(R^N)$, O, S, C(O), $C(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)$, $NR^NC(O)N(R^N)$, C(O)O, OC(O), OC(O)O, $OC(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)O$, C(O)S, SC(O), $C(=NR^N)$, $C(=NR^N)N(R^N)$, $NR^NC(=NR^N)$, $NR^NC(=NR^N)N(R^N)$, C(S), $C(S)N(R^N)$, $NR^NC(S)$, $NR^NC(S)N(R^N)$, S(O), OS(O), S(O)O, OS(O)O, $OS(O)_2$, $S(O)_2O$, $OS(O)_2O$, $N(R^N)S(O)$, $S(O)N(R^N)$, $N(R^N)S(O)N(R^N)$, $OS(O)N(R^N)$, $N(R^N)S(O)O$, $S(O)_2$, $N(R^N)S(O)_2$, $S(O)_2N(R^N)$, $N(R^N)S(O)_2N(R^N)$, $OS(O)_2N(R^N)$ или $N(R^N)S(O)_2O$. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления данного изобретения.

[0543] В некоторых вариантах осуществления фосфолипид, полезный или потенциально полезный в данном изобретении, содержит модифицированный фосфохолиновый фрагмент, где алкильная цепь, связывающая четвертичный амин с фосфорильной группой, не является этиленом (*например*, n не равен 2). Следовательно, в определенных вариантах осуществления фосфолипид, полезный или потенциально полезный в данном изобретении, представляет собой соединение формулы (**IV**), где n равно 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Например, в определенных

вариантах осуществления соединение формулы (**IV**) имеет одну из следующих формул:


,

,

или его соль.

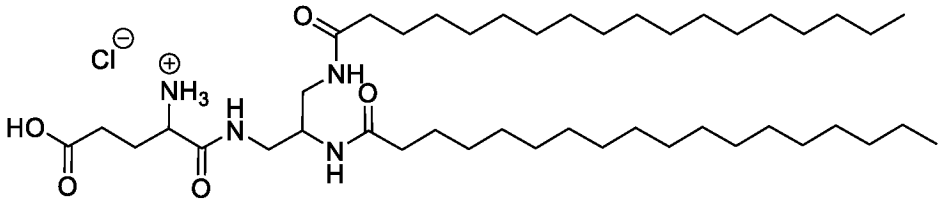
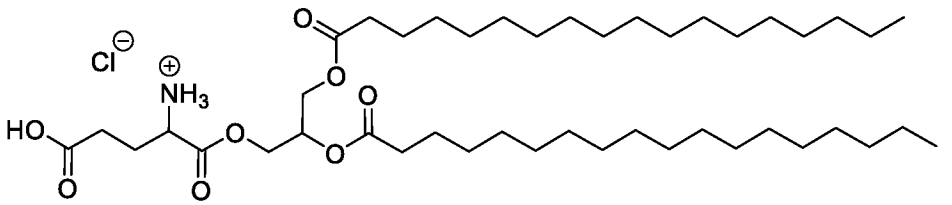
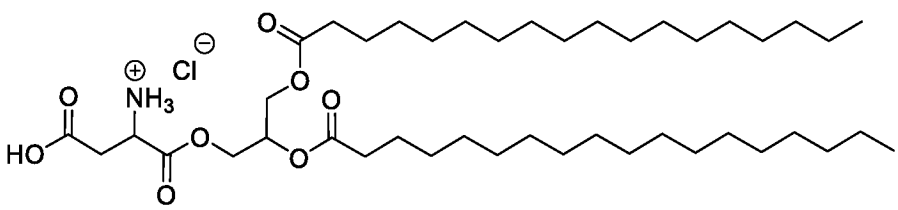
Альтернативные липиды

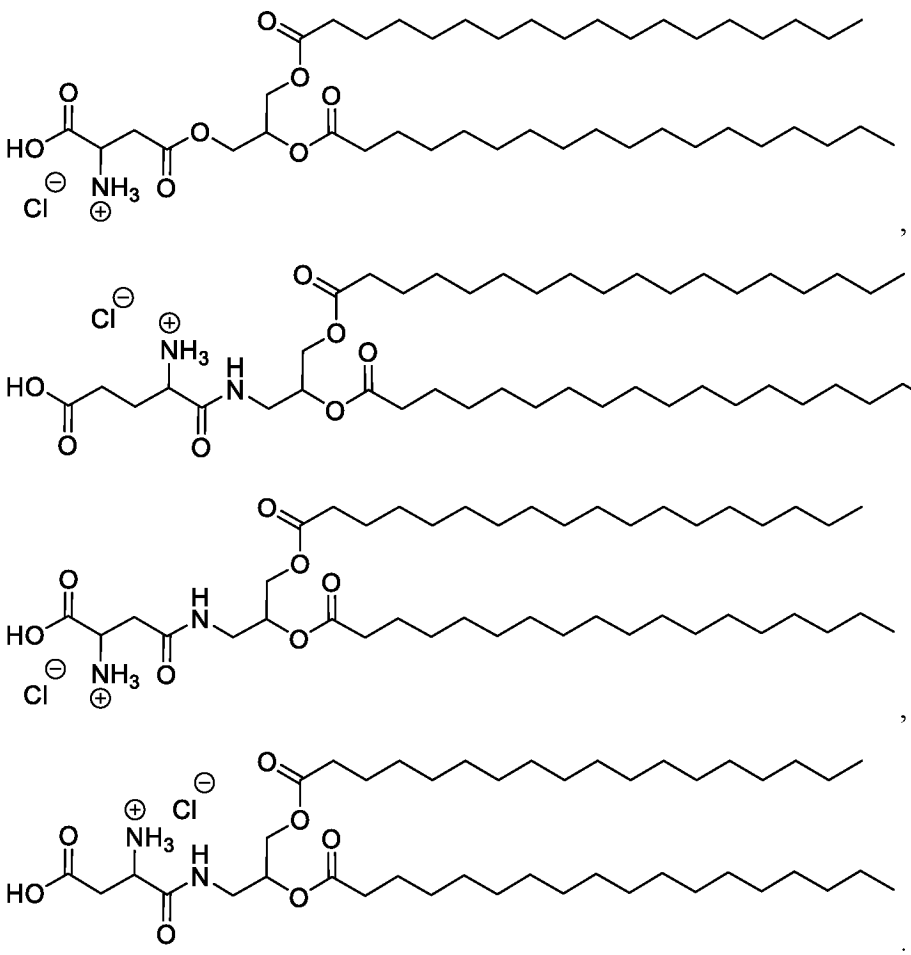
[0544] В некоторых вариантах осуществления фосфолипид, полезный или потенциально полезный в данном изобретении, содержит модифицированный фосфохолиновый фрагмент, где алкильная цепь, связывающая четвертичный амин с фосфорильной группой, не является этиленом (*например*, n не равен 2). Следовательно, в определенных вариантах осуществления фосфолипид пригодный.

[0545] В конкретных вариантах осуществления альтернативный липид применяют вместо фосфолипида по данному изобретению.

[0546] В некоторых вариантах осуществления альтернативный липид по изобретению представляет собой олеиновую кислоту.

[0547] В некоторых вариантах осуществления альтернативный липид представляет собой один из следующих:


,

,

,



Структурные липиды

[0548] Липидная композиция фармацевтической композиции, раскрытая в данном документе, может содержать один или более структурных липидов. Используемый в данном документе термин «структурный липид» относится к стеринам, а также к липидам, содержащим фрагменты стеринов.

[0549] Включение структурных липидов в липидную наночастицу может помочь уменьшить агрегацию других липидов в частице. Структурные липиды могут быть выбраны из группы, включающей, но не ограничиваются этим, холестерин, фекостерин, ситостерин, эргостерин, кампестерин, стигмастерин, брассикастерин, томатидин, томатин, урсоловую кислоту, альфа-токоферол, гопаноиды, фитостерины, стероиды и их смеси. В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой стерин. Как здесь определено, «стерины» представляют собой подгруппу стероидов, состоящую из стероидных спиртов. В определенных вариантах осуществления структурный липид представляет собой стероид. В определенных вариантах осуществления структурный липид

представляет собой холестерин. В определенных вариантах осуществления структурный липид представляет собой аналог холестерина. В определенных вариантах осуществления структурный липид представляет собой альфа-токоферол.

[0550] В некоторых вариантах осуществления структурные липиды могут представлять собой один или более из структурных липидов, описанных в заявке США № 62/520 530.

Полиэтиленгликолевые (ПЭГ)-липиды

[0551] Липидная композиция фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе, может содержать один или более полиэтиленгликоль (ПЭГ)-липидов.

[0552] Используемый в данном документе термин «ПЭГ-липид» относится к липидам, модифицированным полиэтиленгликолем (ПЭГ). Неограничивающие примеры ПЭГ-липидов включают ПЭГ-модифицированные фосфатидилэтаноламин и фосфатидную кислоту, конъюгаты ПЭГ-церамиды (например, ПЭГ-CerC14 или ПЭГ-CerC20), ПЭГ-модифицированные диалкиламины и ПЭГ-модифицированные 1,2-диацилоксипропан-3-амины. Такие липиды также называют пегилированными липидами. Например, ПЭГ-липид может представлять собой липид ПЭГ-c-DOMG, ПЭГ-DMG, ПЭГ-DLPE, ПЭГ-DMPE, ПЭГ-DPPC, или ПЭГ-DSPE.

[0553] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид включает, но не ограничивается ими, 1,2-димиристоил-sn-глицерин метоксиполиэтиленгликоль (ПЭГ-DMG), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[амино(полиэтиленгликоль)] (ПЭГ-DSPE), ПЭГ-дистерилглицерин (ПЭГ-DSG), ПЭГ-дипалметолеил, ПЭГ-диолеил, ПЭГ-дистеарил, ПЭГ-диацилгликамид (ПЭГ-DAG), ПЭГ-дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (ПЭГ-DPPE) или ПЭГ-1,2-димиристилоксилпропил-3-амин (ПЭГ-c-DMA).

[0554] В одном варианте осуществления ПЭГ-липид выбирают из группы, состоящей из ПЭГ-модифицированного фосфатидилэтаноламина, ПЭГ-модифицированной фосфатидной кислоты, ПЭГ-модифицированного церамида, ПЭГ-модифицированного диалкиламина, ПЭГ-модифицированного диацилглицерина, ПЭГ-модифицированного диалкилглицерина и их смеси.

[0555] В некоторых вариантах осуществления липидный фрагмент ПЭГ-липидов включает такие, которые имеют длину от около C_{14} до около C_{22}, предпочтительно от около C_{14} до около C_{16}. В некоторых вариантах осуществления фрагмент ПЭГ, например mПЭГ-NH_2, имеет размер около 1000, 2000, 5000, 10000, 15000 или 20000

дальтон. В одном варианте осуществления ПЭГ-липид представляет собойПЭГ$_{2k}$-DMG.

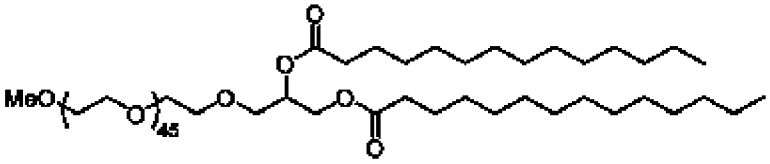
[0556] В одном варианте осуществления описанные в данном документе липидные наночастицы могут содержать ПЭГ-липид, который представляет собой недиффундирующий ПЭГ. Неограничивающие примеры недиффундирующих ПЭГ включают ПЭГ-DSG и ПЭГ-DSPE.

[0557] ПЭГ-липиды известны в данной области техники, такие как те, которые описаны в патенте США № 8158601 и публикации международной заявки № WO 2015/130584 A2, которые включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

[0558] В целом, некоторые из других липидных компонентов (например, ПЭГ-липидов) различных формул, описанных в данном документе, могут быть синтезированы, как описано в международной заявке на патент № PCT/US2016/000129, поданной 10 декабря 2016 года, под названием «Композиции и способы для доставки терапевтических средств», которая включена во всей полноте посредством ссылки.

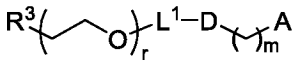
[0559] Липидный компонент композиции липидных наночастиц может включать одну или более молекул, содержащие полиэтиленгликоль, такие как ПЭГ или ПЭГ-модифицированные липиды. Такие виды могут в альтернативном варианте называться пэгилированными липидами. ПЭГ-липид представляет собой липид, модифицированный полиэтиленгликолем. ПЭГ-липид может быть выбран из неограничивающей группы, включая ПЭГ-модифицированные фосфатидилэтаноламины, ПЭГ-модифицированные фосфатидные кислоты, ПЭГ-модифицированные церамиды, ПЭГ-модифицированные диалкиламины, ПЭГ-модифицированные диацилглицерины, ПЭГ-модифицированные диалкилглицерины и их смеси. Например, ПЭГ-липид может представлять собой липид ПЭГ-c-DOMG, ПЭГ-DMG, ПЭГ-DLPE, ПЭГ- DMPE, ПЭГ-DPPC или ПЭГ-DSPE.

[0560] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-модифицированные липиды представляют собой модифицированные формы ПЭГ DMG. ПЭГ-DMG имеет следующую структуру:



[0561] В одном варианте осуществления ПЭГ-липиды, используемые в данном изобретении, могут представлять собой пегилированные липиды, описанные в международной публикации № WO2012099755, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки. Любой из этих иллюстративных ПЭГ-липидов, описанных в данном документе, может быть модифицирован для включения гидроксильной группы в цепь ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой ПЭГ-ОН липид. Как обычно определено в данном документе, «ПЭГ-ОН липид» (также называемый в данном документе «гидрокси-пегилированный липид») представляет собой пегилированный липид, имеющий одну или более гидроксильных (-ОН) групп в липиде. В определенных вариантах осуществления ПЭГ-ОН липид содержит одну или более гидроксильных групп в цепи ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-ОН или гидрокси-пегилированный липид содержит группу -ОН в конце цепи ПЭГ. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

[0562] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид, используемый в данном изобретении, представляет собой соединение формулы (**V**). В данном документе представлены соединения формулы (**V**):



(**V**),

или их соли, где:

R^3 представляет собой $–OR^O$;

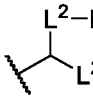
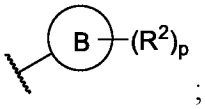
R^O представляет собой водород, необязательно замещенный алкил или защитную группу кислорода;

r представляет собой целое число от 1 до 100, включительно;

L^1 представляет собой необязательно замещенный C_{1-10} алкилен, при этом по меньшей мере один метилен из необязательно замещенного C_{1-10} алкилена независимо заменен необязательно замещенным карбоциклиленом, необязательно замещенным гетероциклиленом, необязательно замещенным ариленом, необязательно замещенным гетероариленом, O, $N(R^N)$, S, C(O), $C(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)$, C(O)O, OC(O), OC(O)O, $OC(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)O$ или $NR^NC(O)N(R^N)$;

D представляет собой фрагмент, полученный посредством клик-химии, или фрагмент, расщепляемый в физиологических условиях;

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

А имеет формулу  или ;

каждый пример L^2 независимо представляет собой связь или необязательно замещенный C_{1-6} алкилен, где одно метиленовое звено необязательно замещенного C_{1-6} алкилена необязательно заменено O, $N(R^N)$, S, C(O), $C(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)$, C(O)O, OC(O), OC(O)O, $OC(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)O$, или $NR^NC(O)N(R^N)$;

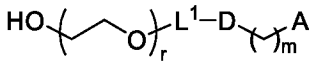
каждый пример R^2 независимо представляет собой необязательно замещенный C_{1-30} алкил, необязательно замещенный C_{1-30} алкенил или необязательно замещенный C_{1-30} алкинил; необязательно, где одно или более метиленовых звеньев R^2 независимо замещены необязательно замещенным карбоциклиленом, необязательно замещенным гетероциклиленом, необязательно замещенным ариленом, необязательно замещенным гетероариленом, $N(R^N)$, O, S, C(O), $C(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)$, $NR^NC(O)N(R^N)$, C(O)O, OC(O), OC(O)O, $OC(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)O$, C(O)S, SC(O), $C(=NR^N)$, $C(=NR^N)N(R^N)$, $NR^NC(=NR^N)$, $NR^NC(=NR^N)N(R^N)$, C(S), $C(S)N(R^N)$, $NR^NC(S)$, $NR^NC(S)N(R^N)$, S(O) , OS(O), S(O)O, OS(O)O, $OS(O)_2$, $S(O)_2O$, $OS(O)_2O$, $N(R^N)S(O)$, $S(O)N(R^N)$, $N(R^N)S(O)N(R^N)$, $OS(O)N(R^N)$, $N(R^N)S(O)O$, $S(O)_2$, $N(R^N)S(O)_2$, $S(O)_2N(R^N)$, $N(R^N)S(O)_2N(R^N)$, $OS(O)_2N(R^N)$, или $N(R^N)S(O)_2O$;

каждый пример R^N независимо представляет собой водород, необязательно замещенный алкил или защитную группу азота;

Кольцо B представляет собой необязательно замещенный карбоциклил, необязательно замещенный гетероциклил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил; и

p представляет собой 1 или 2.

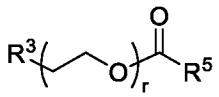
[0563] В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (**V**) представляет собой ПЭГ-ОН липид (*m.e.* R^3 представляет собой $-OR^O$, и R^O представляет собой водород). В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (**V**) имеет формулу (**V-OH**):

 (V-OH),

или его соль.

[0564] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид, используемый в данном изобретении, представляет собой пегилированную жирную кислоту. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид, используемый в данном изобретении, представляет собой соединение формулы (**VI**). В данном документе представлены

соединения формулы (**VI**):



(**VI**),

или его соли, где:

R^3 представляет собой $-OR^O$;

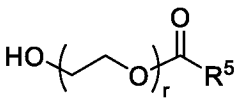
R^O представляет собой водород, необязательно замещенный алкил или защитную группу кислорода;

r представляет собой целое число от 1 до 100, включительно;

R^5 представляет собой необязательно замещенный C_{10-40} алкил, необязательно замещенный C_{10-40} алкенил или необязательно замещенный C_{10-40} алкинил; и необязательно одну или более метиленовых групп R^5 заменяют необязательно замещенным карбоциклиленом, необязательно замещенным гетероциклиленом, необязательно замещенным ариленом, необязательно замещенным гетероариленом, $N(R^N)$, O, S, C(O), $C(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)$, $NR^NC(O)N(R^N)$, C(O)O, OC(O), OC(O)O, $OC(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)O$, C(O)S, SC(O), $C(=NR^N)$, $C(=NR^N)N(R^N)$, $NR^NC(=NR^N)$, $NR^NC(=NR^N)N(R^N)$, C(S), $C(S)N(R^N)$, $NR^NC(S)$, $NR^NC(S)N(R^N)$, S(O), OS(O), S(O)O, OS(O)O, $OS(O)_2$, $S(O)_2O$, $OS(O)_2O$, $N(R^N)S(O)$, $S(O)N(R^N)$, $N(R^N)S(O)N(R^N)$, $OS(O)N(R^N)$, $N(R^N)S(O)O$, $S(O)_2$, $N(R^N)S(O)_2$, $S(O)_2N(R^N)$, $N(R^N)S(O)_2N(R^N)$, $OS(O)_2N(R^N)$, или $N(R^N)S(O)_2O$; и

каждый пример R^N независимо представляет собой водород, необязательно замещенный алкил или защитную группу азота.

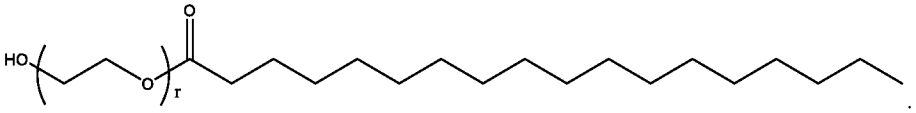
[0565] В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (**VI**) имеет формулу (**VI-OH**):



(VI-OH),

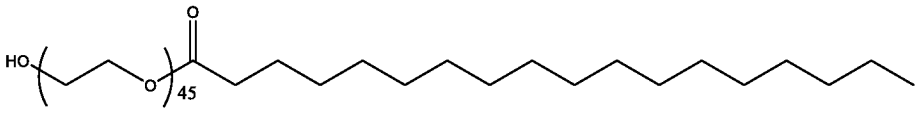
или его соль. В некоторых вариантах осуществления r равен 45.

[0566] В еще других вариантах осуществления соединение формулы (VI) представляет собой:



или его соль.

[0567] В одном варианте осуществления соединение формулы (VI) представляет собой



(Соединение I).

[0568] В некоторых аспектах липидная композиция фармацевтических композиций, раскрытых в данном документе, не содержит ПЭГ-липид.

[0569] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липиды могут представлять собой один или более ПЭГ-липидов, описанных в заявке на патент США № 62/520530.

[0570] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид по изобретению содержит ПЭГ-модифицированный фосфатидилэтаноламин, ПЭГ-модифицированную фосфатидную кислоту, ПЭГ-модифицированный церамид, ПЭГ-модифицированный фосфатный диалкиламин, ПЭГ-модифицированный диацилглицерин, ПЭГ-модифицированный диалкилглицерин и их смеси. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-модифицированный липид представляет собой ПЭГ-DMG, ПЭГ-c-DOMG (также называемый ПЭГ-DOMG), ПЭГ-DSG и/или ПЭГ-DPG.

[0571] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по изобретению содержит ионизируемый катионный липид любой из формул I, II или III, фосфолипид, содержащий DSPC, структурный липид и ПЭГ-липид, содержащий ПЭГ-DMG.

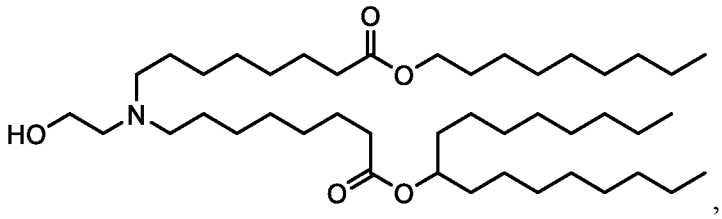
[0572] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по изобретению содержит ионизируемый катионный липид любой из формул I, II или III, фосфолипид, содержащий DSPC, структурный липид и ПЭГ-липид, содержащий соединение формулы VI.

[0573] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по изобретению содержит ионизируемый катионный липид формулы I, II или III, фосфолипид, содержащий соединение формулы IV, структурный липид и ПЭГ-липид, содержащий соединение формулы V или VI.

[0574] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по изобретению содержит ионизируемый катионный липид формулы I, II или III, фосфолипид, содержащий соединение формулы IV, структурный липид и ПЭГ-липид, содержащий соединение формулы V или VI.

[0575] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по изобретению содержит ионизируемый катионный липид формулы I, II или III, фосфолипид формулы IV, структурный липид и ПЭГ-липид, содержащий соединение формулы VI.

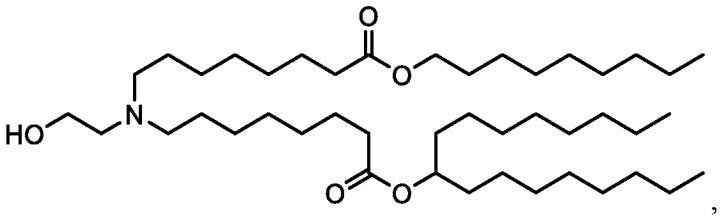
[0576] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по изобретению содержит ионизируемый катионный липид



,

и ПЭГ-липид, содержащий соединение формулы VI.

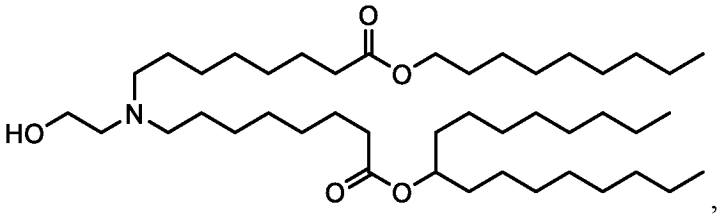
[0577] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по изобретению содержит ионизируемый катионный липид



,

и альтернативный липид, содержащий олеиновую кислоту.

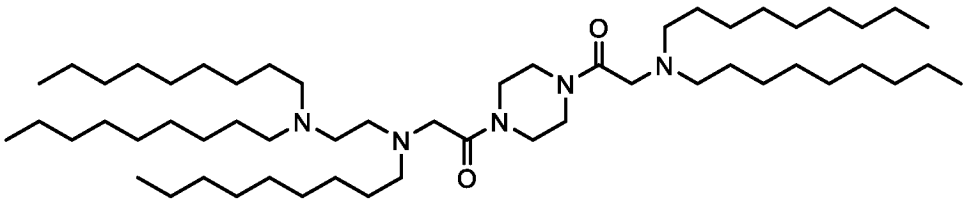
[0578] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по изобретению содержит ионизируемый катионный липид



,

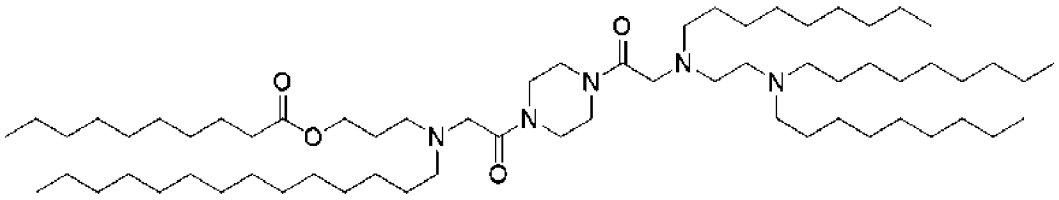
альтернативный липид, содержащий олеиновую кислоту, структурный липид, содержащий холестерин, и ПЭГ-липид, содержащий соединение формулы VI.

[0579] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по изобретению содержит ионизируемый катионный липид



фосфолипид, содержащий DOPE, структурный липид, содержащий холестерин, и ПЭГ-липид, содержащий соединение формулы VI.

[0580] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по изобретению содержит ионизируемый катионный липид



,

фосфолипид, содержащий DOPE, структурный липид, содержащий холестерин, и ПЭГ-липид, содержащий соединение формулы VII.

[0581] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по изобретению имеет соотношение N:P от около 2:1 до около 30:1.

[0582] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по изобретению имеет соотношение N:P около 6:1.

[0583] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по изобретению имеет отношение N:P около 3:1.

[0584] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по данному изобретению имеет соотношение мас./мас. ионизируемого катионного липидного компонента к РНК от около 10:1 до около 100:1.

[0585] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по изобретению имеет соотношение мас./мас. ионизируемого катионного липидного компонента к РНК около 20:1.

[0586] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по изобретению имеет соотношение мас./мас. ионизируемого катионного липидного компонента к РНК около 10:1.

[0587] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по изобретению имеет средний диаметр от около 50 нм до около 150 нм.

[0588] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по изобретению имеет средний диаметр от около 70 нм до около 120 нм.

[0589] Используемый в данном документе термин «алкил», «алкильная группа» или «алкилен» означает линейный или разветвленный насыщенный углеводород, включающий один или несколько атомов углерода (например, один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать, двадцать или более атомов углерода), который необязательно замещенный. Обозначение «С1-14 алкил» означает необязательно замещенный линейный или разветвленный насыщенный углеводород, содержащий от 1 до 14 атомов углерода. Если не указано иное алкильная группа, описанная в данном

документе, относится как к незамещенным, так и замещенным алкильным группам.

[0590] Используемый в данном документе термин «алкенил», «алкенильная группа» или «алкенилен» означает линейный или разветвленный углеводород, включающий два или более атомов углерода (например, один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать, двадцать или более атомов углерода) и по меньшей мере одну двойную связь, который необязательно замещенный. Обозначение «C2-14 алкенил» означает необязательно замещенный линейный или разветвленный углеводород, включающий 2-14 атомов углерода и по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь. Алкенильная группа может содержать одну, две, три, четыре или более углерод-углеродных двойных связей. Например, C18-алкенил может включать одну или несколько двойных связей. Алкенильная группа C18, включающая две двойные связи, может представлять собой линолеильную группу. Если не указано иное, алкенильная группа, описанная в данном документе, относится как к незамещенной, так и замещенной алкенильным группам.

[0591] Используемый в данном документе термин «алкинил», «алкинильная группа» или «алкинилен» означает линейный или разветвленный углеводород, включающий два или более атомов углерода (например, один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать, двадцать или более атомов углерода) и по меньшей мере одну углерод-углеродную тройную связь, который необязательно замещенный. Обозначение «C2-14 алкинил» означает необязательно замещенный линейный или разветвленный углеводород, включающий 2-14 атомов углерода и по меньшей мере одну углерод-углеродную тройную связь. Алкинильная группа может содержать одну, две, три, четыре или более углерод-углеродных тройных связей. Например, C18-алкинил может включать одну или несколько углерод-углеродных тройных связей. Если не указано иное, алкинильная группа, описанная в данном документе, относится как к незамещенной, так и замещенной алкинильным группам.

[0592] В контексте данного документа термин «карбоцикл» или «карбоциклическая группа» означает необязательно замещенную моно- или полициклическую систему, включающую одно или более колец атомов углерода. Кольца могут представлять собой трех-, четырех-, пяти-, шести-, семи-, восьми-, девяти-, десяти-, одиннадцати-, двенадцати-, тринадцати-, четырнадцати-, пятнадцати-, шестнадцати-, семнадцати-

, восемнадцати-, девятнадцати- или двадцати-членные кольца. Обозначение «С3-6 карбоцикл» означает карбоцикл, включающий одно кольцо, содержащее 3-6 атомов углерода. Карбоциклы могут содержать одну или более углерод-углеродных двойных или тройных связей и могут быть неароматическими или ароматическими (например, циклоалкильные или арильные группы). Примеры карбоциклов включают циклопропильные, циклопентильные, циклогексильные, фенильные, нафтильные и 1,2-дигидронафтильные группы. В контексте данного документа термин «циклоалкил» означает неароматический карбоцикл и может содержать или не содержать любую двойную или тройную связь. Если не указано иное, карбоциклы, описанные в данном документе, относятся как к незамещенным, так и замещенным карбоцикличным группам, т. е., необязательно замещенным карбоциклам.

[0593] В контексте данного документа термин «гетероцикл» или «гетероциклическая группа» означает необязательно замещенную моно- или полициклическую систему, содержащую одно или более колец, где по меньшей мере одно кольцо содержит по меньшей мере один гетероатом. Гетероатомы могут представлять собой, например, атомы азота, кислорода или серы. Кольца могут представлять собой трех-, четырех-, пяти-, шести-, семи-, восьми-, девяти-, десяти-, одиннадцати-, двенадцати-, тринадцати- или четырнадцати-членные кольца. Гетероциклы могут включать одну или более двойных или тройных связей и могут быть неароматическими или ароматическими (например, гетероциклоалкильные или гетероарильные группы). Примеры гетероциклов включают имидазолильную, имидазолидинильную, оксазолильную, оксазолидинильную, тиазолильную, тиазолидинильную, пиразолидинильную, пиразолильную, изоксазолидинильную, изоксазолильную, изотиазолидинильную, изотиазолильную, морфолинильную, пирролильную, пирролидильную, фурильную, тиофенильную, пиридинильную, пиперидинильную, хинолильную и изохинолильную группы. В контексте данного документа термин «гетероциклоалкил» означает неароматический гетероцикл и может содержать или не содержать какую-либо двойную или тройную связь. Если не указано иное, гетероциклы, описанные в данном документе, относятся как к незамещенным и замещенным гетероциклическим группам, т. е., необязательно замещенным гетероциклам.

[0594] Используемый в данном документе термин «гетероалкил», «гетероалкенил» или «гетероалкинил» относится соответственно к алкильной, алкенильной, алкинильной группе, как определено в данном документе, которая дополнительно

содержит один или несколько (например, 1, 2, 3 или 4) гетероатомов (например, кислород, сера, азот, бор, кремний, фосфор), при этом один или несколько гетероатомов вставлены между соседними атомами углерода в исходной углеродной цепи, и/или один или несколько гетероатомов вставлены между атомом углерода и исходной молекулой, т. е. между точкой присоединения. Если не указано иное, гетероалкилы, гетероалкенилы или гетероалкинилы, описанные в данном документе, относятся как к незамещенным, так и к замещенным гетероалкилам, гетероалкенилам или гетероалкинилам, т.е. необязательно замещенным гетероалкилам, гетероалкенилам или гетероалкинилам.

[0595] В контексте данного документа «биоразлагаемая группа» представляет собой группу, которая может способствовать быстрому метаболизму липида в частице млекопитающего. Биоразлагаемая группа может быть выбрана из группы, состоящей из, помимо прочего, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, -S(O)2-, арильной группы и гетероарильной группы. В контексте данного документа термин «арильная группа» представляет собой необязательно замещенную карбоциклическую группу, содержащую одно или более ароматических колец. Примеры арильных групп включают фенильные и нафтильные группы. В контексте данного документа «гетероарильная группа» представляет собой необязательно замещенную гетероциклическую группу, содержащую одно или более ароматических колец. Примеры гетероарильных групп включают пирролил, фурил, тиофенил, имидазолил, оксазолил и тиазолил. Как арильная, так и гетероарильная группы могут быть необязательно замещены. Например, M и M’ могут быть выбраны из неограничивающей группы, состоящей из необязательно замещенного фенила, оксазола и тиазола. В представленных в данном документе формулах M и M’ могут быть независимо выбраны из списка представленных выше биоразлагаемых групп. Если не указано иное, арильная или гетероарильная группы, описанные в данном документе, относятся как к незамещенной, так и замещенной группам, т. е. необязательно замещенной арильной или гетероарильной группам.

[0596] Алкильная, алкенильная и циклильная (например, карбоциклильная и гетероциклильная) группы могут быть необязательно замещены, если не указано иное. Необязательные заместители могут быть выбраны из группы, состоящей, помимо прочего, из атома галогена (например, группы хлорида, бромида, фторида или йодида), карбоновой кислоты (например, C(O)OH), спирта (например, гидроксила, OH), сложного эфира (например, C(O)OR OC(O)R), альдегида

(например, C(O)H), карбонила (например, C(O)R, альтернативно представленный C=O), ацилгалогенида (например, C(O)X, в котором X представляет собой галогенид, выбранный из бромида, фторида, хлорида и йодида), карбоната (например, OC(O)OR), алкокси (например, OR), ацеталя (например, C(OR)2R"", в котором каждый OR представляет собой алкоксигруппы, которые могут быть одинаковыми или разными, а R"" представляет собой алкильную или алкенильную группу), фосфата (например, P(O)43-), тиола (например, SH), сульфоксида (например, S(O)R), сульфиновой кислоты (например, S(O)OH), сульфокислоты (например, S(O)2OH), тиаля (например, C(S)H), сульфата (например, S(O)42-), сульфонила (например, S(O)2), амида (например, C(O)NR2 или N(R)C(O)R), азидо (например, N3), нитро (например, NO2), циано (например, CN), изоциано (например, NC), ацилокси (например, OC(O)R), амино (например, NR2, NRH или NH2), карбамоила (например, OC(O)NR2, OC(O)NRH или OC(O)NH2), сульфонамида (например, S(O)2NR2, S(O)2NRH, S(O)2NH2, N(R)S(O)2R, N(H)S(O)2R, N(R)S(O)2H или N(H)S(O)2H), алкильной группы, алкенильной группы и циклильной (например, карбоциклильной или гетероциклильной) группы. В любом из предшествующих вариантов осуществления R представляет собой алкильную или алкенильную группу, как определено в данном документе. В некоторых вариантах осуществления сами группы заместителей могут быть дополнительно замещены, например, одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью или шестью заместителями, как определено в данном документе. Например, C16 алкильная группа может быть дополнительно замещена одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью или шестью заместителями, как описано в данном документе.

[0597] Соединения по изобретению, которые содержат атомы азота могут быть преобразованы в N-оксиды посредством обработки окисляющим средством (например, 3-хлорпероксибензойной кислотой (mCPBA) и/или пероксидами водорода) с получением других соединений по изобретению. Таким образом, считается, что все приведенные и заявленные азот-содержащие соединения, если позволяет валентность и структура, включают как показанное соединение, так и его N-оксидное производное (которое может обозначаться как N□O или N+-O-). Кроме того, в других случаях, атомы азота в соединениях по изобретению могут быть преобразованы в N-гидрокси- или N-алкокси-соединения. Например, N-гидрокси-соединения могут быть получены посредством окисления исходного амина окислителем, таким как m CPBA. Также считается, что все приведенные и заявленные содержащие азот соединения, если позволяет валентность и структура,

включают как продемонстрированное соединение, так и его N-гидрокси- (т.е., N-OH) и N-алкокси- (т.е., N-OR, где R представляет собой замещенный или незамещенный C1-C6 алкил, C1-C6 алкенил, C1-C6 алкинил, 3-14-членный карбоцикл или 3-14-членный гетероцикл) производные.

(vi) Другие компоненты липидной композиции

[0598] Липидная композиция фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе, может включать один или более компонентов в дополнение к тем, которые описаны выше. Например, липидная композиция может включать одну или более молекул усилителя проницаемости, углеводов, полимеров, агентов, изменяющих свойства поверхности, (например, поверхностно-активных веществ) или других компонентов. Например, молекула, усиливающая проницаемость, может представлять собой молекулу, описанную в публикации заявки на патент США № 2005/0222064. Углеводы могут включать простые сахара (например, глюкозу) и полисахариды (например, гликоген и его производные и аналоги).

[0599] Полимер может быть включен в и/или использован для инкапсулирования или частичного инкапсулирования фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе, (например, фармацевтической композиции в форме липидных наночастиц). Полимер может быть биоразлагаемым и/или биосовместимым. Полимер может быть выбран из, но не ограничиваются ими, полиаминов, простых полиэфиров, полиамидов, сложных полиэфиров, поликарбаматов, полиуретанов, поликарбонатов, полистиролов, полиимидов, полисульфонов, полиуретанов, полиацетиленов, полиэтиленов, полиэтилениминов, полиизоцианатов, полиакрилатов, полиметакрилатов, полиакрилонитрилов, и полиарилатов.

[0600] Соотношение между липидной композицией и полинуклеотидом может находиться в диапазоне от около 10:1 до около 60:1 (мас./мас.).

[0601] В некоторых вариантах осуществления соотношение между липидной композицией и полинуклеотидом может находиться в диапазоне от около 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1, 21:1, 22:1, 23:1, 24:1, 25:1, 26:1, 27:1, 28:1, 29:1, 30:1, 31:1, 32:1, 33:1, 34:1, 35:1, 36:1, 37:1, 38:1, 39:1, 40:1, 41:1, 42:1, 43:1, 44:1, 45:1, 46:1, 47:1, 48:1, 49:1, 50:1, 51:1, 52:1, 53:1, 54:1, 55:1, 56:1, 57:1, 58:1, 59:1 или 60:1 (мас./мас.). В некоторых вариантах осуществления соотношение массы липидной композиции к массе полинуклеотида, кодирующего терапевтический агент, составляет около 20:1 или около 15:1.

[0602] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция,

описанная в данном документе, может содержать более одного полипептида. Например, фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может содержать два или более полинуклеотидов (например, РНК, например, мРНК).

[0603] В одном варианте осуществления описанные в данном документе липидные наночастицы могут содержать полинуклеотиды (например, мРНК) в массовом соотношении липид:полинуклеотид 5:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1 или 70:1, или в диапазоне или любом из этих соотношений, таких как, но не ограничиваясь, от 5:1 до около 10:1, от около 5:1 до около 15:1, от около 5:1 до около 20:1, от около 5:1 до около 25:1, от около 5:1 до около 30:1, от около 5:1 до около 35:1, от около 5:1 до около 40:1, от около 5:1 до около 45:1, от около 5:1 до около 50:1, от около 5:1 до около 55:1. от около 5:1 до около 60:1, от около 5:1 до около 70:1, от около 10:1 до около 15:1, от около 10:1 до около 20:1, от около 10:1 до около 25:1, от около 10:1 до около 30:1, от около 10:1 до около 35:1, от около 10:1 до около 40:1, от около 10:1 до около 45:1, от около 10:1 до около 50:1, от около 10:1 до около 55:1, от около 10:1 до около 60:1, от около 10:1 до около 70:1, от около 15:1 до около 20:1, от около 15:1 до около 25:1, от около 15:1 до около 30:1, от около 15:1 до около 35:1, от около 15:1 до около 40:1, от около 15:1 до около 45:1, от около 15:1 до около 50:1, от около 15:1 до около 55:1, от около 15:1 до около 60:1 или от около 15:1 до около 70:1.

[0604] В одном варианте осуществления описанные в данном документе липидные наночастицы могут содержать полинуклеотид в концентрации от около 0,1 мг/мл до 2 мг/мл, такой как, но не ограничиваясь этим, 0,1 мг/мл, 0,2 мг/мл, 0,3 мг/мл, 0,4 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,6 мг/мл, 0,7 мг/мл, 0,8 мг/мл, 0,9 мг/мл, 1,0 мг/мл, 1,1 мг/мл, 1,2 мг/мл, 1,3 мг/мл, 1,4 мг/мл, 1,5 мг/мл, 1,6 мг/мл, 1,7 мг/мл, 1,8 мг/мл, 1,9 мг/мл, 2,0 мг/мл или более 2,0 мг/мл.

(vii) Композиции наночастиц

[0605] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, раскрытые в данном документе, составлены в виде липидных наночастиц (ЛНЧ). Соответственно, в данном изобретении также предложены композиции наночастиц, содержащие (i) липидную композицию, содержащую средство доставки, такое как соединение, описанное в данном документе, и (ii) полинуклеотид, кодирующий полипептид CFTR. В такой композиции наночастиц липидная композиция, описанная в данном документе, может инкапсулировать полинуклеотид, кодирующий полипептид CFTR.

[0606] Композиции наночастиц обычно имеют размер порядка микрометров или меньше и могут включать липидный бислой. Композиции наночастиц охватывают липидные наночастицы (ЛНЧ), липосомы (например, липидные везикулы) и липоплексы. Например, композиция наночастиц может представлять собой липосому, имеющую липидный бислой диаметром 500 нм или менее.

[0607] Композиции наночастиц включают, например, липидные наночастицы (ЛНЧ), липосомы и липоплексы. В некоторых вариантах осуществления композиции наночастиц представляют собой везикулы, содержащие один или более липидных бислоев. В определенных вариантах осуществления композиция наночастиц имеет два или более концентрических бислоев, разделенных водными компартментами. Липидные бислоя могут быть функционализированы и/или перекрестно-сшиты друг с другом. Липидные бислоя могут содержать один или более лигандов, белков или каналов.

[0608] В одном варианте осуществления липидная наночастица содержит ионизируемый липид, структурный липид, фосфолипид и мРНК. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит ионизируемый липид, ПЭГ-модифицированный липид, стерол и структурный липид. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеет молярное соотношение около 20-60% ионизируемых липидов: около 5-25% структурных липидов: около 25-55% стеролов; и около 0,5-15% ПЭГ-модифицированного липида.

[0609] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеет значение полидисперсности менее 0,4. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеет суммарный нейтральный заряд при нейтральном pH. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеет средний диаметр 50-150 нм. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеет средний диаметр 80-100 нм.

[0610] Как в целом определено в данном документе термин «липид» относится к малой молекуле, которая обладает гидрофобными или амфифильными свойствами. Липиды могут быть природными или синтетическими. Примеры классов липидов включают, но не ограничиваются ими, жиры, воски, стеринсодержащие метаболиты, витамины, жирные кислоты, глицеролипиды, глицерофосфолипиды, сфинголипиды, сахаролипиды и поликетиды и преноловые липиды. В некоторых случаях амфифильные свойства некоторых липидов приводят к тому, что они образуют липосомы, везикулы или мембраны в водных средах.

[0611] В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица (ЛНЧ) может содержать ионизируемый липид. Используемый в данном документе термин

«ионизируемый липид» имеет свое обычное значение в данной области техники и может относиться к липиду, содержащему один или более заряженных фрагментов. В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид может быть положительно заряженным или отрицательно заряженным. Ионизируемый липид может быть положительно заряженным, и в этом случае его можно назвать «катионным липидом». В определенных вариантах осуществления молекула ионизируемого липида может содержать аминогруппу и может упоминаться как ионизируемый аминолипид. Используемый в данном документе «заряженный фрагмент» представляет собой химический фрагмент, который несет формальный электронный заряд, например, одновалентный (+1 или -1), двухвалентный (+2 или -2), трехвалентный (+3 или -3) и т. д. Заряженный фрагмент может быть анионным (то есть отрицательно заряженным) или катионным (то есть положительно заряженным). Примеры положительно заряженных фрагментов включают аминогруппы (например, первичные, вторичные и/или третичные амины), аммониевые группы, пиридиниевую группу, гуанидиновые группы и имидизольные группы. В конкретном варианте осуществления заряженные фрагменты содержат аминогруппы. Примеры отрицательно заряженных групп или их предшественников включают карбоксилатные группы, сульфонатные группы, сульфатные группы, фосфонатные группы, фосфатные группы, гидроксильные группы и тому подобное. Заряд заряженного фрагмента может изменяться, в некоторых случаях, в зависимости от условий окружающей среды, например, изменения pH могут изменять заряд фрагмента и/или приводить к тому, что фрагмент становится заряженным или незаряженным. Как правило, плотность заряда молекулы может быть выбрана по желанию.

[0612] Следует понимать, что термины «заряженный» или «заряженный фрагмент» не относятся к «частичному отрицательному заряду» или «частичному положительному заряду» в молекуле. Термины «частичный отрицательный заряд» и «частичный положительный заряд» имеют обычное значение в данной области техники. «Частичный отрицательный заряд» может возникнуть, когда функциональная группа содержит связь, которая становится поляризованной так, что электронная плотность притягивается к одному атому связи, создавая частичный отрицательный заряд на атоме. Специалисты в данной области техники, как правило, определяют связи, которые могут поляризоваться таким образом.

[0613] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой ионизируемый аминолипид, иногда называемый в данной области техники

«ионизируемым катионным липидом». В одном варианте осуществления ионизируемый аминолипид может иметь положительно заряженную гидрофильную головку и гидрофобный хвост, которые связаны через линкерную структуру.

[0614] В дополнение к этому ионизируемый липид может также представлять собой липид, содержащий циклическую аминогруппу.

[0615] В одном варианте осуществления ионизируемый липид может быть выбран из, но не ограничиваясь этим, ионизируемого липида, описанного в международных публикациях №№ WO2013086354 и WO2013116126; содержание каждой из которых включено в полный объем в данный документ посредством ссылки.

[0616] В еще одном варианте осуществления ионизируемый липид может быть выбран из, но не ограничиваясь этим, формулы CLI-CLXXXXII патента США № 7404969; каждый из которых включен во всей полноте в данный документ посредством ссылки.

[0617] В одном варианте осуществления липид может представлять собой расщепляемый липид, такой как те, которые описаны в международной публикации № WO2012170889, включенной во всей полноте в данный документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления липид может быть синтезирован способами, известными в данной области техники и/или как описано в международных публикациях №№ WO2013086354; содержание каждой из которых включено во всей полноте в данный документ посредством ссылки.

[0618] Композиции наночастиц могут быть охарактеризованы различными способами. Например, микроскопия (например, трансмиссионная электронная микроскопия или сканирующая электронная микроскопия) может использоваться для изучения морфологии и распределения по размерам композиции наночастиц. Метод динамического рассеяния света или потенциометрия (например, потенциометрическое титрование) могут использоваться для измерения дзета-потенциалов. Метод динамического рассеяния света также может быть использован для определения размеров частиц. Такие инструменты, как Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Малверн, Вустершир, Великобритания), также могут использоваться для измерения множества характеристик композиции наночастиц, таких как размер частиц, коэффициент полидисперсности и дзета-потенциал.

[0619] Размер наночастиц может помочь противодействовать биологическим реакциям, таким как, но не ограничиваясь этим, воспаление, или может увеличить биологический эффект полинуклеотида.

[0620] Используемый в данном документе термин «размер» или «средний размер» в

контексте композиций наночастиц относится к среднему диаметру композиции наночастицы.

[0621] В одном варианте осуществления CFTR полинуклеотид, кодирующий полипептид, составлен в виде липидных наночастиц, имеющих диаметр от около 10 до около 100 нм, такой как, но не ограничиваясь этим, от около 10 до около 20 нм, от около 10 до около 30 нм, от около 10 до около 40 нм, от около 10 до около 50 нм, от около 10 до около 60 нм, от около 10 до около 70 нм, от около 10 до около 80 нм, от около 10 до около 90 нм, от около 20 до около 30 нм, около 20 до около 40 нм, от около 20 до около 50 нм, от около 20 до около 60 нм, от около 20 до около 70 нм, от около 20 до около 80 нм, от около 20 до около 90 нм, от около 20 до около 100 нм, от около 30 до около 40 нм, от около 30 до около 50 нм, от около 30 до около 60 нм, от около 30 до около 70 нм, от около 30 до около 80 нм, от около 30 до около 90 нм, от около 30 до около 100 нм, от около 40 до около 50 нм, от около 40 до около 60 нм, от около 40 до около 70 нм, от около 40 до около 80 нм, от около 40 до около 90 нм, от около 40 до около 100 нм, от около 50 до около 60 нм, от около 50 до около 70 нм, от около 50 до около 80 нм, от около 50 до около 90 нм, от около 50 до около 100 нм, от около 60 до около 70 нм, от около 60 до около 80 нм, от около 60 до около 90 нм, от около 60 до около 100 нм, от около 70 до около 80 нм, от около 70 до около 90 нм, от около 70 до около 100 нм, от около 80 до около 90 нм, от около 80 до около 100 нм и/или от около 90 до около 100 нм.

[0622] В одном варианте осуществления наночастицы имеют диаметр от около 10 до 500 нм. В одном варианте осуществления наночастица имеет диаметр более 100 нм, более 150 нм, более 200 нм, более 250 нм, более 300 нм, более 350 нм, более 400 нм, более 450 нм более 500 нм, более 550 нм, более 600 нм, более 650 нм, более 700 нм, более 750 нм, более 800 нм, более 850 нм, более 900 нм, более 950 нм или более 1000 нм.

[0623] В некоторых вариантах осуществления самый большой размер композиции наночастицы составляет 1 мкм или меньше (например, 1 мкм, 900 нм, 800 нм, 700 нм, 600 нм, 500 нм, 400 нм, 300 нм, 200 нм, 175 нм, 150 нм, 125 нм, 100 нм, 75 нм, 50 нм или меньше).

[0624] Композиция наночастиц может быть относительно гомогенной. Коэффициент полидисперсности может быть использован для указания гомогенности композиции наночастиц, например, распределения частиц по размерам композиции наночастиц. Небольшой (например, менее 0,3) коэффициент полидисперсности обычно указывает на узкое распределение частиц по размерам.

Композиция наночастиц может иметь коэффициент полидисперсности от около 0 до около 0,25, такой как 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24 или 0,25. В некоторых вариантах осуществления коэффициент полидисперсности композиции наночастиц, раскрытой в данном документе, может составлять от около 0,10 до около 0,20.

[0625] Дзета-потенциал композиции наночастиц можно использовать для указания электрокинетического потенциала композиции. Например, дзета-потенциал может описывать поверхностный заряд композиции наночастиц. Композиции наночастиц с относительно низкими зарядами, положительными или отрицательными, обычно желательны, так как более высоко заряженные частицы могут нежелательно взаимодействовать с клетками, тканями и другими элементами в организме. В некоторых вариантах осуществления дзета-потенциал композиции наночастиц, раскрытой в данном документе, может составлять от около -10 мВ до около +20 мВ, от около -10 мВ до около +15 мВ, от около 10 мВ до около +10 мВ, от около от -10 мВ до +5 мВ, от около -10 мВ до около 0 мВ, от около -10 мВ до около -5 мВ, от около -5 мВ до около +20 мВ, от около -5 мВ до около +15 мВ, от около -5 мВ до около +10 мВ, от около -5 мВ до около +5 мВ, от около -5 мВ до около 0 мВ, от около 0 мВ до около +20 мВ, от около 0 мВ до около + 15 мВ, от около 0 мВ до около +10 мВ, от около 0 мВ до около +5 мВ, от около +5 мВ до около +20 мВ, от около +5 мВ до около +15 мВ или от около +5 мВ до +10 мВ.

[0626] В некоторых вариантах осуществления дзета-потенциал липидных наночастиц может составлять от около 0 мВ до около 100 мВ, от около 0 мВ до около 90 мВ, от около 0 мВ до около 80 мВ, от около 0 мВ до около 70 мВ, от около 0 мВ до около 60 мВ, от около 0 мВ до около 50 мВ, от около 0 мВ до около 40 мВ, от около 0 мВ до около 30 мВ, от около 0 мВ до около 20 мВ, от около 0 мВ до около 10 мВ, от около 10 мВ до около 100 мВ, от около 10 мВ до около 90 мВ, от около 10 мВ до около 80 мВ, от около 10 мВ до около 70 мВ, от около 10 мВ до около 60 мВ, от около 10 мВ до около 50 мВ, от около 10 мВ до около 40 мВ, от около 10 мВ до около 30 мВ, от около 10 мВ до около 20 мВ, от около 20 мВ до около 100 мВ, от около 20 мВ до около 90 мВ, от около 20 мВ до около 80 мВ, от около 20 мВ до около 70 мВ, от около 20 мВ до около 60 мВ, от около 20 мВ до около 50 мВ, от около 20 мВ до около 40 мВ, от около 20 мВ от около 30 мВ, от около 30 мВ до около 100 мВ, от 30 мВ до около 90 мВ, от около 30 мВ до около 80 мВ, от около 30 мВ до около 70 мВ, от около 30 до около 60 мВ, от около 30 мВ до около 50 мВ, от около 30 мВ до около 40 мВ, от около 40 мВ до около 100 мВ, от около 40 мВ до около 90 мВ, от

около 40 мВ до около 80 мВ, от около 40 мВ до около 70 мВ, от около 40 мВ до около 60 мВ и от около 40 мВ до около 50 мВ. В некоторых вариантах осуществления дзета-потенциал липидных наночастиц может составлять от около 10 мВ до около 50 мВ, от около 15 мВ до около 45 мВ, от около 20 мВ до около 40 мВ и от около 25 мВ до около 35 мВ. В некоторых вариантах осуществления дзета-потенциал липидных наночастиц может составлять около 10 мВ, около 20 мВ, около 30 мВ, около 40 мВ, около 50 мВ, около 60 мВ, около 70 мВ, около 80 мВ, около 90 мВ и около 100 мВ.

[0627] Термин «эффективность инкапсуляции» полинуклеотида описывает количество полинуклеотида, которое инкапсулируется или иным образом связывается с композицией наночастиц после приготовления, по отношению к обеспечиваемому исходному количеству. Как используется в данном документе, «инкапсуляция» может относиться к полной, значительной или частичной капсуляции, окружению, ограничению, заключению.

[0628] Эффективность инкапсуляции является предпочтительно высокой (например, близка к 100 %). Эффективность инкапсуляции может быть измерена, например, путем сравнения количества полинуклеотида в растворе, содержащем композицию наночастиц, до и после разрушения композиции наночастиц одним или более органическими растворителями или детергентами.

[0629] Флуоресценцию можно использовать для измерения количества свободного полинуклеотида в растворе. Для описанных в данном документе композиций наночастиц эффективность инкапсуляции полинуклеотида может составлять, например, по меньшей мере 50 %, например, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 %. В некоторых вариантах осуществления эффективность инкапсуляции может составлять по меньшей мере 80 %. В определенных вариантах осуществления эффективность инкапсуляции может составлять по меньшей мере 90 %.

[0630] Количество полинуклеотида, присутствующего в фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе, может зависеть от множества факторов, таких как размер полинуклеотида, желаемая мишень и/или применение или другие свойства композиции наночастиц, а также от свойств полинуклеотида.

[0631] Например, количество мРНК, полезной в композиции наночастиц, может зависеть от размера (выраженного в виде длины или молекулярной массы), последовательности и других характеристик мРНК. Относительные количества полинуклеотида в составе наночастиц также могут варьироваться.

[0632] Относительные количества липидной композиции и полинуклеотида, присутствующего в композиции липидных наночастиц согласно данному раскрытию, могут быть оптимизированы в соответствии с соображениями эффективности и переносимости. Для композиций, содержащих мРНК в качестве полинуклеотида, соотношение N:P может служить полезным показателем.

[0633] Поскольку соотношение N:P композиции наночастиц контролирует как экспрессию, так и переносимость, желательны композиции наночастиц с низким соотношением N:P и сильной экспрессией. Соотношения N:P варьируются в зависимости от соотношения липидов к РНК в композиции наночастиц.

[0634] Как правило, более низкое соотношение N:P является предпочтительным. Одну или более РНК, липиды и их количества можно выбирать для получения отношения N:P от около 2:1 до около 30:1, например, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 12:1, 14:1, 16:1, 18:1, 20:1, 22:1, 24:1, 26:1, 28:1 или 30:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение N:P может составлять от около 2:1 до около 8:1. В других вариантах осуществления соотношение N:P составляет от около 5:1 до около 8:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение N:P может составлять от около 5:1 до около 6:1. В одном конкретном аспекте соотношение N:P составляет около 5,67:1.

[0635] В дополнение к предоставлению композиций наночастиц, данное раскрытие также обеспечивает способы получения липидных наночастиц, включающие инкапсулирование полинуклеотида. Такой способ включает использование любой из фармацевтических композиций, раскрытых в данном документе, и получение липидных наночастиц в соответствии со способами получения липидных наночастиц, известными в данной области техники. *См.*, например, Wang et al. (2015) "Delivery of oligonucleotides with lipid nanoparticles" Adv. Drug Deliv. Rev. 87:68-80; Silva et al. (2015) "Delivery Systems for Biopharmaceuticals. Part I: Nanoparticles and Microparticles" Curr. Pharm. Technol. 16: 940-954; Naseri et al. (2015) "Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application" Adv. Pharm. Bull. 5:305-13; Silva et al. (2015) "Lipid nanoparticles for the delivery of biopharmaceuticals" Curr. Pharm. Biotechnol. 16:291-302, и цитируемые в них ссылки.

ЛНЧ, содержащие катионные агенты

[0636] В некоторых случаях ЛНЧ, описанный в данном документе, содержит ядро ЛНЧ и катионный агент, расположенный главным образом на внешней поверхности ядра. Такие ЛНЧ имеют более чем нейтральный дзета-потенциал при

физиологическом pH

[0637] Ядро липидных наночастиц обычно содержит один или несколько из следующих компонентов: липиды (которые могут включать ионизируемые аминолипиды, фосфолипиды, вспомогательные липиды, которые могут быть нейтральными липидами, цвиттерионными липидами, анионными липидами и т.п.), структурные липиды, такие как холестерин или аналоги холестерина, жирные кислоты, полимеры, стабилизаторы, соли, буферы, растворители и т.п.

[0638] Некоторые ядра ЛНЧ, представленные в данном документе, содержат ионизируемый липид, такой как ионизируемый липид, например, ионизируемый аминолипид, фосфолипид, структурный липид и, необязательно, стабилизатор (например, молекула, содержащая полиэтиленгликоль), который может быть или не быть конъюгирован с другим липидом.

[0639] Структурный липид может представлять собой, помимо прочего, стерол, такой как, например, холестерин.

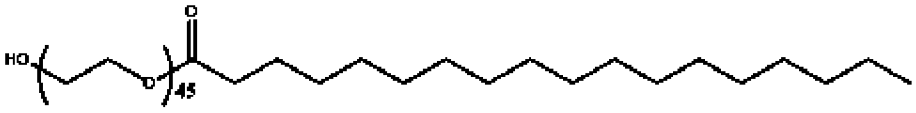
[0640] Вспомогательный липид представляет собой некатионный липид. Вспомогательный липид может содержать по меньшей мере одну цепь жирной кислоты по меньшей мере из 8C и по меньшей мере один фрагмент полярной головной группы.

[0641] Когда используют молекулу, содержащую полиэтиленгликоль (т.е. ПЭГ), ее можно использовать в качестве стабилизатора. В некоторых вариантах осуществления молекула, содержащая полиэтиленгликоль, может представлять собой полиэтиленгликоль, конъюгированный с липидом, и, таким образом, может быть представлена, например, в виде ПЭГ-c-DOMG или ПЭГ-DMG. Некоторые из ЛНЧ, предложенные в данном документе, не содержат ПЕГилированных липидов или содержат их в малых количествах, включая отсутствие или низкие уровни алкил-ПЕГилированных липидов, и могут называться в данном документе не содержащими ПЭГ или ПЕГилированными липидами. Так, некоторые ЛНЧ содержат менее 0,5 моль % ПЕГилированного липида. В некоторых случаях ПЭГ может представлять собой алкил-ПЭГ, такой как метокси-ПЭГ. Другие ЛНЧ включают неалкил-ПЭГ, такой как гидрокси-ПЭГ, и/или неалкил-ПЭГилированные липиды, такие как гидрокси-ПЭГилированные липиды.

[0642] В некоторых вариантах осуществления композиция ядра наночастицы может иметь состав Соединение II:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид с молярным соотношением 50:10:38,5:1,5.В некоторых вариантах осуществления композиция ядра наночастицы может иметь состав Соединения II:DSPC:Хол:Соединения 428 с

молярным соотношением 50:10:38,5:1,5.

[0643] Соединение 428.



[0644] В некоторых вариантах осуществления композиции ядра наночастицы согласно данному изобретению содержат по меньшей мере одно соединение формулы (I). Композиции наночастиц могут также содержать множество других компонентов. Например, композиция наночастиц может содержать один или более других липидов в дополнение к липиду формулы (I) или (II), например, (i) по меньшей мере один фосфолипид, (ii) по меньшей мере один структурный липид, (iii) по меньшей мере один ПЭГ-липид или (iv) любую их комбинацию.

[0645] В некоторых вариантах осуществления композиция наночастицы содержит соединение формулы (I) (например, Соединения II, III или V). В некоторых вариантах осуществления композиция наночастицы содержит соединение формулы (I) (например, Соединения II, III или V) и фосфолипид (например, DSPC, DOP или MSPC).

[0646] В данном изобретении предложен способ получения наночастицы, включающий приведение ядра липидной наночастицы в контакт с катионным агентом, при этом липидная наночастица содержит:

(a) ядро липидной наночастицы, содержащее:

(i) ионизируемый липид,

(ii) фосфолипид,

(iii) структурный липид и

(iv) ПЭГ-липид и

(b) полинуклеотидную или полипептидную полезную нагрузку, инкапсулированную в ядро для доставки в клетку.

[0647] В некоторых вариантах осуществления приведение ядра липидной наночастицы в контакт с катионным агентом включает растворение катионного агента в неионном эксципиенте. В некоторых вариантах осуществления неионный эксципиент выбран из гидроксистеарата макрогола 15 (HS 15), 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоля-2000 (DMG-PEG2K), соединения 428, моноолеата полиоксиэтиленсорбитана [TWEEN ®80] и полиэтиленгликольсукцинат d-α-токоферола (TPGS). В некоторых вариантах осуществления неионный эксципиент представляет собой гидроксистеарат макрогола 15 (HS 15). В некоторых

вариантах осуществления контакт липидной наночастицы с катионным агентом включает катионный агент, растворенный в буферном растворе. В некоторых вариантах осуществления буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буфер (ФСБ). В некоторых вариантах осуществления буферный раствор представляет собой буфер на основе Трис.

[0648] Предложенные наночастицы, приготовленные описанным в данном документе способом, например, приведением в контакт ядра липидной наночастицы с катионным агентом. В некоторых вариантах осуществления катионный агент может представлять собой стеринамин, такой как GL-67. В некоторых вариантах осуществления ядро липидной наночастицы необязательно содержит ПЭГ-липид. В некоторых вариантах осуществления ядро липидной наночастицы, образующее липидную наночастицу, контактирующую с катионным агентом, по существу не содержит ПЭГ-липида. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид добавляют к липидной наночастице вместе с катионным агентом, до приведения в контакт с катионным агентом или после приведения в контакт с катионным агентом.

[0649] В одном варианте осуществления ЛНЧ по изобретению может быть изготовлена с использованием традиционной технологии смешивания, в которой полезную нагрузку нуклеиновой кислоты смешивают с компонентами ядра ЛНЧ для создания ядра ЛНЧ плюс полезная нагрузка. Как только это ядро ЛНЧ с нагрузкой приготовлено, катионный агент приводят в контакт с ядром ЛНЧ с нагрузкой. Пример этого процесса показан на **Фиг. 12**.

[0650] В другом варианте осуществления ЛНЧ по изобретению может быть изготовлена с использованием пустых ЛНЧ в качестве отправного момента. Например, как показано на **Фиг. 8**, перед загрузкой полезной нагрузки нуклеиновой кислоты изготавливают пустые ЛНЧ. Как только полезная нагрузка нуклеиновой кислоты контактирует с ЛНЧ, может быть добавлен катионный агент для образования ЛНЧ по изобретению.

[0651] Например, в одном варианте осуществления в способе апостериорной загрузки (PHL) пустые ЛНЧ сначала готовят на этапе нанопреципитации, а буфер заменяют на буфер с низким pH (т.е. pH 5). Затем мРНК (также подкисленную при низком pH) вводят в эти пустые ЛНЧ посредством смешивания. После этап смешивания используют способ регулирования pH для нейтрализации pH. Наконец, для стабилизации частицы добавляют ПЭГ-липид, например, DMG-ПЭГ-2k. Затем эти частицы концентрируют до целевой концентрации и фильтруют. Добавляют катионный агент, например, GL-67.

[0652] Вариант начального момента пустой ЛНЧ показан на **Фиг. 9**. На **Фиг. 9** показано, что липиды ЛНЧ используют для образования пустой ЛНЧ, но ПЭГ-липид не включен в этот этап. На следующем этапе раствор нуклеиновой кислоты приводят в контакт с пустыми ЛНЧ, образуя нагруженные ЛНЧ. ПЭГ-липиды добавляют в одном или двух моментах во время дальнейшей обработки нагруженных ЛНЧ, а катионный агент можно добавлять в любой момент во время этой дальнейшей обработки, что показано пунктирной рамкой на **Фиг. 9**. **Фиг. 10** представляет собой более конкретную версию процесса на **Фиг. 11**, и, опять же, катионный агент может быть добавлен в любой момент дальнейшей обработки ЛНЧ.

[0653] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по изобретению можно приготовить с использованием нанопреципитации, которая представляет собой единичную операцию, при которой ЛНЧ самособираются из их отдельных липидных компонентов путем кинетического смешивания и последующего созревания и непрерывного разбавления. Эта единичная операция включает в себя три отдельных этапа, а именно: смешивание водного и органического исходных материалов, созревание ЛНЧ и разведение после контролируемого времени выдерживания. Благодаря непрерывности этих этапов все их считают одной единичной операцией. Единичная операция включает непрерывную поточную комбинацию трех жидких потоков с одним поточным этапом созревания: смешивание водного буфера с липидным исходным раствором, созревание в течение контролируемого времени выдерживания и разведение наночастиц. Сама нанопреципитация происходит в соответствующем по масштабу смесителе, который сконструирован для обеспечения непрерывного, высокоэнергетического смешивания водного раствора с липидным исходным раствором, растворенным в этаноле. В течение этой операции водный раствор и липидный исходный раствор непрерывно одновременно втекают в аппарат для смешивания. Содержание этанола, удерживающего липиды в растворенном состоянии, резко снижается, и все липиды выпадают в осадок друг с другом. Таким образом частицы проходят самосборку в камере для смешивания.

[0654] Одной из целей единичной операции является замена раствора на полностью водный буфер, свободный от этанола, и достижение целевой концентрации ЛНЧ. Это может быть достигнуто путем сначала достижения целевой концентрации обработки, затем диафильтрации, а затем (при необходимости) конечного этапа концентрирования после полного удаления этанола.

[0655] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по изобретению можно

приготовить с использованием нанопреципитации, которая представляет собой единичную операцию, при которой ЛНЧ самособираются из их отдельных липидных компонентов путем кинетического смешивания и последующего созревания и непрерывного разбавления. Эта единичная операция включает в себя три отдельных этапа, а именно: смешивание водного и органического исходных материалов, созревание ЛНЧ и разведение после контролируемого времени выдерживания. Благодаря непрерывности этих этапов все их считают одной единичной операцией. Единичная операция включает непрерывную поточную комбинацию трех жидких потоков с одним поточным этапом созревания: смешивание водного буфера с липидным исходным раствором, созревание в течение контролируемого времени выдерживания и разведение наночастиц. Сама нанопреципитация происходит в соответствующем по масштабу смесителе, который сконструирован для обеспечения непрерывного, высокоэнергетического смешивания водного раствора с липидным исходным раствором, растворенным в этаноле. В течение этой операции водный раствор и липидный исходный раствор непрерывно одновременно втекают в аппарат для смешивания. Содержание этанола, удерживающего липиды в растворенном состоянии, резко снижается, и все липиды выпадают в осадок друг с другом. Таким образом частицы проходят самосборку в камере для смешивания.

[0656] Одной из целей единичной операции является замена раствора на полностью водный буфер, свободный от этанола, и достижение целевой концентрации ЛНЧ. Это может быть достигнуто путем сначала достижения целевой концентрации обработки, затем диафильтрации, а затем (при необходимости) конечного этапа концентрирования после полного удаления этанола.

[0657] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ получения раствора пустой липидной наночастицы (раствора пустой ЛНЧ), содержащего пустую липидную наночастицу (пустую ЛНЧ), включающий:

i) этап нанопреципитации, включающий:

i-a) этап смешивания, включающий смешивание липидного раствора, содержащего ионизируемый липид, структурный липид, фосфолипид и ПЭГ-липид, с водным буферным раствором, содержащим первый буферный агент, с образованием таким образом раствора промежуточной пустой липидной наночастицы (раствора промежуточной пустой ЛНЧ), содержащего промежуточную пустую наночастицу (промежуточную пустую ЛНЧ);

i-b) выдерживание раствора промежуточной пустой ЛНЧ в течение времени

выдерживания; и

i-c) добавление разбавляющего раствора в раствор промежуточной пустой ЛНЧ с образованием таким образом раствора пустой ЛНЧ, содержащего пустую ЛНЧ.

[0658] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ получения раствора пустой липидной наночастицы (раствора пустой ЛНЧ), содержащего пустую липидную наночастицу (пустую ЛНЧ), включающий:

i) этап нанопреципитации, включающий:

i-a) этап смешивания, включающий смешивание липидного раствора, содержащего ионизируемый липид, структурный липид, фосфолипид и ПЭГ-липид, с водным буферным раствором, содержащим первый буферный агент, с образованием таким образом раствора промежуточной пустой липидной наночастицы (раствора промежуточной пустой ЛНЧ), содержащего промежуточную пустую наночастицу (промежуточную пустую ЛНЧ);

i-b) выдерживание раствора промежуточной пустой ЛНЧ в течение времени выдерживания;

i-c) добавление разбавляющего раствора в раствор промежуточной пустой ЛНЧ с образованием таким образом раствора пустой ЛНЧ, содержащего пустую ЛНЧ; и

ii) обработку раствора пустой ЛНЧ.

[0659] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ получения раствора пустой липидной наночастицы (раствора пустой ЛНЧ), содержащего пустую липидную наночастицу (пустую ЛНЧ), включающий:

ii) обработку раствора пустой ЛНЧ, содержащего пустую ЛНЧ.

[0660] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ получения состава липидной наночастицы (состава ЛНЧ), включающий:

i) этап нанопреципитации, включающий:

i-a) этап смешивания, включающий смешивание липидного раствора, содержащего ионизируемый липид, структурный липид, фосфолипид и ПЭГ-липид, с водным буферным раствором, содержащим первый буферный агент, с образованием таким образом раствора промежуточной пустой липидной наночастицы (раствора промежуточной пустой ЛНЧ), содержащего промежуточную пустую наночастицу (промежуточную пустую ЛНЧ);

i-b) выдерживание раствора промежуточной пустой ЛНЧ в течение времени выдерживания;

i-c) добавление разбавляющего раствора в раствор промежуточной пустой ЛНЧ с образованием таким образом раствора пустой ЛНЧ, содержащего пустую ЛНЧ; и

ii) обработку раствора пустой ЛНЧ; и

iii) этап нагрузки, включающий смешивание раствора нуклеиновой кислоты, содержащего нуклеиновую кислоту, с раствором пустой ЛНЧ с образованием таким образом раствора нагруженной ЛНЧ, содержащего нагруженную липидную наночастицу (нагруженную ЛНЧ).

[0661] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ получения состава липидной наночастицы (состава ЛНЧ), включающий:

i) этап нанопреципитации, включающий:

i-a) этап смешивания, включающий смешивание липидного раствора, содержащего ионизируемый липид, структурный липид, фосфолипид и ПЭГ-липид, с водным буферным раствором, содержащим первый буферный агент, с образованием таким образом раствора промежуточной пустой липидной наночастицы (раствора промежуточной пустой ЛНЧ), содержащего промежуточную пустую наночастицу (промежуточную пустую ЛНЧ);

i-b) выдерживание раствора промежуточной пустой ЛНЧ в течение времени выдерживания;

i-c) добавление разбавляющего раствора в раствор промежуточной пустой ЛНЧ с образованием таким образом раствора пустой ЛНЧ, содержащего пустую ЛНЧ; и

ii) обработку раствора пустой ЛНЧ;

iii) этап нагрузки, включающий смешивание раствора нуклеиновой кислоты, содержащего нуклеиновую кислоту, с раствором пустой ЛНЧ с образованием таким образом раствора нагруженной ЛНЧ, содержащего нагруженную липидную наночастицу (нагруженную ЛНЧ); и

iv) обработку раствора нагруженной ЛНЧ с образованием таким образом состава нагруженной ЛНЧ.

[0662] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ получения состава липидной наночастицы (состава ЛНЧ), включающий:

i) этап нанопреципитации, включающий:

i-a) этап смешивания, включающий смешивание липидного раствора, содержащего ионизируемый липид, структурный липид, фосфолипид и ПЭГ-липид, с водным буферным раствором, содержащим первый буферный агент, с

образованием таким образом раствора промежуточной пустой липидной наночастицы (раствора промежуточной пустой ЛНЧ), содержащего промежуточную пустую наночастицу (промежуточную пустую ЛНЧ);

i-b) выдерживание раствора промежуточной пустой ЛНЧ в течение времени выдерживания;

i-c) добавление разбавляющего раствора в раствор промежуточной пустой ЛНЧ с образованием таким образом раствора пустой ЛНЧ, содержащего пустую ЛНЧ; и

ii) обработку раствора пустой ЛНЧ;

iii) этап нагрузки, включающий смешивание раствора нуклеиновой кислоты, содержащего нуклеиновую кислоту, с раствором пустой ЛНЧ с образованием таким образом раствора нагруженной ЛНЧ, содержащего нагруженную липидную наночастицу (нагруженную ЛНЧ);

iv) обработку раствора нагруженной ЛНЧ с образованием таким образом состава нагруженной ЛНЧ; и

v) добавление катионного агента.

[0663] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ получения состава липидной наночастицы (состава ЛНЧ), включающий:

iii) этап нагрузки, включающий смешивание раствора нуклеиновой кислоты, содержащего нуклеиновую кислоту, с раствором пустой ЛНЧ, содержащим пустую ЛНЧ, с образованием таким образом раствора нагруженной наночастицы (раствора нагруженной ЛНЧ), содержащего нагруженную липидную наночастицу (нагруженную ЛНЧ).

[0664] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ получения состава липидной наночастицы (состава ЛНЧ), включающий:

iii) этап нагрузки, включающий смешивание раствора нуклеиновой кислоты, содержащего нуклеиновую кислоту, с раствором пустой ЛНЧ, содержащим пустую ЛНЧ, с образованием таким образом раствора нагруженной наночастицы (раствора нагруженной ЛНЧ), содержащего нагруженную липидную наночастицу (нагруженную ЛНЧ); и

iv) обработку раствора нагруженной ЛНЧ с образованием таким образом состава нагруженной ЛНЧ.

[0665] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ получения состава липидной наночастицы (состава ЛНЧ), включающий:

iii) этап нагрузки, включающий смешивание раствора нуклеиновой кислоты,

содержащего нуклеиновую кислоту, с раствором пустой ЛНЧ, содержащим пустую ЛНЧ, с образованием таким образом раствора нагруженной наночастицы (раствора нагруженной ЛНЧ), содержащего нагруженную липидную наночастицу (нагруженную ЛНЧ)

iv) обработку раствора нагруженной ЛНЧ с образованием таким образом состава нагруженной ЛНЧ; и

v) добавление катионного агента.

[0666] В некоторых вариантах осуществления этапа от i-a) до i-c) проводят в отдельных операционных блоках (например, отдельных реакционных устройствах).

[0667] В некоторых вариантах осуществления этапа от i-a) до i-c) проводят в одном операционном блоке. В некоторых вариантах осуществления этапы от i-a) до i-c) проводят в устройстве с непрерывным потоком так, так что этап i-c) следует за этапом i-b), который следует за этапом i-a).

[0668] В некоторых вариантах осуществления на этапе i-c) разбавляющий раствор добавляют один раз.

[0669] В некоторых вариантах осуществления на этапе i-c) разбавляющий раствор добавляют непрерывно.

[0670] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ получения пустой липидной наночастицы (пустой ЛНЧ), включающий: i) этап смешивания, включающий смешивание ионизируемого липида с первым буферным агентом с образованием таким образом пустой ЛНЧ, причем пустая ЛНЧ содержит от около 0,1 моль % до около 0,5 моль % полимерного липида (например ПЭГ-липида).

[0671] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ получения раствора пустой липидной наночастицы (раствора пустой ЛНЧ), содержащего пустую липидную наночастицу (пустую ЛНЧ), включающий:

i) этап смешивания, включающий смешивание липидного раствора, содержащего ионизируемый липид, структурный липид, фосфолипид и ПЭГ-липид, с водным буферным раствором, содержащим первый буферный агент, с образованием таким образом раствора пустой липидной наночастицы (раствора пустой ЛНЧ), содержащего пустую ЛНЧ.

[0672] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ получения раствора пустой липидной наночастицы (раствора пустой ЛНЧ), содержащего пустую липидную наночастицу (пустую ЛНЧ), включающий:

i) этап смешивания, включающий смешивание липидного раствора, содержащего

ионизируемый липид, структурный липид, фосфолипид и ПЭГ-липид, с водным буферным раствором, содержащим первый буферный агент, с образованием таким образом раствора пустой липидной наночастицы (раствора пустой ЛНЧ), содержащего пустую ЛНЧ; и

ii) обработку раствора пустой ЛНЧ.

[0673] В некоторых вариантах осуществления этап смешивания включает смешивание раствора липида, содержащего ионизируемый липид с водным буферным раствором, содержащим первое буферное средство, с образованием таким образом раствора пустой липидной наночастицы (раствора пустой ЛНЧ), содержащего пустую ЛНЧ.

[0674] В некоторых аспектах в настоящем раскрытии представлен способ получения нагруженной липидной наночастицы (нагруженной ЛНЧ), связанной с нуклеиновой кислотой, включающий: ii) этап нагрузки, включающую смешивание нуклеиновой кислоты с пустой ЛНЧ с последующим добавлением катионного агента, в результате чего образуется нагруженная ЛНЧ.

[0675] В некоторых вариантах осуществления этап нагрузки включает смешивания раствора нуклеиновой кислоты, содержащего нуклеиновую кислоту, с раствором пустой ЛНЧ с последующим добавлением катионного агента, с образованием таким образом раствора нагруженной липидной наночастицы (раствора нагруженной ЛНЧ), содержащего нагруженную ЛНЧ.

[0676] В некоторых вариантах осуществления пустую ЛНЧ или раствор пустой ЛНЧ подвергают этапу нагрузки без выдерживания или хранения.

[0677] В некоторых вариантах осуществления пустую ЛНЧ или раствор пустой ЛНЧ подвергают этапу нагрузки после выдерживания в течение некоторого времени.

[0678] В некоторых вариантах осуществления пустую ЛНЧ или раствор пустой ЛНЧ подвергают этапу нагрузки после выдерживания в течение около 1 минуты, около 2 минут, около 3 минут, около 4 минут, около 5 минут, около 10 минут, около 20 минут, около 30 минут, около 40 минут, около 50 минут, около 1 часа, около 2 часов, около 3 часов, около 4 часов, около 5 часов, около 6 часов, около 7 часов, около 8 часов, около 9 часов, около 10 часов, около 11 часов, около 12 часов, около 18 часов или около 24 часов.

[0679] В некоторых вариантах осуществления пустую ЛНЧ или раствор пустой ЛНЧ подвергают этапу нагрузки после хранения в течение около 1 часа, около 2 часов, около 3 часов, около 4 часов, около 5 часов, около 6 часов, около 7 часов, около 8 часов, около 9 часов, около 10 часов, около 11 часов, около 12 часов, около 18 часов,

около 1 дня, около 2 дней, около 3 дней, около 4 дней, около 5 дней, около 6 дней, около 1 недели, около 2 недель, около 3 недель, около 1 месяца, около 2 месяцев, около 3 месяцев, около 4 месяцев, около 5 месяцев, около 6 месяцев, около 7 месяцев, около 8 месяцев, около 9 месяцев, около 10 месяцев, около 11 месяцев, около 1 года, около 2 лет, около 3 лет, около 4 лет или около 5 лет.

[0680] В некоторых вариантах осуществления после образования пустую ЛНЧ или раствор пустой ЛНЧ подвергают этапу нагрузки без хранения или выдерживания в течение некоторого времени.

[0681] В некоторых аспектах в данном изобретении предложен способ, дополнительно включающий: ii) обработку раствора пустой ЛНЧ.

[0682] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ, дополнительно включающий: iv) обработку раствора нагруженной ЛНЧ с образованием таким образом состава липидной наночастицы (состава ЛНЧ).

[0683] В отличие от других методик для получения (*например*, тонкопленочная регидратация/экструзия), капельное осаждение этанолом представляло собой промышленный стандарт для образования липидных наночастиц нуклеиновой кислоты. Реакции осаждения являются предпочтительными вследствие их непрерывной природы, масштабируемости и простоты введения в обращение. В таких процессах обычно применяются смесители высокой энергии (*например*, смесители с Т-образным соединением, ограниченными ударными струями, микрожидкостные смесители, вихревые смесители) для введения липидов (в этаноле) в подходящий антирастворитель (т.е. воду) контролируемым способом, вызывая перенасыщение жидкости и самопроизвольное осаждение в липидных частицах. В некоторых вариантах осуществления применяемый вихревой смеситель представляет собой смеситель, описанный в заявках на патент США №№ 62/799636 и 62/886592, которые включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления применяемые микрожидкостные смесители представляют собой смесители, описанные в заявке PCT № WO/2014/172045, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0684] В некоторых вариантах осуществления этап смешивания осуществляют с использованием смесителя с Т-образным соединением, ограниченными сталкивающимися струями, микрофлюидного смесителя или вихревого смесителя.

[0685] В некоторых вариантах осуществления этапа нагрузки осуществляют с использованием смесителя с Т-образным соединением, ограниченными ударными

струями, микрожидкостного смесителя или вихревого смесителя.

[0686] В некоторых вариантах осуществления этап смешивания проводят при температуре менее чем около 30 °C, менее чем около 28 °C, менее чем около 26 °C, менее чем около 24 °C, менее чем около 22 °C, менее чем около 20 °C или менее чем приблизительно температура окружающей среды.

[0687] В некоторых вариантах осуществления этап нагрузки проводят при температуре менее чем около 30 °C, менее чем около 28 °C, менее чем около 26 °C, менее чем около 24 °C, менее чем около 22 °C, менее чем около 20 °C или менее чем приблизительно температура окружающей среды.

[0688] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора пустой ЛНЧ или раствора нагруженной ЛНЧ включает первый этап добавления, включающий добавление полиэтиленгликолевого липида (ПЭГ-липида) к пустой ЛНЧ или нагруженной ЛНЧ.

[0689] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора пустой ЛНЧ включает первый этап добавления, включающий добавление полиэтиленгликолевого липида (ПЭГ-липида) в раствор пустой ЛНЧ.

[0690] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора пустой ЛНЧ включает первый этап добавления, включающий добавление полиэтиленгликолевого липида (ПЭГ-липида) к пустой ЛНЧ.

[0691] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора нагруженной ЛНЧ включает первый этап добавления, включающий добавление полиэтиленгликолевого липида (ПЭГ-липида) в раствор нагруженной ЛНЧ.

[0692] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора нагруженной ЛНЧ включает первый этап добавления, включающий добавление полиэтиленгликолевого липида (ПЭГ-липида) к нагруженной ЛНЧ.

[0693] В некоторых вариантах осуществления первый этап добавления включает добавление раствора полиэтиленгликоля (раствора ПЭГ), содержащего ПЭГ-липид, в раствор пустой ЛНЧ или раствор нагруженной ЛНЧ.

[0694] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора пустой ЛНЧ или раствора нагруженной ЛНЧ включает второй этап добавления, включающий добавление полиэтиленгликолевого липида (ПЭГ-липида) к пустой ЛНЧ или нагруженной ЛНЧ.

[0695] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора пустой ЛНЧ включает второй этап добавления, включающий добавление полиэтиленгликолевого липида (ПЭГ-липида) в раствор пустой ЛНЧ.

[0696] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора пустой ЛНЧ включает второй этап добавления, включающий добавление полиэтиленгликолевого липида (ПЭГ-липида) к пустой ЛНЧ.

[0697] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора нагруженной ЛНЧ включает второй этап добавления, включающий добавление полиэтиленгликолевого липида (ПЭГ-липида) в раствор нагруженной ЛНЧ.

[0698] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора нагруженной ЛНЧ включает второй этап добавления, включающий добавление полиэтиленгликолевого липида (ПЭГ-липида) к нагруженной ЛНЧ.

[0699] В некоторых вариантах осуществления второй этап добавления включает добавление раствора полиэтиленгликоля (раствора ПЭГ), содержащего ПЭГ-липид, в раствор пустой ЛНЧ или раствор нагруженной ЛНЧ.

[0700] В некоторых вариантах осуществления первый этап добавления включает добавление от около 0,1 моль % до около 3,0 моль % ПЭГ, от около 0,2 моль % до около 2,5 моль % ПЭГ, от около 0,5 моль % до около 2,0 моль % ПЭГ, от около 0,75 моль % до около 1,5 моль % ПЭГ, от около 1,0 моль % до около 1,25 моль % ПЭГ к пустой ЛНЧ или нагруженной ЛНЧ.

[0701] В некоторых вариантах осуществления первый этап добавления включает добавление от около 0,1 моль % до около 3,0 моль % ПЭГ, от около 0,2 моль % до около 2,5 моль % ПЭГ, от около 0,5 моль % до около 2,0 моль % ПЭГ, от около 0,75 моль % до около 1,5 моль % ПЭГ, от около 1,0 моль % до около 1,25 моль % ПЭГ к пустой ЛНЧ или нагруженной ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления первый этап добавления включает добавление около 0,1 моль %, около 0,2 моль %, около 0,3 моль %, около 0,4 моль %, около 0,5 моль %, около 0,6 моль %, около 0,7 моль %, около 0,8 моль %, около 0,9 моль %, около 1,0 моль %, около 1,1 моль %, около 1,2 моль %, около 1,3 моль %, около 1,4 моль %, около 1,5 моль %, около 1,6 моль %, около 1,7 моль %, около 1,8 моль %, около 1,9 моль %, около 2,0 моль %, около 2,1 моль %, около 2,2 моль %, около 2,3 моль %, около 2,4 моль %, около 2,5 моль %, около 2,6 моль %, около 2,7 моль %, около 2,8 моль %, около 2,9 моль % или около 3,0 моль % ПЭГ-липида (например, PEG_{2k}-DMG).

[0702] В некоторых вариантах осуществления первый этап добавления включает добавление около 1,75 ± 0,5 моль %, около 1,75 ± 0,4 моль %, около 1,75 ± 0,3 моль %, около 1,75 ± 0,2 моль % или около 1,75 ± 0,1 моль % (например, около 1,75 моль %) ПЭГ-липида (например, PEG_{2k}-DMG).

[0703] В некоторых вариантах осуществления после первого этапа добавления

раствор пустой ЛНЧ (например, пустая ЛНЧ) содержит около 1,0 моль %, около 1,1 моль %, около 1,2 моль %, около 1,3 моль %, около 1,4 моль %, около 1,5 моль %, около 1,6 моль %, около 1,7 моль %, около 1,8 моль %, около 1,9 моль %, около 2,0 моль %, около 2,1 моль %, около 2,2 моль %, около 2,3 моль %, около 2,4 моль %, около 2,5 моль %, около 2,6 моль %, около 2,7 моль %, около 2,8 моль %, около 2,9 моль %, около 3,0 моль %, около 3,1 моль %, около 3,2 моль %, около 3,3 моль %, около 3,4 моль %, около 3,5 моль %, около 3,6 моль %, около 3,7 моль %, около 3,8 моль %, около 3,9 моль %, около 4,0 моль %, около 4,1 моль %, около 4,2 моль %, около 4,3 моль %, около 4,4 моль %, около 4,5 моль %, около 4,6 моль %, около 4,7 моль %, около 4,8 моль %, около 4,9 моль % или около 5,0 моль % ПЭГ-липида (например, PEG_{2k}-DMG).

[0704] В некоторых вариантах осуществления после первого этапа добавления раствор нагруженной ЛНЧ (например, нагруженная ЛНЧ) содержит около 1,0 моль %, около 1,1 моль %, около 1,2 моль %, около 1,3 моль %, около 1,4 моль %, около 1,5 моль %, около 1,6 моль %, около 1,7 моль %, около 1,8 моль %, около 1,9 моль %, около 2,0 моль %, около 2,1 моль %, около 2,2 моль %, около 2,3 моль %, около 2,4 моль %, около 2,5 моль %, около 2,6 моль %, около 2,7 моль %, около 2,8 моль %, около 2,9 моль %, около 3,0 моль %, около 3,1 моль %, около 3,2 моль %, около 3,3 моль %, около 3,4 моль %, около 3,5 моль %, около 3,6 моль %, около 3,7 моль %, около 3,8 моль %, около 3,9 моль %, около 4,0 моль %, около 4,1 моль %, около 4,2 моль %, около 4,3 моль %, около 4,4 моль %, около 4,5 моль %, около 4,6 моль %, около 4,7 моль %, около 4,8 моль %, около 4,9 моль % или около 5,0 моль % ПЭГ-липида (например, PEG_{2k}-DMG).

[0705] В некоторых вариантах осуществления второй этап добавления включает добавление от около 0,1 моль % до около 3,0 моль % ПЭГ, от около 0,2 моль % до около 2,5 моль % ПЭГ, от около 0,5 моль % до около 2,0 моль % ПЭГ, от около 0,75 моль % до около 1,5 моль % ПЭГ, от около 1,0 моль % до около 1,25 моль % ПЭГ к пустой ЛНЧ или нагруженной ЛНЧ.

[0706] В некоторых вариантах осуществления второй этап добавления включает добавление от около 0,1 моль % до около 3,0 моль % ПЭГ, от около 0,2 моль % до около 2,5 моль % ПЭГ, от около 0,5 моль % до около 2,0 моль % ПЭГ, от около 0,75 моль % до около 1,5 моль % ПЭГ, от около 1,0 моль % до около 1,25 моль % ПЭГ к пустой ЛНЧ или нагруженной ЛНЧ.

[0707] В некоторых вариантах осуществления второй этап добавления включает добавление около 0,1 моль %, около 0,2 моль %, около 0,3 моль %, около 0,4 моль %,

около 0,5 моль %, около 0,6 моль %, около 0,7 моль %, около 0,8 моль %, около 0,9 моль %, около 1,0 моль %, около 1,1 моль %, около 1,2 моль %, около 1,3 моль %, около 1,4 моль %, около 1,5 моль %, около 1,6 моль %, около 1,7 моль %, около 1,8 моль %, около 1,9 моль %, около 2,0 моль %, около 2,1 моль %, около 2,2 моль %, около 2,3 моль %, около 2,4 моль %, около 2,5 моль %, около 2,6 моль %, около 2,7 моль %, около 2,8 моль %, около 2,9 моль % или около 3,0 моль % ПЭГ-липида (например, PEG_{2k}-DMG).

[0708] В некоторых вариантах осуществления второй этап добавления включает добавление около 1,0 ± 0,5 моль %, около 1,0 ± 0,4 моль %, около 1,0 ± 0,3 моль %, около 1,0 ± 0,2 моль % или около 1,0 ± 0,1 моль % (например, около 1,0 моль %) ПЭГ-липида (например, PEG_{2k}-DMG).

[0709] В некоторых вариантах осуществления второй этап добавления включает добавление около 1,0 моль % ПЭГ-липида к пустой ЛНЧ или нагруженной ЛНЧ.

[0710] В некоторых вариантах осуществления после второго этапа добавления раствор пустой ЛНЧ (например, пустая ЛНЧ) содержит около 1,0 моль %, около 1,1 моль %, около 1,2 моль %, около 1,3 моль %, около 1,4 моль %, около 1,5 моль %, около 1,6 моль %, около 1,7 моль %, около 1,8 моль %, около 1,9 моль %, около 2,0 моль %, около 2,1 моль %, около 2,2 моль %, около 2,3 моль %, около 2,4 моль %, около 2,5 моль %, около 2,6 моль %, около 2,7 моль %, около 2,8 моль %, около 2,9 моль %, около 3,0 моль %, около 3,1 моль %, около 3,2 моль %, около 3,3 моль %, около 3,4 моль %, около 3,5 моль %, около 3,6 моль %, около 3,7 моль %, около 3,8 моль %, около 3,9 моль %, около 4,0 моль %, около 4,1 моль %, около 4,2 моль %, около 4,3 моль %, около 4,4 моль %, около 4,5 моль %, около 4,6 моль %, около 4,7 моль %, около 4,8 моль %, около 4,9 моль % или около 5,0 моль % ПЭГ-липида (например, PEG_{2k}-DMG).

[0711] В некоторых вариантах осуществления после второго этапа добавления раствор нагруженной ЛНЧ (например, нагруженная ЛНЧ) содержит около 1,0 моль %, около 1,1 моль %, около 1,2 моль %, около 1,3 моль %, около 1,4 моль %, около 1,5 моль %, около 1,6 моль %, около 1,7 моль %, около 1,8 моль %, около 1,9 моль %, около 2,0 моль %, около 2,1 моль %, около 2,2 моль %, около 2,3 моль %, около 2,4 моль %, около 2,5 моль %, около 2,6 моль %, около 2,7 моль %, около 2,8 моль %, около 2,9 моль %, около 3,0 моль %, около 3,1 моль %, около 3,2 моль %, около 3,3 моль %, около 3,4 моль %, около 3,5 моль %, около 3,6 моль %, около 3,7 моль %, около 3,8 моль %, около 3,9 моль %, около 4,0 моль %, около 4,1 моль %, около 4,2 моль %, около 4,3 моль %, около 4,4 моль %, около 4,5 моль %, около 4,6

моль %, около 4,7 моль %, около 4,8 моль %, около 4,9 моль % или около 5,0 моль % ПЭГ-липида (например, PEG_{2k}-DMG).

[0712] В некоторых вариантах осуществления первый этап добавления проводят при температуре менее чем около 30 °C, менее чем около 28 °C, менее чем около 26 °C, менее чем около 24 °C, менее чем около 22 °C, менее чем около 20 °C или менее чем приблизительно температура окружающей среды.

[0713] В некоторых вариантах осуществления второй этап добавления проводят при температуре менее чем около 30 °C, менее чем около 28 °C, менее чем около 26 °C, менее чем около 24 °C, менее чем около 22 °C, менее чем около 20 °C или менее чем приблизительно температура окружающей среды.

[0714] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора пустой ЛНЧ или раствора нагруженной ЛНЧ дополнительно включает по меньшей мере один этап, выбранный из фильтрации, доведения pH, замены буфера, разведения, диализа, концентрирования, замораживания, лиофилизации, хранения и упаковки.

[0715] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора пустой ЛНЧ или раствора нагруженной ЛНЧ дополнительно включает доведение pH.

[0716] В некоторых вариантах осуществления доведение pH включает добавление второго буферного агента, выбранного из группы, состоящей из ацетатного буфера, цитратного буфера, фосфатного буфера и трис-буфера.

[0717] В некоторых вариантах осуществления первый этап добавления проводят до доведения pH.

[0718] В некоторых вариантах осуществления первый этап добавления проводят после доведения pH.

[0719] В некоторых вариантах осуществления второй этап добавления проводят до доведения pH.

[0720] В некоторых вариантах осуществления второй этап добавления проводят после доведения pH.

[0721] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора пустой ЛНЧ или раствора нагруженной ЛНЧ дополнительно включает фильтрацию.

[0722] В некоторых вариантах осуществления фильтрация представляет собой тангенциальную поточную фильтрацию (ТПФ).

[0723] В некоторых вариантах осуществления фильтрация позволяет удалить органический растворитель (например, спирт или этанол) из раствора ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления при удалении органического растворителя (например, спирта или этанол) раствор ЛНЧ преобразуется в раствор, забуференный

при нейтральном pH, pH от 6,5 до 7,8, pH от 6,8 до pH 7,5, предпочтительно, pH от 7,0 до pH 7,2 (например, фосфатный буфер или буфер HEPES). В некоторых вариантах осуществления раствор ЛНЧ преобразуется в раствор, забуференный при pH от около 7,0 до pH около 7,2. В некоторых вариантах осуществления полученный раствор ЛНЧ стерилизуют перед хранением или применением, например, посредством фильтрации (например, через фильтр 0,1-0,5 мкм).

[0724] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора пустой ЛНЧ или раствора нагруженной ЛНЧ дополнительно включает замену буфера.

[0725] В некоторых вариантах осуществления замена буфера включает добавление водного буферного раствора, содержащего третий буферный агент.

[0726] В некоторых вариантах осуществления первый этап добавления осуществляют до замены буфера.

[0727] В некоторых вариантах осуществления первый этап добавления осуществляют после замены буфера.

[0728] В некоторых вариантах осуществления второй этап добавления осуществляют до замены буфера.

[0729] В некоторых вариантах осуществления второй этап добавления осуществляют после замены буфера.

[0730] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора пустой ЛНЧ или раствора нагруженной ЛНЧ дополнительно включает разведение.

[0731] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора пустой ЛНЧ или раствора нагруженной ЛНЧ дополнительно включает диализ.

[0732] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора пустой ЛНЧ или раствора нагруженной ЛНЧ дополнительно включает концентрирование.

[0733] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора пустой ЛНЧ или раствора нагруженной ЛНЧ дополнительно включает замораживание.

[0734] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора пустой ЛНЧ или раствора нагруженной ЛНЧ дополнительно включает лиофилизацию.

[0735] В некоторых вариантах осуществления лиофилизация включает замораживание раствора нагруженной ЛНЧ при температуре от около −100 °C до около 0 °C, от около −80 °C до около −10 °C, от около −60 °C до около −20 °C, от около −50 °C до около −25 °C или от около −40 °C до около −30 °C.

[0736] В некоторых вариантах осуществления лиофилизация дополнительно включает высушивание замороженного раствора нагруженной ЛНЧ с образованием лиофилизированной пустой ЛНЧ или лиофилизированной нагруженной ЛНЧ.

[0737] В некоторых вариантах осуществления высушивание проводят в вакууме в диапазоне от около 50 мТорр до около 150 мТорр.

[0738] В некоторых вариантах осуществления высушивание осуществляют при температуре от около −35°C до около −15°C.

[0739] В некоторых вариантах осуществления высушивание проводят при температуре от около комнатной температуры до около 25 °C.

[0740] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора пустой ЛНЧ или раствора нагруженной ЛНЧ дополнительно включает хранения.

[0741] В некоторых вариантах осуществления хранение включает хранение пустой ЛНЧ или нагруженной ЛНЧ при температуре около -80 °C, около -78 °C, около -76 °C, около -74 °C, около -72 °C, около -70 °C, около -65 °C, около -60 °C, около -55 °C, около -50 °C, около -45 °C, около -40 °C, около -35 °C или около -30 °C в течение по меньшей мере 1 дня, по меньшей мере 2 дней, по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев или по меньшей мере 1 года.

[0742] В некоторых вариантах осуществления хранение включает хранение пустой ЛНЧ или нагруженной ЛНЧ при температуре около -40°C, около -35°C, около -30°C, около -25°C, около -20°C, около -15°C, около -10°C, около -5°C, около 0°C, около 5°C, около 10°C, около 15°C, около 20°C или около 25°C в течение по меньшей мере 1 дня, по меньшей мере 2 дней, по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев или по меньшей мере 1 года.

[0743] В некоторых вариантах осуществления хранение включает хранение пустой ЛНЧ или нагруженной ЛНЧ при температуре от около -40 °C до около 0 °C, от около -35 °C до около -5 °C, от около -30 °C до около -10 °C, от около -25 °C до около -15 °C, от около -22 °C до около -18 °C или от около -21 °C до около -19 °C в течение по меньшей мере 1 дня, по меньшей мере 2 дней, по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев или по меньшей мере 1 года.

[0744] В некоторых вариантах осуществления хранение включает хранение пустой ЛНЧ или нагруженной ЛНЧ при температуре около -20 °C в течение по меньшей мере 1 дня, по меньшей мере 2 дней, по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2

недель, по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев или по меньшей мере 1 года.

[0745] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора пустой ЛНЧ или раствора нагруженной ЛНЧ дополнительно включает упаковку.

[0746] В контексте данного документе «упаковка» может относиться к хранению лекарственного продукта в его конечном состоянии или к хранению промежуточного продукта пустой ЛНЧ, нагруженной ЛНЧ или состава ЛНЧ перед их помещением в конечную упаковку. Режимы хранения и/или упаковки включают, но не ограничиваются этим, охлаждение в стерильных пакетах, охлажденные или замороженные составы в флаконах, лиофилизированные составы в флаконах и т. д.

[0747] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора пустой ЛНЧ или раствора нагруженной ЛНЧ включает: iia) добавление криопротектора в раствор пустой ЛНЧ или раствор нагруженной ЛНЧ.

[0748] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора пустой ЛНЧ или раствора нагруженной ЛНЧ включает: iib) фильтрацию раствора пустой ЛНЧ или раствора нагруженной ЛНЧ.

[0749] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора пустой ЛНЧ или раствора нагруженной ЛНЧ включает:

iia) добавление криопротектора в раствор пустой ЛНЧ или раствор нагруженной ЛНЧ; и

iic) фильтрацию раствора пустой ЛНЧ или раствора нагруженной ЛНЧ.

[0750] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора пустой ЛНЧ или раствора нагруженной ЛНЧ включает один или более из следующих этапов:

iib) добавление криопротектора в раствор пустой ЛНЧ или раствор нагруженной ЛНЧ;

iic) лиофилизация раствора пустой ЛНЧ или раствора нагруженной ЛНЧ с образованием таким образом лиофилизированной композиции ЛНЧ;

iid) хранение раствора пустой ЛНЧ или раствора нагруженной ЛНЧ лиофилизированной композиции ЛНЧ; и

iie) добавление буферного раствора в раствор пустой ЛНЧ, раствор нагруженной ЛНЧ или лиофилизированную композицию ЛНЧ с образованием таким образом состава ЛНЧ.

[0751] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора пустой ЛНЧ включает: iia) добавление криопротектора в раствор пустой ЛНЧ.

[0752] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора пустой ЛНЧ включает: iib) фильтрацию раствора пустой ЛНЧ

[0753] В некоторых вариантах осуществления этап обработки раствора пустой ЛНЧ включает:

iia) добавление криопротектора в раствор пустой ЛНЧ; и

iic) фильтрацию раствора пустой ЛНЧ.

[0754] В некоторых вариантах осуществления криопротектор добавляют в раствор пустой ЛНЧ или раствор нагруженной ЛНЧ перед лиофилизацией. В некоторых вариантах осуществления криопротектор содержит один или более криозащитных средств, и каждый из одного или более криозащитных средств независимо представляет собой полиол (например, диол или триол, такой как пропиленгликоль (т.е., 1,2-пропандиол), 1,3-пропандиол, глицерин, (+/-)-2-метил-2,4-пентандиол, 1,6-гександиол, 1,2-бутандиол, 2,3-бутандиол, этиленгликоль или диэтиленгликоль), не обладающий поверхностной активностью сульфобетаин (например, NDSB-201 (3-(1-пиридино)-1-пропансульфонат), осмолит (например, L-пролин или триметиламина N-оксид дигидрат), полимер (например, полиэтиленгликоль 200 (ПЭГ 200), ПЭГ 400, ПЭГ 600, ПЭГ 1000, PEG_{2k}-DMG, ПЭГ 3350, ПЭГ 4000, ПЭГ 8000, ПЭГ 10000, ПЭГ 20000, монометиловый эфир полиэтиленгликоля 550 (МПЭГ 550), МПЭГ 600, МПЭГ 2000, МПЭГ 3350, МПЭГ 4000, МПЭГ 5000, поливинилпирролидон (например, поливинилпирролидон K 15), пентаэритрит пропоксилат или полипропиленгликоль P 400), органический растворитель (например, диметилсульфоксид (DMSO) или этанол), сахар (например, D-(+)-сахарозу, D-сорбит, трегалоза, D-(+)-мальтозы моногидрат, мезо-эритрит, ксилит, мио-инозитол, D-(+)-рафинозы пентагидрат, D-(+)-трегалозы дигидрат или D-(+)-глюкозы моногидрат) или соль (например, ацетат лития, хлорид лития, формиат лития, нитрат лития, сульфат натрия, ацетат магния, ацетат натрия, хлорид натрия, формиат натрия, малонат натрия, нитрат натрия, сульфат натрия или любой их гидрат), или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления криопротектор содержит сахарозу. В некоторых вариантах осуществления криопротектор и/или вспомогательное вещество представляет собой сахарозу. В некоторых вариантах осуществления криопротектор содержит ацетат натрия. В некоторых вариантах осуществления криопротектор и/или вспомогательное вещество представляет собой ацетат натрия. В некоторых вариантах осуществления криопротектор содержит сахарозу и ацетат натрия.

[0755] В некоторых вариантах осуществления криопротектор содержит

криозащитный агент, присутствующий в концентрации от около 10 г/л до около 1000 г/л, от около 25 г/л до около 950 г/л, от около 50 г/л до около 900 г/л, от около 75 г/л до около 850 г/л, от около 100 г/л до около 800 г/л, от около 150 г/л до около 750 г/л, от около 200 г/л до около 700 г/л, от около 250 г/л до около 650 г/л, от около 300 г/л до около 600 г/л, от около 350 г/л до около 550 г/л, от около 400 г/л до около 500 г/л и от около 450 г/л до около 500 г/л. В некоторых вариантах осуществления криопротектор содержит криозащитный агент, присутствующий в концентрации от около 10 г/л до около 500 г/л, от около 50 г/л до около 450 г/л, от около 100 г/л до около 400 г/л, от около 150 г/л до около 350 г/л, от около 200 г/л до около 300 г/л и от около 200 г/л до около 250 г/л. В некоторых вариантах осуществления криопротектор содержит криозащитный агент, присутствующий в концентрации около 10 г/л, около 25 г/л, около 50 г/л, около 75 г/л, около 100 г/л, около 150 г/л, около 200 г/л, около 250 г/л, около 300 г/л, около 300 г/л, около 350 г/л, около 400 г/л, около 450 г/л, около 500 г/л, около 550 г/л, около 600 г/л, около 650 г/л, около 700 г/л, около 750 г/л, около 800 г/л, около 850 г/л, около 900 г/л, около 950 г/л и около 1000 г/л.

[0756] В некоторых вариантах осуществления криопротектор содержит криозащитный агент, присутствующий в концентрации от около 0,1 мМ до около 100 мМ, от около 0,5 мМ до около 90 мМ, от около 1 мМ до около 80 мМ, от около 2 мМ до около 70 мМ, от около 3 мМ до около 60 мМ, от около 4 мМ до около 50 мМ, от около 5 мМ до около 40 мМ, от около 6 мМ до около 30 мМ, от около 7 мМ до около 25 мМ, от около 8 мМ до около 20 мМ, от около 9 мМ до около 15 мМ и от около 10 мМ до около 15 мМ. В некоторых вариантах осуществления криопротектор содержит криозащитный агент, присутствующий в концентрации от около 0,1 мМ до около 10 мМ, от около 0,5 мМ до около 9 мМ, от около 1 мМ до около 8 мМ, от около 2 мМ до около 7 мМ, от около 3 мМ до около 6 мМ и от около 4 мМ до около 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления криопротектор содержит криозащитный агент, присутствующий в концентрации около 0,1 мМ, около 0,5 мМ, около 1 мМ, около 2 мМ, около 3 мМ, около 4 мМ, около 5 мМ, около 6 мМ, около 7 мМ, около 8 мМ, около 9 мМ, около 10 мМ, около 15 мМ, около 20 мМ, около 25 мМ, около 30 мМ, около 35 мМ, около 40 мМ, около 45 мМ, около 50 мМ, около 55 мМ, около 60 мМ, около 65 мМ, около 70 мМ, около 75 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ, около 90 мМ, около 95 мМ и около 100 мМ.

[0757] В некоторых вариантах осуществления криопротектор содержит сахарозу.

[0758] В некоторых вариантах осуществления криопротектор содержит водный

раствор, содержащий сахарозу.

[0759] В некоторых вариантах осуществления криопротектор содержит водный раствор, содержащий около 700 ± 300 г/л, 700 ± 200 г/л, 700 ± 100 г/л, 700 ± 90 г/л, 700 ± 80 г/л, 700 ± 70 г/л, 700 ± 60 г/л, 700 ± 50 г/л, 700 ± 40 г/л, 700 ± 30 г/л, 700 ± 20 г/л, 700 ± 10 г/л, 700 ± 9 г/л, 700 ± 8 г/л, 700 ± 7 г/л, 700 ± 6 г/л, 700 ± 5 г/л, 700 ± 4 г/л, 700 ± 3 г/л, 700 ± 2 г/л или 700 ± 1 г/л сахарозы.

[0760] В некоторых вариантах осуществления криопротектор содержит водный раствор, содержащий ацетат натрия и сахарозу.

[0761] В некоторых вариантах осуществления криопротектор содержит водный раствор, содержащий:

(a) около 5 ± 1 мМ, около 5 ± 0,9 мМ, около 5 ± 0,8 мМ, около 5 ± 0,5 мМ, около 5 ± 0,6 мМ, около 5 ± 0,5 мМ, около 5 ± 0,4 мМ, около 5 ± 0,3 мМ, около 5 ± 0,2 мМ или около 5 ± 0,1 мМ ацетата натрия; и

(b) около 700 ± 300 г/л, 700 ± 200 г/л, 700 ± 100 г/л, 700 ± 90 г/л, 700 ± 80 г/л, 700 ± 70 г/л, 700 ± 60 г/л, 700 ± 50 г/л, 700 ± 40 г/л, 700 ± 30 г/л, 700 ± 20 г/л, 700 ± 10 г/л, 700 ± 9 г/л, 700 ± 8 г/л, 700 ± 7 г/л, 700 ± 6 г/л, 700 ± 5 г/л, 700 ± 4 г/л, 700 ± 3 г/л, 700 ± 2 г/л или 700 ± 1 г/л сахарозы.

[0762] В некоторых вариантах осуществления криопротектор содержит водный раствор, содержащий ацетат натрия и сахарозу, при этом водный раствор имеет значение pH 5,0 ± 2,0, 5,0 ± 1,5, 5,0 ± 1,0, 5,0 ± 0,9, 5,0 ± 0,8, 5,0 ± 0,7, 5,0 ± 0,6, 5,0 ± 0,5, 5,0 ± 0,4, 5,0 ± 0,3, 5,0 ± 0,2 или 5,0 ± 0,1.

[0763] В некоторых вариантах осуществления криопротектор содержит водный раствор, содержащий:

(a) около 5 ± 1 мМ, около 5 ± 0,9 мМ, около 5 ± 0,8 мМ, около 5 ± 0,5 мМ, около 5 ± 0,6 мМ, около 5 ± 0,5 мМ, около 5 ± 0,4 мМ, около 5 ± 0,3 мМ, около 5 ± 0,2 мМ или около 5 ± 0,1 мМ ацетата натрия; и

(b) около 700 ± 300 г/л, 700 ± 200 г/л, 700 ± 100 г/л, 700 ± 90 г/л, 700 ± 80 г/л, 700 ± 70 г/л, 700 ± 60 г/л, 700 ± 50 г/л, 700 ± 40 г/л, 700 ± 30 г/л, 700 ± 20 г/л, 700 ± 10 г/л, 700 ± 9 г/л, 700 ± 8 г/л, 700 ± 7 г/л, 700 ± 6 г/л, 700 ± 5 г/л, 700 ± 4 г/л, 700 ± 3 г/л, 700 ± 2 г/л или 700 ± 1 г/л сахарозы; и

при этом водный раствор имеет значение pH 5,0 ± 2,0, 5,0 ± 1,5, 5,0 ± 1,0, 5,0 ± 0,9, 5,0 ± 0,8, 5,0 ± 0,7, 5,0 ± 0,6, 5,0 ± 0,5, 5,0 ± 0,4, 5,0 ± 0,3, 5,0 ± 0,2 или 5,0 ± 0,1.

[0764] В некоторых вариантах осуществления лиофилизацию проводят в подходящем стеклянном резервуаре (например, 10 мл цилиндрическом стеклянном флаконе). В некоторых вариантах осуществления стеклянный резервуар

выдерживает экстремальные изменения температуры от менее чем −40 °C и выше комнатной температуры за короткие периоды времени и/или вырезан так, чтобы иметь однородную толщину. В некоторых вариантах осуществления этап лиофилизации включает замораживание раствора ЛНЧ при температуре выше чем около −40 °C с образованием, таким образом, замороженного раствора ЛНЧ; и высушивание замороженного раствора ЛНЧ с образованием лиофилизированной композиции ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления этап лиофилизации включает замораживание раствора ЛНЧ при температуре выше чем около −40 °C и ниже чем около −30 °C. Этап замораживания приводит к линейному снижению температуры до конечной за около 6 минут, предпочтительно при около 1 °C в минуту от 20 °C до −40 °C. В некоторых вариантах осуществления этап замораживания приводит к линейному снижению температуры до конечной за около 6 минут при около 1 °C в минуту от 20 °C до −40 °C. В некоторых вариантах осуществления можно использовать 12–15 % сахарозы, и при этом этап высушивания проводят в вакууме в диапазоне от около 50 мТорр до около 150 мТорр. В некоторых вариантах осуществления можно использовать 12–15 % сахарозы, и при этом этап высушивания проводят в вакууме в диапазоне от около 50 мТорр до около 150 мТорр, сначала при низкой температуре в диапазоне от около −35 °C до около −15 °C, а затем при более высокой температуре в диапазоне от комнатной температуры до около 25 °C. В некоторых вариантах осуществления можно использовать 12–15 % сахарозы, и при этом этап высушивания проводят в вакууме в диапазоне от около 50 мТорр до около 150 мТорр, и при этом этап высушивания завершается за три – семь дней. В некоторых вариантах осуществления можно использовать 12–15 % сахарозы, и при этом этап высушивания проводят в вакууме в диапазоне от около 50 мТорр до около 150 мТорр, сначала при низкой температуре в диапазоне от около −35 °C до около −15 °C, а затем при более высокой температуре в диапазоне от комнатной температуры до около 25 °C, и при этом этап высушивания завершается за три – семь дней. В некоторых вариантах осуществления этап высушивания проводят в вакууме в диапазоне от около 50 мТорр до около 100 мТорр. В некоторых вариантах осуществления этап высушивания проводят в вакууме в диапазоне от около 50 мТорр до около 100 мТорр, сначала при низкой температуре в диапазоне от около −15 °C до около 0 °C, а затем при более высокой температуре.

[0765] В некоторых вариантах осуществления раствор пустой ЛНЧ, раствор нагруженной ЛНЧ или лиофилизированную композицию ЛНЧ хранят при pH от

около 3,5 до около 8,0, от около 4,0 до около 7,5, от около 4,5 до около 7,0, от около 5,0 до около 6,5 и от около 5,5 до около 6,0. В некоторых вариантах осуществления раствор пустой ЛНЧ, раствор нагруженной ЛНЧ или лиофилизированную композицию ЛНЧ хранят при pH около 3,5, около 4,0, около 4,5, около 4,6, около 4,7, около 4,8, около 4,9, около 5,0, около 5,1, около 5,2, около 5,3, около 5,4, около 4,5, около 5,5, около 6,5, около 7,0, около 7,5 и около 8,0.

[0766] В некоторых вариантах осуществления раствор пустой ЛНЧ, раствор нагруженной ЛНЧ или лиофилизированную композицию ЛНЧ хранят в криопротекторе, содержащем сахарозу и ацетат натрия. В некоторых вариантах осуществления раствор пустой ЛНЧ, раствор нагруженной ЛНЧ или лиофилизированную композицию ЛНЧ хранят в криопротекторе, содержащем от около 150 г/л до около 350 г/л сахарозы и от около 3 мМ до около 6 мМ ацетата натрия при pH от около 4,5 до около 7,0. В некоторых вариантах осуществления раствор пустой ЛНЧ, раствор нагруженной ЛНЧ или лиофилизированную композицию ЛНЧ хранят в криопротекторе, содержащем около 200 г/л сахарозы и 5 мМ ацетата натрия при pH около 5,0.

[0767] В некоторых вариантах осуществления раствор пустой ЛНЧ, раствор нагруженной ЛНЧ или лиофилизированную композицию ЛНЧ хранят при температуре около -80 °C, около -78 °C, около -76 °C, около -74 °C, около -72 °C, около -70 °C, около -65 °C, около -60 °C, около -55 °C, около -50 °C, около -45 °C, около -40 °C, около -35 °C или около -30 °C перед добавлением буферного раствора.

[0768] В некоторых вариантах осуществления раствор пустой ЛНЧ, раствор нагруженной ЛНЧ или лиофилизированную композицию ЛНЧ хранят при температуре около -40 °C, около -35 °C, около -30 °C, около -25 °C, около -20 °C, около -15 °C, около -10 °C, около -5 °C, около 0 °C, около 5 °C, около 10 °C, около 15 °C, около 20 °C или около 25 °C перед добавлением буферного раствора.

[0769] В некоторых вариантах осуществления раствор пустой ЛНЧ, раствор нагруженной ЛНЧ или лиофилизированную композицию ЛНЧ хранят при температуре от около -40°C до около 0°C, от около -35°C до около -5°C, от около -30°C до около -10°C, от около -25°C до около -15°C, от около -22°C до около -18°C, или от около -21°C до около -19°C до добавления буферного раствора.

[0770] В некоторых вариантах осуществления раствор пустой ЛНЧ, раствор нагруженной ЛНЧ или лиофилизированную композицию ЛНЧ хранят при температуре около -20 °C перед добавлением буферного раствора.

[0771] Некоторые аспекты способов описаны в заявке PCT № WO/2020/160397

которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

[0772] В данном документе также описаны клетки, содержащие наночастицу. Клетки могут быть эпителиальными клетками. Например, клетки могут быть клетками легких. Клетки могут быть клетками бронхиального эпителия человека (HBE). Такие клетки могут контактировать с ЛНЧ in vitro или in vivo.

22. Другие средства доставки

a. Липосомы, липоплексы и липидные наночастицы

[0773] В некоторых вариантах осуществления композиции или составы по данному изобретению содержат средство доставки, например, липосому, лиоплекс, липидную наночастицу или любую их комбинацию. Полезная нагрузка для лечения MB, например, полинуклеотиды, описанные в данном документе (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR), может быть составлена с использованием одной или нескольких липосом, липоплексов или липидных наночастиц. Липосомы, липоплексы или липидные наночастицы можно использовать для повышения эффективности полинуклеотидов, направленных на продукцию белка, поскольку эти составы могут повышать трансфекцию клеток полинуклеотидом; и/или увеличить трансляцию кодируемого белка. Липосомы, липоплексы или липидные наночастицы также можно использовать для повышения стабильности полинуклеотидов.

[0774] Липосомы представляют собой искусственно приготовленные везикулы, которые в основном могут состоять из липидного бислоя и могут использоваться в качестве средства доставки для введения фармацевтических составов. Липосомы могут быть разного размера. Мультиламеллярные везикулы (MLV, англ.: multilamellar vesicle) могут иметь диаметр в сотни нанометров и могут содержать серию концентрических бислоев, разделенных узкими водными отсеками. Небольшие уницеллюлярные везикулы (SUV, англ.: unicellular vesicle) могут быть меньше 50 нм в диаметре, а большие однослойные везикулы (LUV, англ.: unilamellar vesicle) могут иметь диаметр от 50 до 500 нм. Конструкция липосом может включать, помимо прочего, опсонины или лиганды для улучшения прикрепления липосом к нездоровой ткани или для активации таких явлений, как, помимо прочего, эндоцитоз. Липосомы могут иметь низкое или высокое значение pH для улучшения доставки фармацевтических составов.

[0775] Образование липосом может зависеть от заключенного фармацевтического состава и липосомальных ингредиентов, природы среды, в которой диспергированы липидные везикулы, эффективной концентрации заключенного вещества и его потенциальной токсичности, любых дополнительных процессов, связанных с применением и/или доставкой везикул, оптимального размера, полидисперсности и срока хранения везикул для предполагаемого применения, а также воспроизводимости от партии к партии и увеличения производства безопасных и эффективных липосомальных продуктов и т. д.

[0776] В качестве неограничивающего примера, липосомы, такие как синтетические мембранные везикулы, могут быть получены способами, аппаратами и устройствами, описанными в пат. публикации США №№ US 20130177638, US 20130177637, US 20130177636, US 20130177635, US 20130177634, US 20130177633, US 20130183375, US 20130183373 и US 20130183372. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть инкапсулированы липосомой и/или они могут содержаться в водном ядре, которое затем может быть инкапсулировано липосомой, как описано, например, в международных публикациях №№ WO 2012031046, WO 2012031043, WO 2012030901, WO 2012006378 и WO 2013086526; и пат. публикациях США №№ US 20130189351, US 20130195969 и US 20130202684. Каждая из ссылок в данном документе полностью включена посредством ссылки.

[0777] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка для лечения МВ, например полинуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть включены в состав катионной эмульсии масло-в-воде, где частица эмульсии содержит масляное ядро и катионный липид, который может взаимодействовать с полинуклеотидом, прикрепляющий молекулу к частице эмульсии. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть включены в состав эмульсии вода-в-масле, содержащей непрерывную гидрофобную фазу, в которой диспергирована гидрофильная фаза. Примеры эмульсий могут быть получены способами, описанными в международных публикациях №№ WO 2012006380 и WO 201087791, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[0778] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка для лечения МВ, например полинуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть включены в состав комплекса липид-поликатион. Образование комплекса липид-поликатион можно осуществить способами, описанными, например, в пат. публикации США №

US 20120178702. В качестве неограничивающего примера поликатион может включать катионный пептид или полипептид, такой как, помимо прочего, полилизин, полиорнитин и/или полиаргинин, и катионные пептиды, описанные в международной публикации № WO 2012013326 или пат. публикации США № US 20130142818. Каждая из ссылок в данном документе полностью включена посредством ссылки.

[0779] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка для лечения МВ, например полинуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть включены в состав липидных наночастиц (ЛНЧ), таких как описанные в международных публикациях №№ WO 2013123523, WO 2012170930, WO 2011127255 и WO 2008103276; и пат. публикации США № US 20130171646, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[0780] Составы липидных наночастиц обычно содержат один или несколько липидов. В некоторых вариантах осуществления липид представляет собой ионизируемый липид (*например*, ионизируемый аминолипид), иногда называемый в данной области техники «ионизируемым катионным липидом». В некоторых вариантах осуществления составы липидных наночастиц дополнительно содержат другие компоненты, в том числе фосфолипид, структурный липид и молекулу, способную снижать агрегацию частиц, например ПЭГ или ПЭГ-модифицированный липид.

[0781] Примеры ионизируемых липидов включают, помимо прочего, любое из Соединений 1-342, описанных в данном документе, DLin-MC3-DMA (MC3), DLin-DMA, DLenDMA, DLin-D-DMA, DLin-K-DMA, DLin-M-C2-DMA, DLin-K-DMA, DLin-KC2-DMA, DLin-KC3-DMA, DLin-KC4-DMA, DLin-C2K-DMA, DLin-MP-DMA, DODMA, 98N12-5, C12-200, DLin-C-DAP, DLin-DAC, DLinDAP, DLinAP, DLin-EG-DMA, DLin-2-DMAP, KL10, KL22, KL25, Octyl-CLinDMA, Octyl-CLinDMA (2R), Octyl-CLinDMA (2S) и любую их комбинацию. Другие иллюстративные ионизируемые липиды включают: (13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амин (L608), (20Z,23Z)-N,N-диметилнонакоза-20,23-диен-10-амин, (17Z,20Z)-N,N-димемелгексоза-17,20-диен-9-амин, (16Z,19Z)-N5N-диметилпентакоза-16,19-диен-8-амин, (13Z,16Z)-N,N-диметилдокоза-13,16-диен-5-амин, (12Z,15Z)-N,N-диметилгеникоза-12,15-диен-4-амин, (14Z,17Z)-N,N-диметилтрикоза-14,17-диен-6-амин, (15Z,18Z)-N,N-диметилтетракоза-15,18-диен-7-амин, (18Z,21Z)-N,N-диметилгептокоза-18,21-диен-10-амин, (15Z,18Z)-N,N-диметилтетракоза-15,18-диен-5-амин, (14Z,17Z)-N,N-диметилтрикоза-14,17-диен-4-

амин, (19Z,22Z)-N,N-димегилоктакоза-19,22-диен-9-амин, (18Z,21Z)-N,N-диметилгептокоза-18,21-диен-8-амин, (17Z,20Z)-N,N-диметилгексакоза-17,20-диен-7-амин, (16Z,19Z)-N,N-диметилпентакоза-16,19-диен-6-амин, (22Z,25Z)-N,N-диметилгентриаконта-22,25-диен-10-амин, (21Z,24Z)-N,N-диметилтриаконта-21,24-диен-9-амин, (18Z)-N,N-диметилгептакос-18-ен-10-амин, (17Z)-N,N-диметилгексакоз-17-ен-9-амин, (19Z,22Z)-N,N-диметилоктакоза-19,22-диен-7-амин, N,N-диметилгептакозан-10-амин, (20Z,23Z)-N-этил-N-метилнонакоза-20,23-диен-10-амин, 1-[(11Z,14Z)-1-ноniликоза-11,14-диен-1-ил]пирролидин, (20Z)-N,N-диметилгептакос-20-ен-10-амин, (15Z)-N,N -диметилэптакос-15-ен-10-амин, (14Z)-N,N-диметилнонакос-14-ен-10-амин, (17Z)-N,N-диметилнонакос-17-ен-10-амин, (24Z)-N,N-диметилтритриаконт-24-ен-10-амин, (20Z)-N,N-диметилнонакос-20-ен-10-амин, (22Z)-N,N-диметилгентриаконт-22-ен-10-амин, (16Z)-N,N-диметилпентакос-16-ен-8-амин, (12Z,15Z)-N,N-диметил-2-нонилгеникоза-12,15-диен-1-амин, N,N-диметил-1-[(1S,2R)-2-октилциклопропил]эптадекан-8-амин, 1-[(1S,2R)-2-гексилциклопропил]-N,N-диметилнонадекан-10-амин, N,N-диметил-1-[(1S,2R)-2-октилциклопропил]нонадекан-10-амин, N,N-диметил-21-[(1S,2R)-2-октилциклопропил]геникозан-10-амин, N,N-диметил-1-[(1S,2S)-2-{[(1R,2R)-2-пентилциклопропил]метил}циклопропил]нонадекан-10-амин, N,N-диметил-1-[(1S,2R)-2-октилциклопропил]гексадекан-8-амин, N,N-диметил-[(1R,2S)-2-ундециклопропил]тетрадекан-5-амин, N,N-диметил-3-{7-[(1S,2R)-2-октилциклопропил]гептил}додекан-1-амин, 1-[(1R,2S)-2-гептилциклопропил]-N,N-диметилоктадекан-9-амин, 1-[(1S,2R)-2-децилциклопропил]-N,N-диметилпентадекан-6-амин, N,N-диметил-1-[(1S,2R)-2-октилциклопропил]пентадекан-8-амин, R-N,N-диметил-1-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]-3-(октилокси)пропан-2-амин, S-N,N-диметил-1-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]-3-(октилокси)пропан-2-амин, 1-{2-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]-1-[(октилокси)метил]этил}пирролидин, (2S)-N,N-диметил-1-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]-3-[(5Z)-окт-5-ен-1-илокси]пропан-2-амин, 1-{2-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]-1-[(октилокси)метил]этил}азетидин, (2S)-1-(гексилокси)-N,N-диметил-3-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]пропан-2-амин, (2S)-1-(гептилокси)-N,N-диметил-3-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]пропан-2-амин, N,N-диметил-1-(нонилокси)-3-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]пропан-2-амин, N,N-диметил-1-[(9Z)-октадец-9-ен-1-илокси]-3-(октилокси)пропан-2-амин; (2S)-N,N-диметил-1-[(6Z,9Z,12Z)-октадека-6,9,12-триен-1-илокси]-3-(октилокси)пропан-2-амин, (2S)-1-[(11Z,14Z)-икоза-11,14-диен-

1-илокси]-N,N-диметил-3-(пентилокси)пропан-2-амин, (2S)-1-(гексилокси)-3-[(11Z,14Z)-икоза-11,14-диен-1-илокси]-N,N-диметилпропан-2-амин, 1-[(11Z,14Z)-икоза-11,14-диен-1-илокси]-N,N-диметил-3-(октилокси)пропан-2-амин, 1-[(13Z,16Z)-докоза-13,16-диен-1-илокси]-N,N-диметил-3-(октилокси)пропан-2-амин, (2S)-1-[(13Z,16Z)-докоза-13,16-диен-1-илокси]-3-(гексилокси)-N,N-диметилпропан-2-амин, (2S)-1-[(13Z)-докос-13-ен-1-илокси]-3-(гексилокси)-N,N-диметилпропан-2-амин, 1-[(13Z)-докос-13-ен-1-илокси]-N,N-диметил-3-(октилокси)пропан-2-амин, 1-[(9Z)-гексадец-9-ен-1-илокси]-N,N-диметил-3-(октилокси)пропан-2-амин, (2R)-N,N-диметил-H(1-метоилоктил)окси]-3-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]пропан-2-амин, (2R)-1-[(3,7-диметилоктил)окси]-N,N-диметил-3-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]пропан-2-амин, N,N-диметил-1-(октилокси)-3-({8-[(1S,2S)-2-{[(1R,2R)-2-пентилциклопропил]метил}циклопропил]октил}окси)пропан-2-амин, N,N-диметил-1-{[8-(2-октилциклопропил)октил]окси}-3-(октилокси)пропан-2-амин и (11E,20Z,23Z)-N,N-диметилнонакоза-11,20,2-триен-10-амин, и любую их комбинацию.

[0782] Фосфолипиды включают в себя, помимо прочего, глицерофосфолипиды, такие как фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины, фосфатидилсерины, фосфатидилинозитолы, фосфатидилглицерины и фосфатидные кислоты. Фосфолипиды также включают фосфосфинголипид, такой как сфингомиелин. В некоторых вариантах осуществления фосфолипиды представляют собой DLPC, DMPC, DOPC, DPPC, DSPC, DUPC, 18:0 Diether PC, DLnPC, DAPC, DHAPC, DOPE, 4ME 16:0 PE, DSPE, DLPE, DLnPE, DAPE, DHAPE, DOPG, и любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления фосфолипиды представляют собой MPPC, MSPC, PMPC, PSPC, SMPC, SPPC, DHAPE, DOPG и любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления количество фосфолипидов (например, DSPC) в липидной композиции колеблется от около 1 моль% до около 20 моль%.

[0783] Структурные липиды включают стеролы и липиды, содержащие фрагменты стеролов. В некоторых вариантах осуществления структурные липиды включают холестерин, фекостерол, ситостерол, эргостерол, кампестерол, стигмастерол, брассикастерол, томатидин, томатин, урсоловую кислоту, альфа-токоферол и их смеси. В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой холестерин. В некоторых вариантах осуществления количество структурных липидов (например, холестерина) в липидной композиции колеблется от около 20 моль% до около 60 моль%.

[0784] ПЭГ-модифицированные липиды включают ПЭГ-модифицированные фосфатидилэтаноламин и фосфатидную кислоту, конъюгаты ПЭГ-церамиды (например, ПЭГ-CerC14 или ПЭГ-CerC20), ПЭГ-модифицированные диалкиламины и ПЭГ-модифицированные 1,2-диацилоксипропан-3-амины. Такие липиды также называют пегилированными липидами. Например, ПЭГ-липид может представлять собой липид ПЭГ-c-DOMG, ПЭГ-DMG, ПЭГ-DLPE, ПЭГ DMPE, ПЭГ-DPPC или ПЭГ-DSPE. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой 1,2-димиристоил-sn-глицерин метоксиполиэтиленгликоль (ПЭГ-DMG), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N- [амино(полиэтиленгликоль)] (ПЭГ-DSPE), ПЭГ-дистерилглицерин (ПЭГ-DSG), ПЭГ-дипалметолеил, ПЭГ-диолеил, ПЭГ-дистеарил, ПЭГ-диацилгликамид (ПЭГ-DAG), ПЭГ-дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (ПЭГ-DPPE) или ПЭГ-l,2-димиристилоксилпропил-3-амин (ПЭГ-c-DMA). В некоторых вариантах осуществления фрагмент ПЭГ имеет размер около 1000, 2000, 5000, 10000, 15000 или 20000 дальтон. В некоторых вариантах осуществления количество ПЭГ-липида в липидной композиции колеблется от около 0 моль% до около 5 моль%.

[0785] В некоторых вариантах осуществления составы ЛНЧ, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать молекулу, усиливающих проницаемость. Неограничивающие молекулы, усиливающих проницаемость, описаны в пат. публикации США № US 20050222064, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[0786] Композиции ЛНЧ могут дополнительно содержать фосфатный конъюгат. Фосфатный конъюгат может увеличивать время циркуляции in vivo и/или увеличивать адресную доставку наночастицы. Фосфатные конъюгаты могут быть получены способами, описанными, например, в международной публикации № WO 2013033438 или пат. публикации США № US 20130196948. Композиция ЛНЧ может также содержать полимерный конъюгат (например, водорастворимый конъюгат), как описано, например, в пат. публикациях США №№ US 20130059360, US 20130196948 и US 20130072709. Каждая из ссылок в данном документе полностью включена посредством ссылки.

[0787] Составы ЛНЧ могут включать конъюгат для улучшения доставки наночастиц по данному изобретению субъекту. Кроме того, конъюгат может ингибировать фагоцитарный клиренс наночастиц у субъекта. В некоторых вариантах осуществления конъюгат может представлять собой «собственный» пептид, сконструированный из мембранного белка человека CD47 (например,

«собственные» частицы, описанные в Rodriguez et al, Science 2013 339, 971-975, полностью включенной в данное описание посредством ссылки). Как показано в Rodriguez et al. собственные пептиды замедляли опосредованный макрофагами клиренс наночастиц, что усиливало доставку наночастиц.

[0788] Композиции ЛНЧ могут содержать углеводный носитель. В качестве неограничивающего примера, углеводный носитель может включать, помимо прочего, ангидрид-модифицированный фитогликоген или материал типа гликогена, фитогликоген октенилсукцинат, фитогликоген бета-декстрин, ангидрид-модифицированный фитогликоген бета-декстрин (например, международная публикация № WO 2012109121, полностью включенная в данный документ посредством ссылки).

[0789] Композиции ЛНЧ могут быть покрыты поверхностно-активным веществом или полимером для улучшения доставки частицы. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ может быть покрыта гидрофильным покрытием, таким как, помимо прочего, ПЭГ-покрытия и/или покрытия, которые имеют нейтральный поверхностный заряд, как описано в пат. публикации США № US 20130183244, полностью включенной в данный документ посредством ссылки.

[0790] Составы ЛНЧ могут быть разработаны для изменения свойств поверхности частиц, чтобы липидные наночастицы могли проникать через слизистый барьер, как описано патенте США № 8241670 или междунар. публикации № WO 2013110028, содержание каждого из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[0791] ЛНЧ, предназначенная для проникновения через слизь, может содержать полимерный материал (т. е. полимерное ядро) и/или конъюгат полимер-витамин, и/или трехблочный сополимер. Полимерный материал может включать, помимо прочего, полиамины, простые полиэфиры, полиамиды, сложные полиэфиры, поликарбаматы, полимочевины, поликарбонаты, поли(стиролы), полиимиды, полисульфоны, полиуретаны, полиацетилены, полиэтилены, полиэтиленимины, полиизоцианаты, полиакрилаты, полиметакрилаты, полиакрилонитрилы и полиарилаты.

[0792] ЛНЧ, сконструированные для проникновения через слизь, могут также включать агенты, изменяющие свойства поверхности, такие как, помимо прочего, полинуклеотиды, анионные белки (например, бычий сывороточный альбумин), поверхностно-активные вещества (например, катионные поверхностно-активные вещества, такие как, например, диметилдиоктадециламмония бромид), сахара или

производные сахара (например, циклодекстрин), нуклеиновые кислоты, полимеры (например, гепарин, полиэтиленгликоль и полоксамер), муколитические агенты (например, N-ацетилцистеин, полынь обыкновенную, бромелаин, папаин, клеродендрум, ацетилцистеин, бромгексин, карбоцистеин, эпразинон, месну, амброксол, собрерол, домиодол, летостеин, степронин, тиопронин, гелсолин, тимозин β4, дорназу альфа, нелтенексин, эрдостеин) и разные ДНКазы, включая рчДНКазу.

[0793] В некоторых вариантах осуществления проникающий через слизь ЛНЧ может представлять собой гипотонический состав, содержащий покрытие, усиливающее проникновение через слизистую оболочку. Состав может быть гипотоническим для эпителия, к которому он доставляется. Неограничивающие примеры гипотонических составов можно найти, например, в международной публикации № WO 2013110028, полностью включенной в данный документ посредством ссылки.

[0794] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка для лечения МВ, например полинуклеотид, описанный в данном документе, составлена в виде липоплекса, такого как, без ограничения, система ATUPLEXTM, система DACC, система DBTC и другая технология миРНК-липоплекс от Silence Therapeutics (Лондон, Великобритания), STEMFECTTM от STEMGENT® (Кембридж, Массачусетс) и адресная и неадресная доставка нуклеиновых кислот на основе полиэтиленимина (ПЭИ) или протамина (Aleku et al. Cancer Res. 2008 68:9788-9798; 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 80:286-293Weide 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. 2005, 23:709-717; Peer et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 6;104:4095-4100; deFougerolles Hum Gene Ther. 2008 19:125-132; все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

[0795] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка для лечения МВ, например полинуклеотиды, описанные в данном документе, составлены в виде твердых липидных наночастиц (SLN), которые могут иметь сферическую форму со средним диаметром от 10 до 1000 нм. SLN обладают матрицей твердого липидного ядра, которая может растворять липофильные молекулы и может быть

стабилизирована поверхностно-активными веществами и/или эмульгаторами. Примерные SLN могут быть такими, как описано в международной публикации № WO 2013105101, полностью включенной в данном документ посредством ссылки.

[0796] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка для лечения МВ, например полинуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть составлены для контролируемого высвобождения и/или адресной доставки. Используемый в данном документе, «контролируемое высвобождение» относится к профилю высвобождения фармацевтической композиции или соединения, который соответствует определенной схеме высвобождения для достижения терапевтического результата. В одном варианте осуществления полинуклеотиды могут быть инкапсулированы в средство доставки, описанное в данном документе и/или известное в данной области техники, для контролируемого высвобождения и/или адресной доставки. Используемый в данном документе термин «инкапсулировать» означает заключать, окружать или заключать в оболочку. Что касается состава соединений по изобретению, инкапсуляция может быть по существу, полной или частичной. Термин «по существу инкапсулированный» означает, что по меньшей мере более 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более 99% фармацевтической композиции или соединения по изобретению могут быть включены, окружены или заключены в средство доставки. «Частичное инкапсулирование» означает, что менее 10, 10, 20, 30, 40, 50 или менее фармацевтической композиции или соединения по изобретению могут быть включены, окружены или заключены в средство доставки.

[0797] Преимущественно инкапсуляцию можно определить путем измерения избегания или активности фармацевтической композиции или соединения по изобретению с использованием флуоресценции и/или электронной микрофотографии. Например, по меньшей мере 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,9 или более 99% фармацевтической композиции или соединения по изобретению инкапсулированы в средство доставки.

[0798] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка для лечения МВ, например полинуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть инкапсулированы в терапевтические наночастицы, названные в данном документе «полинуклеотидами терапевтических наночастиц». Терапевтические наночастицы могут быть приготовлены способами, описанными, например, в международных публикациях №№ WO 2010005740, WO 2010030763, WO 2010005721, WO 2010005723 и WO 2012054923; и пат. публикациях США №№ US 20110262491, US

20100104645, US 20100087337, US 20100068285, US 20110274759, US 20100068286, US 20120288541, US 20120140790, US 20130123351 и US 20130230567; и патентах США №№ 8206747, 8293276, 8318208 и 8318211, каждый из которых полностью включен в данное описание посредством ссылки.

[0799] В некоторых вариантах осуществления полезная терапевтическая наночастица для лечения МВ, например, полинуклеотид, может быть составлена для пролонгированного высвобождения. Используемый в данном документе термин «пролонгированное высвобождение» относится к фармацевтической композиции или соединению, скорость высвобождения которого соответствует определенному периоду времени. Период времени может включать, помимо прочего, часы, дни, недели, месяцы и годы. В качестве неограничивающего примера, наночастицы полинуклеотидов с замедленным высвобождением, описанные в настоящем документе, могут быть приготовлены, как описано в международной публикации № WO 2010075072 и пат. публикациях США №№ US 20100216804, US 20110217377, US 20120201859 и US 20130150295, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[0800] В некоторых вариантах осуществления полезная терапевтическая наночастица для лечения МВ, например, полинуклеотид, может быть составлена таким образом, чтобы она была специфичной для мишени, например, как описано в международных публикациях №№ WO 2008121949, WO 2010005726, WO 2010005725, WO 2011084521 и WO 2011084518; и пат. публикациях США №№ US 20100069426, US 20120004293 и US 20100104655, каждая из которых полностью включена в данное описание посредством ссылки.

[0801] ЛНЧ могут быть приготовлены с использованием микрожидкостных смесителей или микросмесителей. Типовые микрожидкостные смесители могут включать, помимо прочего, щелевой встречно-штыревой микросмеситель, включая, помимо прочего, микросмесители производства Microinnova (Allerheiligen bei Wildon, Австрия) и/или микросмеситель с расположенными в шахматном порядке елочками (SHM) (см. Zhigaltsevet al., "Bottom-up design and synthesis of limit size lipid nanoparticle systems with aqueous and triglyceride cores using millisecond microfluidic mixing," Langmuir 28:3633-40 (2012); Belliveau et al., "Microfluidic synthesis of highly potent limit-size lipid nanoparticles for in vivo delivery of siRNA," Molecular Therapy-Nucleic Acids. 1:e37 (2012); Chen et al., "Rapid discovery of potent siRNA-containing lipid nanoparticles enabled by controlled microfluidic formulation," J. Am. Chem. Soc. 134(16):6948-51 (2012); каждый из которых полностью включен в данный документ

посредством ссылки). Примеры микросмесителей включают щелевой встречно-штыревой микроструктурированный смеситель (SIMM-V2), стандартный щелевой встречно-штыревой микросмеситель (SSIMM) или смеситель Caterpillar (CPMM), или ударно-струйный смеситель (IJMM) от Institut für Mikrotechnik Mainz GmbH, Майнц, Германия. В некоторых вариантах осуществления способы получения ЛНЧ с использованием SHM дополнительно включают смешивание по меньшей мере двух входных потоков, при этом смешивание происходит за счет индуцированной микроструктурой хаотической адвекции (MICA). В соответствии с этим способом потоки жидкости текут по каналам, расположенным в виде елочки, вызывая вращательный поток и заворачивая жидкости вокруг друг друга. Этот способ также может включать поверхность для смешивания жидкости, при этом поверхность меняет ориентацию во время циркуляции жидкости. Способы получения ЛНЧ с использованием SHM включают способы, описанные в пат. публикациях США №№ US 20040262223 и US 20120276209, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[0802] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка для лечения МВ, например полинуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть включены в липидные наночастицы с использованием микрожидкостной технологии (см. Whitesides, George M., "The Origins and the Future of Microfluidics," Nature 442: 368-373 (2006); и Abraham et al., "Chaotic Mixer for Microchannels," Science 295: 647-651 (2002); каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды могут быть включены в состав липидных наночастиц с использованием чипа микросмесителя, такого как, помимо прочего, от Harvard Apparatus (Holliston, MA) или Dolomite Microfluidics (Royston, UK). Чип микросмесителя можно использовать для быстрого смешивания двух или более потоков жидкости с помощью механизма разделения и рекомбинации.

[0803] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка для лечения МВ, например, полинуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть включены в состав липидных наночастиц, имеющих диаметр от около 1 нм до около 100 нм, например, помимо прочего, от около 1 нм до около 20 нм, от около от 1 нм до около 30 нм, от около 1 нм до около 40 нм, от около 1 нм до около 50 нм, от около 1 нм до около 60 нм, от около 1 нм до около 70 нм, от около 1 нм до около 80 нм, от около 1 нм до около 90 нм, от около 5 нм до около 100 нм, от около 5 нм до около 10 нм, от около 5 нм до около 20 нм, от около 5 нм до около 30 нм, от около 5 нм до около 40

нм, от около 5 нм до около 50 нм, от около 5 нм до около 60 нм, от около 5 нм до около 70 нм, от около 5 нм до около 80 нм, от около 5 нм до около 90 нм, от около 10 до около 100 нм, такой как, помимо прочего, от около 10 до около 20 нм, от около 10 до около 30 нм, от около 10 до около 40 нм, от около 10 до около 50 нм, от около 10 до около 60 нм, от около 10 до около 70 нм, от около 10 до около 80 нм, от около 10 до около 90 нм, от около 20 до около 30 нм, около 20 до около 40 нм, от около 20 до около 50 нм, от около 20 до около 60 нм, от около 20 до около 70 нм, от около 20 до около 80 нм, от около 20 до около 90 нм, от около 20 до около 100 нм, от около 30 до около 40 нм, от около 30 до около 50 нм, от около 30 до около 60 нм, от около 30 до около 70 нм, от около 30 до около 80 нм, от около 30 до около 90 нм, от около 30 до около 100 нм, от около 40 до около 50 нм, от около 40 до около 60 нм, от около 40 до около 70 нм, от около 40 до около 80 нм, от около 40 до около 90 нм, от около 40 до около 100 нм, от около 50 до около 60 нм, от около 50 до около 70 нм, от около 50 до около 80 нм, от около 50 до около 90 нм, от около 50 до около 100 нм, от около 60 до около 70 нм, от около 60 до около 80 нм, от около 60 до около 90 нм, от около 60 до около 100 нм, от около 70 до около 80 нм, от около 70 до около 90 нм, от около 70 до около 100 нм, от около 80 до около 90 нм, от около 80 до около 100 нм и/или от около 90 до около 100 нм.

[0804] В некоторых вариантах осуществления липидные наночастицы могут иметь диаметр от около 10 до 500 нм. В одном варианте осуществления липидная наночастица может иметь диаметр более 100 нм, более 150 нм, более 200 нм, более 250 нм, более 300 нм, более 350 нм, более 400 нм, более 450 нм более 500 нм, более 550 нм, более 600 нм, более 650 нм, более 700 нм, более 750 нм, более 800 нм, более 850 нм, более 900 нм, более 950 нм или более 1000 нм.

[0805] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка для лечения МВ, например, полинуклеотиды, может быть доставлена с использованием меньших ЛНЧ. Такие частицы могут иметь диаметр от менее 0,1 мкм до 100 нм, например, менее 0,1 мкм, менее 1,0 мкм, менее 5 мкм, менее 10 мкм, менее 15 мкм, менее 20 мкм, менее 25 мкм, менее 30 мкм, менее 35 мкм, менее 40 мкм, менее 50 мкм, менее 55 мкм, менее 60 мкм, менее 65 мкм, менее 70 мкм, менее 75 мкм , менее 80 мкм, менее 85 мкм, менее 90 мкм, менее 95 мкм, менее 100 мкм, менее 125 мкм, менее 150 мкм, менее 175 мкм, менее 200 мкм, менее 225 мкм, менее 250 мкм, менее 275 мкм, менее 300 мкм, менее 325 мкм, менее 350 мкм, менее 375 мкм, менее 400 мкм, менее 425 мкм, менее 450 мкм, менее 475 мкм , менее 500 мкм, менее 525 мкм, менее 550 мкм, менее 575 мкм, менее 600 мкм, менее 625 мкм, менее 650 мкм, менее 675 мкм,

менее 700 мкм, менее 725 мкм, менее 750 мкм, менее 775 мкм, менее 800 мкм, менее 825 мкм, менее 850 мкм, менее 875 мкм, менее 900 мкм, менее 925 мкм, менее 950 мкм или менее 975 мкм.

[0806] Наночастицы и микрочастицы, описанные в данном документе, могут быть геометрически сконструированы таким образом, чтобы модулировать макрофагальный и/или иммунный ответ. Геометрически сконструированные частицы могут иметь различные формы, размеры и/или поверхностный заряд для включения полинуклеотидов, описанных в данном документе, для адресной доставки, такой как, помимо прочего, доставка в легкие (см., например, междунар. публикацию № WO 2013082111, полностью включенную в данный документ посредством ссылки). Другие физические особенности геометрически сконструированных частиц могут включать, помимо прочего, фенестрации, изогнутые плечи, асимметрию и шероховатость поверхности, заряд, который может изменить взаимодействие с клетками и тканями.

[0807] В некоторых вариантах осуществления наночастицы, описанные в данном документе, представляют собой стэлс-наночастицы или стэлс-наночастицы, специфичные для мишени, такие как, помимо прочего, описанные в пат. публикации США № US 20130172406, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. Стэлс-наночастицы или стэлс-наночастицы, специфичные для мишени, могут содержать полимерную матрицу, которая может включать два или более полимеров, таких как, помимо прочего, полиэтилены, поликарбонаты, полиангидриды, полигидроксикислоты, полипропилфумераты, поликапролактоны, полиамиды, полиацетали, простые полиэфиры, сложные полиэфиры, поли(ортоэфиры), полицианакрилаты, поливиниловые спирты, полиуретаны, полифосфазены, полиакрилаты, полиметакрилаты, полицианоакрилаты, полимочевины, полистиролы, полиамины, сложные полиэфиры, полиангидриды, простые полиэфиры, полиуретаны, полиметакрилаты, полиакрилаты, полицианоакрилаты или их комбинации.

b. Липидоиды

[0808] В некоторых вариантах осуществления композиции или составы по данному изобретению содержат средство доставки, например, липидоид. Полинуклеотиды, описанные в данном документе (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR), могут быть включены в состав с липидоидами. Комплексы, мицеллы, липосомы или частицы могут быть получены, содержащие эти липидоиды, и, таким образом, для

достижения эффективной доставки полинуклеотида, судя по продукции кодируемого белка, после инъекции липидоидной композиции через локальные и/или системные пути введения. Липидоидные комплексы полинуклеотидов можно вводить различными способами, включая, помимо прочего, внутривенный, внутримышечный или подкожный пути введения.

[0809] Синтез липидоидов описан в литературе (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 Natl Acad Sci U S A. 2010 107:1864-1869; Siegwart et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 108:12996-3001; все из которых включены в данный документ в полном объеме).

[0810] Составы с различными липидоидами, включая, помимо прочего, гидрохлорид пента[3-(1-лауриламинопропионил)]-триэтилентетрамина (TETA-5LAP; также известный как 98N12-5, см. Murugaiah et al., Analytical Biochemistry, 401:61 (2010)), C12-200 (включая производные и варианты) и MD1, можно тестировать на активность in vivo. Липидоид «98N12-5» описан в Akinc et al., Mol Ther. 2009 17:872-879. Липидоид «C12-200» описан в Love et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 107:1864-1869 и Liu and Huang, Molecular Therapy. 2010 669-670. Каждая из ссылок в данном документе полностью включена посредством ссылки.

[0811] В одном варианте осуществления полинуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть включены в состав аминоспиртового липидоида. Аминоспиртовые липидоиды могут быть получены способами, описанными в патенте США № 8450298 (полностью включенном в данное описание посредством ссылки).

[0812] Составы липидоидов могут включать частицы, содержащие 3 или 4, или более компонентов в дополнение к полинуклеотидам. Составы липидоидов и полинуклеотидов, содержащие липоиды, описаны в международной публикации № WO 2015051214 (полностью включенной в данный документ посредством ссылки).

c. Гиалуронидаза

[0813] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка для лечения MB, например, полинуклеотиды, описанные в данном документе (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR) и гиалуронидаза для инъекций (например, внутримышечных или подкожных инъекций). Гиалуронидаза катализирует гидролиз гиалуронана, входящего в состав интерстициального барьера. Гиалуронидаза снижает вязкость гиалуроновой кислоты, тем самым увеличивая проницаемость тканей (Frost, Expert

Opin. Drug Deliv. (2007) 4:427-440). Альтернативно, гиалуронидазу можно использовать для увеличения количества клеток, подвергающихся воздействию полинуклеотидов, вводимых внутримышечно или подкожно.

d. Имитаторы наночастиц

[0814] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка для лечения МВ, например, полинуклеотиды, описанные в данном документе (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR), инкапсулирована внутри и/или абсорбирована на имитаторе наночастиц. Имитатор наночастиц может имитировать функцию доставки организмов или частиц, таких как, помимо прочего, патогены, вирусы, бактерии, грибки, паразиты, прионы и клетки. В качестве неограничивающего примера полезная нагрузка для лечения МВ, например, полинуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть инкапсулированы в невирионную частицу, которая может имитировать функцию доставки вируса (см., например, междунар. публикация № WO 2012006376 и пат. публикации США №№ US 20130171241 и US 20130195968, каждый из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки).

e. Самособирающиеся наночастицы или самособирающиеся макромолекулы

[0815] В некоторых вариантах осуществления композиции или составы по данному изобретению содержат полинуклеотиды, описанные в данном документе (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR) в самособирающихся наночастицах или амфифильных макромолекулах (АМ) для доставки. АМ содержат биосовместимые амфифильные полимеры, которые имеют остов алкилированного сахара, ковалентно связанный с поли(этиленгликолем). В водном растворе АМ самособираются с образованием мицелл. Самособирающиеся наночастицы нуклеиновой кислоты описаны в междунар. заявке № PCT/US2014/027077, а АМ и способы формирования АМ описаны в пат. публикации США № US 20130217753, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.

f. Катионы и анионы

[0816] В некоторых вариантах осуществления композиции или составы по данному изобретению содержат полезную нагрузку для лечения МВ, например, полинуклеотиды, описанные в данном документе (например, полинуклеотид,

содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR), и катион или анион, такой как Zn2+, Ca2+, Cu2+, Mg2+ и их комбинации. Типичные составы могут включать полимеры и полинуклеотид в комплексе с катионом металла, как описано, например, в патенте США №№ 6265389 и 6555525, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления катионные наночастицы могут содержать комбинацию двухвалентных и одновалентных катионов. Доставка полинуклеотидов в катионных наночастицах или в одном или нескольких депо, содержащих катионные наночастицы, может улучшить биодоступность полинуклеотидов, действуя как депо длительного действия и/или уменьшая скорость деградации нуклеазами.

g. Аминокислотные липиды

[0817] В некоторых вариантах осуществления композиции или составы по данному изобретению содержат полезную нагрузку для лечения МВ, например, полинуклеотиды, описанные в данном документе (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR), который представляет собой состав с аминокислотным липидом. Аминокислотные липиды представляют собой липофильные соединения, содержащие аминокислотный остаток и один или несколько липофильных хвостов. Неограничивающие примеры аминокислотных липидов и способы получения аминокислотных липидов описаны в патенте США № 8501824. Аминокислотно-липидные композиции могут доставлять полинуклеотид в высвобождаемой форме, которая содержит аминокислотный липид, который связывает и высвобождает полинуклеотиды. В качестве неограничивающего примера, высвобождение полинуклеотидов, описанных в данном документе, может быть обеспечено кислотолабильным линкером, как описано, например, в патентах США №№ 7098032, 6897196, 6426086, 7138382, 5563250 и 5505931, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки.

h. Интерполиэлектролитные комплексы

[0818] В некоторых вариантах осуществления композиции или составы по данному изобретению содержат полезную нагрузку для лечения МВ, например, полинуклеотиды, описанные в данном документе (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR) в интерполиэлектролитном комплексе. Интерполиэлектролитные комплексы образуются, когда полимеры с динамическим зарядом образуют комплексы с одной или несколькими анионными молекулами. Неограничивающие примеры полимеров

с динамическим зарядом и интерполиэлектролитных комплексов и способы получения интерполиэлектролитных комплексов описаны в патенте США № 8524368, полностью включенном в данный документ посредством ссылки.

i. Кристаллические полимерные системы

[0819] В некоторых вариантах осуществления композиции или составы по данному изобретению содержат полезную нагрузку для лечения МВ, например, полинуклеотиды, описанные в данном документе (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR) в кристаллических полимерных системах. Кристаллические полимерные системы представляют собой полимеры с кристаллическими фрагментами и/или концевыми звеньями, содержащими кристаллические фрагменты. Примеры полимеров описаны в патенте США № 8524259 (полностью включенном в данный документ посредством ссылки).

j. Полимеры, биоразлагаемые наночастицы и наночастицы типа ядро-оболочка

[0820] В некоторых вариантах осуществления композиции или составы по данному изобретению содержат полезную нагрузку для лечения МВ, например, полинуклеотиды, описанные в данном документе (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR), и природный и/или синтетический полимер. Полимеры включают, помимо прочего, полиэтилены, полиэтиленгликоль (ПЭГ), поли(l-лизин)(PLL), ПЭГ, присоединенный к PLL, катионный липополимер, биоразлагаемый катионный липополимер, полиэтиленимин (ПЭИ), сшитые разветвленные поли(алкиленимины), производное полиамина, модифицированный полоксамер, эластичный биоразлагаемый полимер, биоразлагаемый сополимер, биоразлагаемый полиэфирный сополимер, биоразлагаемый полиэфирный сополимер, мультиблок-сополимеры, поли[α-(4-аминобутил)-L-гликолевая кислота) (ПАГК), биоразлагаемые сшитые катионные мультиблок-сополимеры, поликарбонаты, полиангидриды, полигидроксикислоты, полипропилфумераты, поликапролактоны, полиамиды, полиацетали, простые полиэфиры, сложные полиэфиры, поли(ортоэфиры), полицианоакрилаты, поливиниловые спирты, полиуретаны, полифосфазены, полимочевины, полистиролы, полиамины, полилизин, поли(этиленимин), поли(сериновый эфир), поли(L-лактид-со-L-лизин), сложный эфир поли(4-гидрокси-L-пролина), аминосодержащие полимеры, полимеры декстрана, производные полимера декстрана или их комбинации.

[0821] Примеры полимеров включают составы DYNAMIC POLYCONJUGATE® (Arrowhead Research Corp., Pasadena, CA) от MIRUS® Bio (Madison, WI) и Roche Madison (Madison, WI), полимерные составы PHASERXTM, такие как, без ограничения, SMARTT POLYMER TECHNOLOGY™ (PHASERX®, Сиэтл, Вашингтон), DMRI/DOPE, полоксамер, адъювант VAXFECTIN® от Vical (Сан-Диего, Калифорния), хитозан, циклодекстрин от Calando Pharmaceuticals (Пасадена, Калифорния), дендримеры и сополимеры молочной и гликолевой кислот (PLGA). Полимеры RONDELTM (доставка наночастиц РНКи/олигонуклеотидов) (Arrowhead Research Corporation, Pasadena, CA) и блок-сополимеры, чувствительные к pH, такие как PHASERX® (Seattle, WA).

[0822] Полимерные составы обеспечивают пролонгированное или отсроченное высвобождение полинуклеотида (например, после внутримышечной или подкожной инъекции). Измененный профиль высвобождения полинуклеотида может привести, например, к трансляции кодируемого белка в течение продолжительного периода времени. Полимерный состав можно также использовать для повышения стабильности полинуклеотида. Композиции с замедленным высвобождением могут включать, помимо прочего, микросферы PLGA, этиленвинилацетат (EVAc), полоксамер, GELSITE® (Nanotherapys, Inc. Алачуа, Флорида), HYLENEX® (Halozyme Therapeutics, Сан-Диего, Калифорния), хирургические герметики, такие как полимеры фибриногена (Ethicon Inc. Cornelia, GA), TISSELL® (Baxter International, Inc. Deerfield, IL), герметики на основе ПЭГ и COSEAL® (Baxter International, Inc. Deerfield, IL).

[0823] В качестве неограничивающего примера модифицированную мРНК можно приготовить в микросферах PLGA путем приготовления микросфер PLGA с настраиваемой скоростью высвобождения (например, дни и недели) и инкапсулирования модифицированной мРНК в микросферы PLGA при сохранении целостности модифицированной мРНК во время процесса инкапсуляции. EVAc представляют собой не биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, которые широко используются в доклинических применениях имплантатов с замедленным высвобождением (например, продукты с пролонгированным высвобождением Ocusert, пилокарпиновая офтальмологическая вставка для лечения глаукомы или Progestasert, внутриматочная спираль с прогестероном с замедленным высвобождением; трансдермальные системы доставки Testoderm, Duragesic и Selegiline; катетеры). Полоксамер F-407 NF представляет собой гидрофильный, неионный поверхностно-активный триблок-сополимер полиоксиэтилена,

полиоксипропилена и полиоксиэтилена, обладающий низкой вязкостью при температуре менее 5°C и образующий твердый гель при температуре выше 15°C.

[0824] В качестве неограничивающего примера полезная нагрузка для лечения МВ, например, полинуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть составлены с полимерным соединением ПЭГ, присоединенным к PLL, как описано в патенте США № 6177274. В качестве еще одного неограничивающего примера полинуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть составлены с блок-сополимером, таким как блок-сополимер PLGA-ПЭГ (см., например, пат. публикацию США № US 20120004293 и патенты США №№ 8236330 и 8246968), или блок-сополимер PLGA-ПЭГ-PLGA (см., например, патент США № 6004573). Каждая из ссылок в данном документе полностью включена посредством ссылки.

[0825] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка для лечения МВ, например полинуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть составлены по меньшей мере с одним аминосодержащим полимером, таким как, помимо прочего, полилизин, полиэтиленимин, поли(амидоамин) дендримеры, сополимер амина со сложным эфиром или их комбинации. Примеры полиаминовых полимеров и их применение в качестве средств доставки описаны, например, в патентах США № 8 460 696, 8 236 280, каждый из которых полностью включен в данный документе посредством ссылки.

[0826] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка для лечения МВ, например, полинуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть включены в состав биоразлагаемого катионного липополимера, биоразлагаемого полимера или биоразлагаемого сополимера, биоразлагаемого полиэфирного сополимера, биоразлагаемого полиэфирного полимера, линейного биоразлагаемого сополимера, ПАГК, биоразлагаемый перекрестно-сшитый катионный мультиблочный сополимер или их комбинации, как описано, например, в патентах США №№ 6696038, 6517869, 6267987, 6217912, 6652886, 8057821 и 8444992; пат. публикации США №№ US 20030073619, US 20040142474, US 20100004315, US 2012009145 и US 20130195920; и междунар. публикации №№ WO 2006063249 и WO 2013086322, содержание каждого из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[0827] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка для лечения МВ, например полинуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть включены в состав по меньшей мере одного полимера циклодекстрина или с ним, как описано в пат. публикации США № US 20130184453. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть включены в состав по

меньшей мере одного перекрестно-сшитого катион-связывающего полимера или с ним, как описано в междунар. публикациях №№ WO 2013106072, WO 2013106073 и WO 2013106086. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть включены в состав по меньшей мере ПЕГилированного полимера альбумина или с ним, как описано в пат. публикации США № US 20130231287. Каждая из ссылок в данном документе полностью включена посредством ссылки.

[0828] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка для лечения МВ, например полинуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть составлены в виде наночастиц с использованием комбинации полимеров, липидов и/или других биоразлагаемых агентов, таких как, помимо прочего, фосфат кальция. Компоненты могут быть объединены в ядро-оболочку, гибридную и/или послойную архитектуру, чтобы обеспечить точную настройку наночастицы для доставки (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; включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме). В качестве неограничивающего примера наночастица может содержать множество полимеров, таких как, помимо прочего, гидрофильно-гидрофобные полимеры (например, ПЭГ-PLGA), гидрофобные полимеры (например, ПЭГ) и/или гидрофильные полимеры (междунар. публикация № WO 20120225129, полностью включенная в данный документ посредством ссылки).

[0829] Использование наночастиц типа ядро-оболочка дополнительно сфокусировано на высокопроизводительном подходе к синтезу катионных перекрестно-сшитых наногелевых ядер и различных оболочек (Siegwart et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 108:12996-13001; включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Комплексообразование, доставку и интернализацию полимерных наночастиц можно точно контролировать, изменяя химический состав компонентов ядра и оболочки наночастицы. Например, наночастицы ядро-оболочка могут эффективно доставлять миРНК в гепатоциты мыши после того, как они ковалентно присоединяют холестерин к наночастице.

[0830] В некоторых вариантах осуществления полое липидное ядро, содержащее средний слой PLGA и внешний нейтральный липидный слой, содержащий ПЭГ, можно использовать для доставки полинуклеотидов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления липидные наночастицы могут

содержать ядро из полинуклеотидов, описанных в данном документе, и полимерную оболочку, которая используется для защиты полезной нагрузки для лечения МВ, например, полинуклеотидов в ядре. Полимерная оболочка может представлять собой любой из описанных в данном документе полимеров, известных в данной области техники. Полимерную оболочку можно использовать для защиты полинуклеотидов в ядре.

[0831] Наночастицы типа ядро-оболочка для использования с полинуклеотидами, описанными в данном документе, описаны в патенте США № 8313777 или междунар. публикации заявки PCT № WO 2013124867, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки.

k. Пептиды и белки

[0832] В некоторых вариантах осуществления композиции или составы по данному изобретению содержат полезную нагрузку для лечения МВ, например, полинуклеотиды, описанные в данном документе (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR), в состав которой входят пептиды и/или белки для увеличения трансфекции клеток с помощью полинуклеотида, и/или для изменения биораспределения полезной нагрузки для лечения МВ, например, полинуклеотида (например, путем нацеливания на определенные ткани или типы клеток), и/или увеличения трансляции кодируемого белка (например, междунар. публикации №№ WO2012110636 и WO2013123298. В некоторых вариантах осуществления пептиды могут быть пептидами, описанными в пат. Публикациях США №№ US20130129726, US20130137644 и US20130164219. Каждая из ссылок в данном документе полностью включена посредством ссылки.

l. Конъюгаты

[0833] В некоторых вариантах осуществления композиции или составы по данному изобретению содержат полезную нагрузку для лечения МВ, например, полинуклеотиды, описанные в данном документе (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR), ковалентно связанную с носителем или нацеливающей группой, или включающую две кодирующие области, которые вместе продуцируют слитый белок (например, несущую нацеливающую группу и терапевтический белок или пептид) в виде конъюгата. Конъюгат может представлять собой пептид, который избирательно направляет наночастицу к нейронам в ткани или организме или способствует преодолению гематоэнцефалического барьера.

[0834] Конъюгаты включают природное вещество, такое как белок (например, человеческий сывороточный альбумин (HSA), липопротеин низкой плотности (ЛПНП), липопротеин высокой плотности (ЛПВП) или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновая кислота); или липид. Лиганд также может быть рекомбинантной или синтетической молекулой, такой как синтетический полимер, например, синтетическая полиаминокислота, олигонуклеотид (например, аптамер). Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту, представляющую собой полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновую кислоту, поли-L-глутаминовую кислоту, сополимер стирол-малеинового ангидрида, сополимер L-лактида и гликоля, сополимер дивинилового эфира и малеинового ангидрида, сополимер N-(2-гидроксипропил)метакриламида (HMPA), полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли(2-этилакриловая кислота), полимеры N-изопропилакриламида или полифосфазин. Примеры полиаминов включают: полиэтиленимин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, пептидомиметический полиамин, дендримерный полиамин, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичную соль полиамина или альфа-спиральную пептид.

[0835] В некоторых вариантах осуществления конъюгат может функционировать как носитель полинуклеотида, описанного в данном документе. Конъюгат может содержать катионный полимер, такой как, помимо прочего, полиамин, полилизин, полиалкиленимин и полиэтиленимин, к которым можно прививать полиэтиленгликоль. Типичные конъюгаты и их препараты описаны в патенте США № 6586524 и пат. публикации США № US 20130211249, содержание каждого из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[0836] Конъюгаты также могут включать нацеливающие группы, например агент, нацеливающий на клетку или ткань, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, таким как клетка почки. Нацеливающая группа может представлять собой тиротропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностно-активный белок A, углевод муцин, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентную галактозу, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчная кислота, фолат, витамин B12, биотин, пептид RGD,

миметик пептида RGD или аптамер.

[0837] Нацеливающие группы могут представлять собой белки, например, гликопротеины, или пептиды, например, молекулы, обладающие специфическим сродством к ко-лиганду, или антитела, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, таким как эндотелиальная клетка или клетка кости. Нацеливающие группы также могут включать гормоны и гормональные рецепторы. Они также могут включать непептидные соединения, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фруктозу или аптамеры. Лиганд может представлять собой, например, липополисахарид или активатор киназы p38 MAP.

[0838] Нацеливающая группа может представлять собой любой лиганд, способный нацеливаться на конкретный рецептор. Примеры включают, без ограничения, фолиевую кислоту, GalNAc, галактозу, маннозу, маннозу-6P, апатамеры, лиганды интегриновых рецепторов, лиганды хемокиновых рецепторов, трансферрин, биотин, лиганды серотониновых рецепторов, PSMA, эндотелин, GCPII, соматостатин, лиганды ЛПНП и ЛПВП. В конкретных вариантах осуществления нацеливающей группой является аптамер. Аптамер может быть немодифицированным или иметь любую комбинацию модификаций, описанных в данном документе. В качестве неограничивающего примера, нацеливающей группой может быть конъюгат, связывающий глутатионовый рецептор (GR), для адресной доставки через гемато-центральный барьер нервной системы, как описано, например, в пат. публикации США № US 2013021661012 (полностью включенной в данный документ посредством ссылки).

[0839] В некоторых вариантах осуществления конъюгат может представлять собой синергетический конъюгат биомолекула-полимер, который содержит систему длительного действия с непрерывным высвобождением для обеспечения большей терапевтической эффективности. Синергетический конъюгат биомолекула-полимер может представлять собой конъюгат, описанный в пат. публикации США № US 20130195799. В некоторых вариантах осуществления конъюгат может представлять собой конъюгат аптамера, как описано в междунар. пат. публикации № WO 2012040524. В некоторых вариантах осуществления конъюгат может представлять собой полимерный конъюгат, содержащий амин, как описано в патенте США № 8507653. Каждая из ссылок в данном документе полностью включена посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды могут быть

конъюгированы с SMARTT POLYMER TECHNOLOGY® (PHASERX®, Inc. Seattle, WA).

[0840] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка для лечения МВ, например, полинуклеотиды, описанные в данном документе, ковалентно конъюгированы с проникающим в клетку полипептидом, который также может включать сигнальную последовательность или нацеливающую последовательность. Конъюгаты могут быть сконструированы таким образом, чтобы они обладали повышенной стабильностью и/или повышенной клеточной трансфекцией; и/или изменяли биораспределение (например, нацеливались на определенные ткани или типы клеток).

[0841] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка для лечения МВ, например полинуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть конъюгированы с агентом для улучшения доставки. В некоторых вариантах осуществления агент может быть мономером или полимером, таким как нацеливающий мономер или полимер, имеющий нацеливающие блоки, как описано в междунар. публикации № WO 2011062965. В некоторых вариантах осуществления агент может представлять собой транспортный агент, ковалентно связанный с полинуклеотидом, как описано, например, в патентах США №№ 6835393 и 7374778. В некоторых вариантах осуществления агент может представлять собой агент, усиливающий транспорт через мембранный барьер, такой как агент, описанный в патентах США №№ 7737108 и 8003129. Каждая из ссылок в данном документе полностью включена посредством ссылки.

23. Ускоренный клиренс из крови

[0842] В описании предложены соединения, композиции и способы их применения для уменьшения эффекта ABC (англ.: Accelerated Blood Clearance; ускоренный клиренс из крови) на повторно вводимое активное вещество, такое как биологически активное вещество. Как легко понять, уменьшение или полное устранение эффекта ABC на вводимое активное вещество эффективно увеличивает период его полужизни и, следовательно, его эффективность.

[0843] В некоторых вариантах осуществления термин «снижение ABC» относится к любому снижению ABC по сравнению с ABC-индуцирующими ЛНЧ положительного эталонного контроля, например, ЛНЧ MC3. ABC-индуцирующие ЛНЧ вызывают снижение уровней активного вещества в кровотоке при втором или

последующем введении в течение заданного периода времени. Таким образом, снижение ABC относится к меньшему клиренсу вещества в кровотоке при второй или последующей дозе вещества по сравнению со стандартной ЛНЧ. Снижение может составлять, например, по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % или 100 %. В некоторых вариантах осуществления снижение составляет 10-100%, 10-50%, 20-100%, 20-50%, 30-100%, 30-50%, 40%-100%, 40-80%, 50-90% или 50-100%. В качестве альтернативы снижение ABC может быть охарактеризовано как по меньшей мере определяемый уровень вещества в кровотоке после второго или последующего введения или как минимум 2-кратное, 3-кратное, 4-кратное, 5-кратное увеличение вещества в кровотоке по сравнению с веществом в кровотоке после введения стандартной ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления снижение составляет в 2-100 раз, 2-50 раз, 3-100 раз, 3-50 раз, 3-20 раз, 4-100 раз, 4-50 раз, 4-40 раз, 4-30 раз, 4-25 раз, 4-20 раз, 4-15 раз, 4-10 раз, 4-5 раз, 5-100 раз, 5-50 раз, 5-40 раз, 5-30 раз, 5-25 раз 5-20 раз, 5-15 раз, 5-10 раз, 6-100 раз, 6-50 раз, 6-40 раз, 6-30 раз, 6-25 раз, 6-20 раз, 6-15 раз, 6-10 раз, 8-100 раз, 8-50 раз, 8-40 раз, 8-30 раз, 8-25 раз, 8-20 раз, 8-15 раз, 8-10 раз, 10-100 раз 10-50 раз, 10-40 раз, 10-30 раз, 10-25 раз, 10-20 раз, 10-15 раз, 20-100 раз, 20-50 раз, 20-40 раз, 20-30 раз или 20-25 раз.

[0844] В описании предложены липидсодержащие соединения и композиции, которые менее подвержены клиренсу и, таким образом, имеют более длительным периодом полужизни in vivo. Это в особенности относится к случаям, когда композиции предназначены для многократного, в том числе хронического введения, и еще более конкретно, когда такое повторное введение происходит в течение нескольких дней или недель.

[0845] Примечательно, что эти композиции менее восприимчивы или вообще обходят наблюдаемое явление ускоренного клиренса из крови (ABC). ABC представляет собой явление, при котором определенные экзогенно введенные вещества быстро выводятся из крови при втором и последующих введениях. Это явление частично наблюдалось для различных липидсодержащих композиций, включая, помимо прочего, липидизированные вещества, липосомы или другие средства доставки на основе липидов, а также инкапсулированные в липиды вещества. До сих пор основа ABC была плохо изучена и в некоторых случаях приписывалась гуморальному иммунному ответу, и, соответственно, стратегии ограничения его воздействия in vivo, особенно в клинических условиях, оставались неуловимыми.

[0846] В данном изобретении предложены соединения и композиции, которые менее восприимчивы, если вообще восприимчивы, к ABC. В некоторых важных аспектах такие соединения и композиции представляют собой липидсодержащие соединения или композиции. Удивительно, но липидсодержащие соединения или композиции по данному изобретению не испытывают ABC при втором и последующем введении in vivo. Эта устойчивость к ABC делает эти соединения и композиции особенно подходящими для многократного применения in vivo, в том числе для повторного применения в течение коротких периодов времени, включая дни или 1-2 недели. Эта повышенная стабильность и/или время полужизни частично обусловлены неспособностью этих композиций активировать клетки B1a и/или B1b и/или обычные B-клетки, pDC и/или тромбоциты.

[0847] Таким образом, в данном изобретении предложено разъяснение механизма, лежащего в основе ускоренного клиренса из крови (ABC). В соответствии с данным описанием и изобретениями, представленными в данном документе, было обнаружено, что феномен ABC, по крайней мере, в том, что касается липидов и липидных наночастиц, опосредован, по крайней мере частично, врожденным иммунным ответом с участием клеток B1a и/или B1b, pDC и/или тромбоцитов. Клетки B1a обычно ответственны за секрецию естественных антител в форме циркулирующих IgM. Этот IgM является полиреактивным, что означает, что он способен связываться с различными антигенами, хотя и с относительно низкой аффинностью к каждому из них.

[0848] В соответствии с изобретением было обнаружено, что некоторые липидсодержащие агенты или липидсодержащие составы, такие как липидные наночастицы, вводимые in vivo, вызывают ABC и подвержены ему. Теперь в соответствии с изобретением было обнаружено, что при введении первой дозы ЛНЧ одна или несколько клеток, участвующих в формировании врожденного иммунного ответа (называемых в данном документе сенсорами), связывают такой агент, активируются и затем инициируют каскад иммунных факторов (называемых в данном документе эффекторами), которые стимулируют ABC и токсичность. Например, клетки B1a и B1b могут связываться с ЛНЧ, активироваться (отдельно или в присутствии других сенсоров, таких как pDC, и/или эффекторов, таких как IL6) и секретировать природный IgM, который связывается с ЛНЧ. Ранее существовавшие у субъекта природные IgM также могут распознавать и связываться с ЛНЧ, тем самым запуская фиксацию комплемента. После введения первой дозы продукция естественных IgM начинается в течение 1-2 часов после введения ЛНЧ.

Как правило, примерно через 2-3 недели естественный IgM выводится из организма благодаря естественному периоду полужизни IgM. Естественный IgG вырабатывается примерно через 96 часов после введения ЛНЧ. Вещество при введении в наивных условиях может проявлять свои биологические эффекты относительно свободно от природного IgM, продуцируемого после активации клеток B1a или B1b, или естественного IgG. Естественный IgM и естественный IgG неспецифичны и, таким образом, отличаются от анти-ПЭГ IgM и анти-ПЭГ IgG.

[0849] Хотя заявитель не связан каким-либо механизмом, предполагается, что ЛНЧ вызывают ABC и/или токсичность посредством следующих механизмов. Считается, что при введении субъекту ЛНЧ быстро транспортируется через кровь в селезенку. ЛНЧ могут встречаться с иммунными клетками в крови и/или селезенке. Быстрый врожденный иммунный ответ запускается в ответ на присутствие ЛНЧ в крови и/или селезенке. Заявитель показал в данном документе, что в течение нескольких часов после введения ЛНЧ несколько иммунных сенсоров реагировали на присутствие ЛНЧ. Эти сенсоры включают, помимо прочего, иммунные клетки, участвующие в формировании иммунного ответа, такие как B-клетки, pDC и тромбоциты. Сенсоры могут находиться в селезенке, например, в краевой зоне селезенки, и/или в крови. ЛНЧ может физически взаимодействовать с одним или несколькими сенсорами, которые могут взаимодействовать с другими сенсорами. В таком случае ЛНЧ прямо или косвенно взаимодействует с сенсорами. Сенсоры могут напрямую взаимодействовать друг с другом в ответ на распознавание ЛНЧ. Например, многие сенсоры расположены в селезенке и могут легко взаимодействовать друг с другом. В качестве альтернативы один или несколько сенсоров могут взаимодействовать с ЛНЧ в крови и активироваться. Затем активированный сенсор может взаимодействовать непосредственно с другими сенсорами или косвенно (например, посредством стимуляции или выработки мессенджера, такого как цитокин, например, IL6).

[0850] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ может напрямую взаимодействовать и активировать каждый из следующих сенсоров: pDC, клетки B1a, клетки B1b и тромбоциты. Затем эти клетки могут прямо или косвенно взаимодействовать друг с другом, инициируя выработку эффекторов, что в конечном итоге приводит к ABC и/или токсичности, связанной с повторными дозами ЛНЧ. Например, заявитель показал, что введение ЛНЧ приводит к активации pDC, агрегации и активации тромбоцитов и активации B-клеток. В ответ на ЛНЧ тромбоциты также агрегируют, активируются и агрегируют с B-клетками. Клетки

pDC активируются. Было обнаружено, что ЛНЧ относительно быстро взаимодействует с поверхностью тромбоцитов и В-клеток. Блокирование активации любого одного или комбинации этих сенсоров в ответ на ЛНЧ полезно для подавления иммунного ответа, который обычно возникает. Это подавление иммунного ответа приводит к предотвращению АВС и/или токсичности.

[0851] Сенсоры после активации производят эффекторы. Эффектор, используемый в данном документе, представляет собой иммунную молекулу, продуцируемую иммунной клеткой, такой как В-клетка. Эффекторы включают, помимо прочего, иммуноглобулин, такой как естественный IgM и естественный IgG, и цитокины, такие как IL6. Клетки B1a и B1b стимулируют выработку естественных IgM в течение 2-6 часов после введения ЛНЧ. Естественный IgG можно обнаружить в течение 96 часов. Уровни IL6 повышаются в течение нескольких часов. Естественные IgM и IgG циркулируют в организме от нескольких дней до нескольких недель. В течение этого времени циркулирующие эффекторы могут взаимодействовать с вновь введенными ЛНЧ, вызывая выведение этих ЛНЧ из организма. Например, эффектор может распознавать и связываться с ЛНЧ. Fc-область эффектора может распознаваться и запускать поглощение декорированных ЛНЧ макрофагами. Затем макрофаги транспортируются в селезенку. Продуцирование эффекторов иммунными сенсорами представляет собой временный ответ, который коррелирует со временем, наблюдаемым для АВС.

[0852] Если вводимая доза представляет собой вторую или последующую вводимую дозу, и если такая вторая или последующая доза вводится до того, как ранее индуцированный естественный IgM и/или IgG выводится из системы (например, до периода времени 2-3 недели), то такая вторая или последующая доза нацелена на циркулирующие естественные IgM и/или естественные IgG или Fc, которые запускают активацию альтернативного пути комплемента и сами быстро выводятся. При введении ЛНЧ после того, как эффекторы вывелись из организма или уменьшились их количество, АВС не наблюдается.

[0853] Таким образом, в соответствии с аспектами изобретения полезно ингибировать взаимодействие между ЛНЧ и одним или несколькими сенсорами, ингибировать активацию одного или нескольких сенсоров с помощью ЛНЧ (прямую или косвенную), ингибировать выработку одного или нескольких эффекторов, и/или ингибировать активность одного или нескольких эффекторов. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ предназначен для ограничения или блокировки взаимодействия ЛНЧ с сенсором. Например, ЛНЧ может иметь измененный РС

и/или ПЭГ для предотвращения взаимодействия с сенсорами. Альтернативно или дополнительно для достижения любого одного или нескольких из этих эффектов можно использовать вещество, которое ингибирует иммунные ответы, индуцированные ЛНЧ.

[0854] Также было установлено, что обычные В-клетки также вовлечены в ABC. В частности, при первом введении вещества обычные В-клетки, обозначаемые в данном документе как CD19(+), связываются с веществом и реагируют с ним. Однако, в отличие от клеток B1a и B1b, обычные В-клетки способны сначала вызывать ответ IgM (начинающийся примерно через 96 часов после введения ЛНЧ), за которым следует ответ IgG (начинающийся примерно через 14 дней после введения ЛНЧ) одновременно с ответом памяти. Таким образом, обычные В-клетки реагируют на введенное вещество и вносят свой вклад в IgM (и, в конечном счете, в IgG), который опосредует ABC. IgM и IgG обычно представляют собой анти-ПЭГ IgM и анти-ПЭГ IgG.

[0855] Предполагается, что в некоторых случаях большая часть ABC-ответа опосредована клетками B1a и B1a-опосредованными иммунными ответами. Кроме того, предполагается, что в некоторых случаях ABC-ответ опосредуется как IgM, так и IgG, при этом такие эффекты опосредуются как обычными В-клетками, так и B1a-клетками. В еще других случаях ABC-ответ опосредован природными молекулами IgM, некоторые из которых способны связываться с природными IgM, которые могут продуцироваться активированными клетками B1a. Естественные IgM могут связываться с одним или несколькими компонентами ЛНЧ, например, связываться с фосфолипидным компонентом ЛНЧ (например, связываться с PC-фрагментом фосфолипида) и/или связываться с ПЭГ-липидным компонентом ЛНЧ (такое как связывание с ПЭГ-DMG, в частности, связывание с ПЭГ-фрагментом ПЭГ-DMG). Поскольку B1a экспрессирует CD36, лигандом для которого является фосфатидилхолин, предполагается, что рецептор CD36 может опосредовать активацию клеток B1a и, таким образом, продукцию естественного IgM. В еще других случаях ABC-ответ опосредуется, главным образом, обычными В-клетками.

[0856] В соответствии с изобретением было обнаружено, что явление ABC может быть уменьшено или отменено, по меньшей мере частично, за счет использования соединений и композиций (таких как вещества, средства доставки и составы), которые не активируют клетки B1a. Соединения и композиции, которые не активируют клетки B1a, могут называться в данном документе B1a-инертными соединениями и композициями. В соответствии с изобретением было также

обнаружено, что явление ABC может быть уменьшено или отменено, по меньшей мере частично, за счет использования соединений и композиций которые не активируют обычные B-клетки. Соединения и композиции, которые не активируют обычные B-клетки, в некоторых вариантах осуществления могут упоминаться в данном документе как CD19-инертные соединения и композиции. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, предложенных в данном документе, соединения и композиции не активируют клетки B1a и не активируют обычные B-клетки. Соединения и композиции, которые не активируют клетки B1a и обычные B-клетки, могут в некоторых вариантах осуществления упоминаться в данном документе как B1a/CD19-инертные соединения и композиции.

[0857] Эти лежащие в основе механизмы до сих пор не были поняты, и роль клеток B1a и B1b и их взаимодействие с обычными B-клетками в этом явлении также не оценивалась.

[0858] Соответственно, в данном изобретении предложены соединения и композиции, которые не стимулируют ABC. Они могут быть дополнительно охарактеризованы как неспособные активировать клетки B1a и/или B1b, тромбоциты и/или pDC, а также необязательно обычные B-клетки. Эти соединения (например, вещества, включая биологически активные вещества, такие как профилактические агенты, терапевтические агенты и диагностические агенты, носители доставки, включая липосомы, липидные наночастицы и другие инкапсулирующие структуры на основе липидов и т. д.) и композиции (например, составы и т. д.) особенно желательны для применений, требующих повторного введения и, в частности, повторных введений, которые происходят в течение коротких периодов времени (например, в течение 1-2 недель). Так обстоит дело, например, если вещество представляет собой терапевтическое средство на основе нуклеиновой кислоты, которое предоставляется субъекту через регулярные, близко расположенные промежутки времени. Выводы, представленные в данном документе, могут быть применены к этим и другим веществам, которые вводят аналогичным образом и/или которые подвержены ABC.

[0859] Особый интерес представляют липидсодержащие соединения, липидсодержащие частицы и липидсодержащие композиции, поскольку известно, что они чувствительны к ABC. Такие частицы и композиции липидсодержащие соединений, широко используются в качестве биологически активных веществ или средств доставки таких веществ. Таким образом, способность улучшать эффективность таких веществ, будь то за счет снижения действия ABC на само

вещество или на средство его доставки, выгодна для широкого круга активных веществ.

[0860] Также в данном документе предложены композиции, которые не стимулируют или не усиливают ответ острой фазы (ARP), связанный с введением повторной дозы одного или нескольких биологически активных веществ.

[0861] В некоторых случаях композиция может не связываться с IgM, включая естественный IgM, но не ограничиваясь этим.

[0862] В некоторых случаях композиция может не связываться с белком острой фазы, таким как, помимо прочего, С-реактивный белок.

[0863] Композиция в некоторых случаях может не вызывать CD5(+)-опосредованный иммунный ответ. Используемый в данном документе термин CD5(+)-опосредованный иммунный ответ представляет собой иммунный ответ, который опосредуется клетками B1a и/или B1b. Такой ответ может включать ABC-ответ, ответ острой фазы, индукцию естественных IgM и/или IgG и т.п.

[0864] Композиция в некоторых случаях может не вызывать CD19(+)-опосредованный иммунный ответ. Используемый в данном документе термин CD19(+)-опосредованный иммунный ответ представляет собой иммунный ответ, который опосредуется обычными CD19(+), CD5(-) B-клетками. Такой ответ может включать индукцию IgM, индукцию IgG, индукцию B-клеток памяти, ABC-ответ, ответ антител против лекарственного средства (ADA), включая ответ против белка, когда белок может быть инкапсулирован в ЛНЧ, и тому подобное.

[0865] Клетки B1a представляют собой подмножество B-клеток, участвующих во врожденном иммунитете. Эти клетки являются источником циркулирующих IgM, называемых естественными антителами или естественными сывороточными антителами. Естественные IgM-антитела характеризуются слабой аффинностью к ряду антигенов, в связи с чем их называют «полиспецифическими» или «полиреактивными», что указывает на их способность связываться более чем с одним антигеном. Клетки B1a не способны продуцировать IgG. Кроме того, они не превращаются в клетки памяти и, таким образом, не способствуют адаптивному иммунному ответу. Однако они способны секретировать IgM при активации. Секретируемый IgM обычно выводится примерно через 2-3 недели, после чего иммунная система становится относительно наивной по отношению к ранее введенному антигену. Если тот же антиген представлен после этого периода времени (например, примерно через 3 недели после первоначального воздействия), антиген быстро не выводится. Однако важно отметить, что если антиген

представлен в течение этого периода времени (например, в течение 2 недель, в том числе в течение 1 недели или в течение дней), то антиген быстро выводится. Эта задержка между последовательными дозами делает некоторые липидсодержащие терапевтические или диагностические средства непригодными для использования.

[0866] У человека клетки B1a представляют собой CD19(+), CD20(+), CD27(+), CD43(+), CD70(-) и CD5(+). У мышей клетки B1a представляют собой CD19(+), CD5(+) и B-клеточную изоформу CD45 B220(+). Именно экспрессия CD5 обычно отличает клетки B1a от других обычных B-клеток. Клетки B1a могут экспрессировать высокие уровни CD5, и на этом основании их можно отличить от других клеток B-1, таких как клетки B-1b, которые экспрессируют низкие или неопределяемые уровни CD5. CD5 представляет собой поверхностный гликопротеин пан-T-клеток. Клетки B1a также экспрессируют CD36, также известную как транслоказа жирных кислот. CD36 является членом семейства рецепторов-мусорщиков класса B. CD36 может связывать многие лиганды, включая окисленные липопротеины низкой плотности, нативные липопротеины, окисленные фосфолипиды и жирные кислоты с длинной цепью.

[0867] Клетки B1b представляют собой еще одну подгруппу B-клеток, участвующих во врожденном иммунитете. Эти клетки являются еще одним источником циркулирующего естественного IgM. Некоторые антигены, включая PS, способны индуцировать независимый от T-клеток иммунитет посредством активации B1b. CD27 обычно активируется на клетках B1b в ответ на активацию антигена. Подобно клеткам B1a, клетки B1b обычно расположены в определенных местах тела, таких как селезенка и брюшная полость, и их очень мало в крови. Естественный IgM, секретируемый B1b, обычно выводится в течение примерно 2-3 недель, после чего иммунная система становится относительно наивной по отношению к ранее введенному антигену. Если тот же антиген представлен после этого периода времени (например, примерно через 3 недели после первоначального воздействия), антиген быстро не выводится. Однако важно отметить, что если антиген представлен в течение этого периода времени (например, в течение 2 недель, в том числе в течение 1 недели или в течение дней), то антиген быстро выводится. Эта задержка между последовательными дозами делает некоторые липидсодержащие терапевтические или диагностические средства непригодными для использования.

[0868] В некоторых вариантах осуществления желательно блокировать активацию клеток B1a и/или B1b. Одна из стратегий блокирования активации клеток B1a и/или B1b включает определение того, какие компоненты липидной наночастицы

способствуют активации В-клеток, и нейтрализацию этих компонентов. В данном документе было обнаружено, что по крайней мере ПЭГ и фосфатидилхолин (PC) способствуют взаимодействию клеток B1a и B1b с другими клетками и/или их активации. ПЭГ может играть роль в стимулировании агрегации между клетками B1 и тромбоцитами, что может привести к активации. PC (липид-помощник в ЛНЧ) также участвует в активации клеток B1, вероятно, посредством взаимодействия с рецептором CD36 на поверхности В-клеток. Были разработаны и испытаны многочисленные частицы, имеющие альтернативы ПЭГ-липидам, липиды без ПЭГ и/или с PC-заменителями (например, олеиновая кислота или ее аналоги). Заявитель установил, что замена одного или более из этих компонентов в ЛНЧ, которая в противном случае будет стимулировать АВС при повторном введении, полезна для предотвращения АВС за счет снижения продукции естественного IgM и/или активации В-клеток. Таким образом, изобретение охватывает ЛНЧ, которые имеют уменьшенный АВС в результате конструкции, исключающей включение триггеров В-клеток.

[0869] Другая стратегия блокирования активации клеток B1a и/или B1b включает использование вещества, которое ингибирует иммунные ответы, индуцированные ЛНЧ. Эти типы веществ более подробно обсуждаются ниже. В некоторых вариантах осуществления эти вещества блокируют взаимодействие между клетками B1a/B1b и ЛНЧ или тромбоцитами или pDC. Например, вещество может представлять собой антитело или другой связывающий агент, который физически блокирует взаимодействие. Примером этого является антитело, которое связывается с CD36 или CD6. Вещество также может представлять собой соединение, которое предотвращает или блокирует передачу сигналов клеткой B1a/B1b после активации или до активации. Например, можно заблокировать один или несколько компонентов сигнального каскада B1a/B1b в результате взаимодействия В-клеток с ЛНЧ или другими иммунными клетками. В других вариантах осуществления агент может воздействовать на один или несколько эффекторов, продуцируемых клетками B1a/B1b после активации. Эти эффекторы включают, например, естественный IgM и цитокины.

[0870] Согласно аспектам изобретения было продемонстрировано, что когда активация клеток pDC блокируется, активация В-клеток в ответ на ЛНЧ снижается. Таким образом, чтобы избежать АВС и/или токсичности, может быть желательным предотвратить активацию pDC. Подобно стратегиям, обсужденным выше, активация клеток pDC может быть заблокирована веществами, которые

препятствуют взаимодействию между pDC и ЛНЧ и/или B-клетками/тромбоцитами. В качестве альтернативы вещества, которые действуют на pDC, чтобы блокировать его способность активироваться, или на его эффекторы, могут использоваться вместе с ЛНЧ, чтобы избежать ABC.

[0871] Тромбоциты также могут играть важную роль в ABC и токсичности. Очень быстро после введения субъекту первой дозы ЛНЧ тромбоциты связываются с ЛНЧ, агрегируют и активируются. В некоторых вариантах осуществления желательно блокировать агрегацию и/или активацию тромбоцитов. Одна из стратегий блокирования агрегации и/или активации тромбоцитов включает определение того, какие компоненты липидной наночастицы способствуют агрегации и/или активации тромбоцитов, и нейтрализацию этих компонентов. В данном документе было обнаружено, что по меньшей мере ПЭГ способствует агрегации, активации и/или взаимодействию тромбоцитов с другими клетками. Были разработаны и протестированы многочисленные частицы с альтернативами ПЭГ-липиду, а также без ПЭГ. Заявитель установил, что замена одного или более из этих компонентов в ЛНЧ, которая в противном случае будет стимулировать ABC при повторном введении, полезна для предотвращения ABC за счет снижения продукции естественного IgM и/или агрегации тромбоцитов. Таким образом, изобретение охватывает ЛНЧ, которые имеют уменьшенный ABC в результате конструкции, исключающей включение триггеров тромбоцитов. В качестве альтернативы вещества, которые действуют на тромбоциты, чтобы блокировать их активность после их активации, или на их эффекторы, могут использоваться вместе с ЛНЧ, чтобы избежать ABC.

(i) Измерение активности ABC и связанных с ней действий

[0872] Различные соединения и композиции, предлагаемые в данном документе, включая ЛНЧ, не стимулируют активность ABC при введении in vivo. Эти ЛНЧ могут быть охарактеризованы и/или идентифицированы с помощью любого из ряда анализов, таких как, помимо прочего, анализы, описанные ниже, а также любые анализы, описанные в разделе «Примеры», включая подраздел «Способы» в примерах.

[0873] В некоторых вариантах осуществления способы включают введение ЛНЧ без образования иммунного ответа, который стимулирует ABC. Иммунный ответ, стимулирующий ABC, включает активацию одного или нескольких сенсоров, таких как клетки B1, pDC или тромбоциты, и одного или нескольких эффекторов, таких

как естественный IgM, естественный IgG или цитокины, такие как IL6. Таким образом, введение ЛНЧ без образования иммунного ответа, стимулирующего ABC, как минимум включает введение ЛНЧ без значительной активации одного или нескольких сенсоров и значительной продукции одного или нескольких эффекторов. Термин «значительный» в данном контексте относится к количеству, которое может привести к физиологическим последствиям ускоренного клиренса из крови всей или части второй дозы по сравнению с уровнем клиренса из крови, ожидаемым для второй дозы ЛНЧ, вызывающей ABC. Например, иммунный ответ должен быть подавлен таким образом, чтобы ABC, наблюдаемый после второй дозы, был ниже, чем можно было бы ожидать для ЛНЧ, вызывающей ABC.

(ii) Анализ активации B1a или B1b

[0874] Некоторые композиции, представленные в данном изобретении, не активируют В-клетки, такие как клетки B1a или B1b (CD19+, CD5+) и/или обычные В-клетки (CD19+, CD5-). Активацию клеток B1a, клеток B1b или обычных В-клеток можно определить несколькими способами, некоторые из которых представлены ниже. Популяция В-клеток может быть представлена в виде фракционированных популяций В-клеток или нефракционированных популяций спленоцитов или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). В последнем случае клеточную популяцию можно инкубировать с выбранным ЛНЧ в течение определенного периода времени, а затем собирать для дальнейшего анализа. В качестве альтернативы может быть собран и проанализирован супернатант.

(iii) Активация экспрессии маркера активации на клеточной поверхности

[0875] Активация клеток B1a, клеток B1b или обычных В-клеток может быть продемонстрирована как повышенная экспрессия маркеров активации В-клеток, включая маркеры поздней активации, такие как CD86. В иллюстративном неограничивающем анализе нефракционированные В-клетки, представленные в виде популяции спленоцитов или популяцию PBMC, инкубируют с выбранным ЛНЧ в течение определенного периода времени, а затем окрашивают на стандартный маркер В-клеток, такой как CD19, и на маркер активации, такой как CD86, и анализируют с использованием, например, проточной цитометрии. Подходящий отрицательный контроль включает инкубацию той же популяции со средой, а затем

выполнение тех же этапов окрашивания и визуализации. Увеличение экспрессии CD86 в исследуемой популяции по сравнению с отрицательным контролем указывает на активацию В-клеток.

(iv) Высвобождение провоспалительных цитокинов

[0876] Активацию В-клеток можно также оценить с помощью анализа высвобождения цитокинов. Например, активацию можно оценить по продукции и/или секреции цитокинов, таких как IL-6 и/или TNF-альфа, при воздействии представляющих интерес ЛНЧ.

[0877] Такие анализы можно проводить с использованием рутинных анализов секреции цитокинов, хорошо известных в данной области техники. Увеличение секреции цитокинов свидетельствует об активации В-клеток.

(v) Связывание/ассоциация ЛНЧ с В-клетками и/или поглощение В-клетками

[0878] Ассоциация или связывание ЛНЧ с В-клетками также может быть использована для оценки представляющего интерес ЛНЧ и для дальнейшей характеристики такого ЛНЧ. Ассоциация/связывание и/или поглощение/интернализация могут быть оценены с использованием поддающейся обнаружению меченой, такой как флуоресцентно меченой, ЛНЧ и отслеживания местоположения такой ЛНЧ в или на В-клетках после различных периодов инкубации.

[0879] Изобретение также предполагает, что композиции, предложенные в данном документе, могут быть способны уклоняться от распознавания или обнаружения и, необязательно, связываться с нижестоящими медиаторами АВС, такими как циркулирующие IgM, и/или медиаторы ответа острой фазы, такие как белки острой фазы (например, С-реактивный белок (СРБ).

(vi) Способы использования для снижения АВС

[0880] В данном документе также предложены способы доставки ЛНЧ, которые могут инкапсулировать вещество, такое как терапевтический агент, субъекту без активации АВС.

[0881] В некоторых вариантах осуществления способ включает введение любых ЛНЧ, описанных в данном документе, которые не стимулируют АВС, например, не

индуцируют выработку естественного IgM, связывающегося с ЛНЧ, не активируют клетки B1a и/или B1b. Как используется в данном документе, ЛНЧ, которая «не стимулирует ABC», относится к ЛНЧ, которая не индуцирует иммунные ответы, которые могли бы привести к существенному ABC, или к существенно низкому уровню иммунных ответов, недостаточному для того, чтобы привести к существенному ABC. ЛНЧ, которая не индуцирует выработку естественных IgM, связывающихся с ЛНЧ, относится к ЛНЧ, которые либо не индуцируют естественного связывания IgM с ЛНЧ, либо индуцируют существенно низкий уровень молекул естественного IgM, чего недостаточно, чтобы привести к существенному ABC. ЛНЧ, которая не активирует клетки B1a и/или B1b, относится к ЛНЧ, которые не индуцируют ответ клеток B1a и/или B1b, чтобы произвести естественное связывание IgM с ЛНЧ, или индуцируют существенно низкий уровень ответов B1a и/или B1b, что является недостаточным, чтобы привести к существенному ABC.

[0882] В некоторых вариантах осуществления термины «не активируют» и «не индуцируют» продукцию, представляют собой относительное снижение до эталонного значения или состояния. В некоторых вариантах осуществления эталонное значение или состояние представляет собой степень активации или индукции продукции молекулы, такой как IgM, стандартным ЛНЧ, таким как ЛНЧ MC3. В некоторых вариантах осуществления относительное снижение представляет собой снижение по меньшей мере на 30%, например, по меньшей мере на 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. В других вариантах осуществления термины не активируют клетки, такие как B-клетки, и не индуцируют продукцию белка, такого как IgM, могут относиться к неопределяемому количеству активных клеток или специфического белка.

(vii) Влияние тромбоцитов и токсичность

[0883] Кроме того, изобретение частично основано на выяснении механизма, лежащего в основе ограничивающей дозу токсичности, связанной с введением ЛНЧ. Такая токсичность может включать коагулопатию, диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови (ДВС-синдром, также называемое чахоточной коагулопатией), острую или хроническую, и/или сосудистый тромбоз. В некоторых случаях ограничивающая дозу токсичность, связанная с ЛНЧ, представляет собой ответ острой фазы (APR) или псевдоаллергию, связанную с активацией комплемента

(CARPA).

[0884] Используемый в данном документе термин «коагулопатия» относится к повышенной коагуляции (свертываемости крови) in vivo. Выводы, о которых сообщается в данном изобретении, согласуются с такой повышенной коагуляцией и в значительной степени дают представление о лежащий в основе механизме. Коагуляция представляет собой процесс, в котором участвует ряд различных факторов и типов клеток, и до сих пор взаимосвязь и взаимодействие между ЛНЧ и тромбоцитами не были поняты в этом отношении. В данном изобретении представлены доказательства такого взаимодействия, а также предложены соединения и композиции, которые модифицированы для снижения влияния тромбоцитов, включая снижение ассоциации тромбоцитов, снижение агрегации тромбоцитов и/или снижение агрегации тромбоцитов. Способность модулировать, в том числе предпочтительно подавлять, такое влияние тромбоцитов может снижать частоту и/или тяжесть коагулопатии после введения ЛНЧ. Это, в свою очередь, снизит токсичность, связанную с такими ЛНЧ, что позволит вводить более высокие дозы ЛНЧ и, что важно, их переносимый материал пациентам, нуждающимся в этом.

[0885] CARPA представляет собой класс острой иммунотоксичности, проявляющийся в реакциях гиперчувствительности (HSR), которые могут быть вызваны наномедицинскими и биологическими препаратами. В отличие от аллергических реакций, CARPA обычно не включает IgE, а возникает в результате активации системы комплемента, которая является частью врожденной иммунной системы, повышающей способность организма уничтожать патогены. Один или несколько из следующих путей: классический путь комплемента (CP), альтернативный путь (AP) и лектиновый путь (LP) могут быть вовлечены в CARPA. Szebeni, Molecular Immunology, 61:163-173 (2014).

[0886] Классический путь запускается активацией C1-комплекса, который содержит: C1q, C1r, C1s или C1qr2s2. Активация C1-комплекса происходит, когда C1q связывается с IgM или IgG в комплексе с антигенами, или когда C1q связывается непосредственно с поверхностью патогена. Такое связывание приводит к конформационным изменениям молекулы C1q, что приводит к активации C1r, которые, в свою очередь, расщепляют C1s. Компонент C1r2s2 теперь разделяет C4, а затем C2, с получением C4a, C4b, C2a и C2b. C4b и C2b связываются с образованием C3-конвертазы классического пути (комплекс C4b2b), которая способствует расщеплению C3 на C3a и C3b. Затем C3b связывает C3-конвертазу с образованием C5-конвертазы (комплекс C4b2b3b). Альтернативный путь постоянно

активируется в результате спонтанного гидролиза C3. Фактор P (пропердин) является положительным регулятором альтернативного пути. Олигомеризация пропердина стабилизирует C3-конвертазу, которая затем может расщеплять гораздо больше C3. Молекулы C3 могут связываться с поверхностями и привлекать больше активности B, D и P, что приводит к усилению активации комплемента.

[0887] Ответ острой фазы (APR) представляет собой сложный системный врожденный иммунный ответ для предотвращения инфекции и элиминации потенциальных патогенов. Многочисленные белки вовлечены в APR, и C-реактивный белок является хорошо охарактеризованным.

[0888] В соответствии с изобретением было обнаружено, что некоторые ЛНЧ способны физически связываться с тромбоцитами почти сразу после введения in vivo, в то время как другие ЛНЧ вообще не связываются с тромбоцитами или связываются только на фоновом уровне. Примечательно, что те ЛНЧ, которые связываются с тромбоцитами, также, по-видимому, стабилизируют агрегаты тромбоцитов, которые впоследствии образуются. Физический контакт тромбоцитов с некоторыми ЛНЧ коррелирует со способностью таких тромбоцитов оставаться агрегированными или образовывать агрегаты непрерывно в течение длительного периода времени после введения. Такие агрегаты включают активированные тромбоциты, а также клетки врожденного иммунитета, такие как макрофаги и B-клетки.

24. Способы применения

[0889] Полезная нагрузка для лечения МВ, например, полинуклеотиды, фармацевтические композиции и составы, описанные выше, используются при получении, производстве и терапевтическом применении для лечения и/или профилактики заболеваний, расстройств или состояний, связанных с CFTR. В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка для лечения МВ, например полинуклеотиды, композиции и составы по данному изобретению, используются для лечения и/или профилактики МВ.

[0890] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка для лечения МВ, например, полинуклеотиды, фармацевтические композиции и составы по данному изобретению, используются в способах снижения уровня натрия в клетках у субъекта, нуждающегося в этом. Например, в одном аспекте в данном изобретении предложен способ облегчения признаков и симптомов МВ у субъекта, включающий

введение этому субъекту композиции или состава, содержащего полинуклеотид, кодирующий CFTR (например, мРНК, кодирующую полипептид CFTR).

[0891] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка для лечения МВ, например, полинуклеотиды, фармацевтические композиции и составы по данному изобретению, используются для снижения уровня метаболита, связанного с МВ (например, субстрата или продукта), причем способ включает введение субъекту эффективного количества полинуклеотида, кодирующего полипептид CFTR.

[0892] В некоторых вариантах осуществления введение эффективного количества полезной нагрузки для лечения МВ, например, полинуклеотида, фармацевтической композиции или состава по данному изобретению, снижает уровни биомаркера МВ, например, внутриклеточные уровни натрия. В некоторых вариантах осуществления введение полинуклеотида, фармацевтической композиции или состава по данному изобретению приводит к снижению уровня одного или нескольких биомаркеров МВ, например, внутриклеточного уровня натрия, в течение короткого периода времени после введения полинуклеотида, фармацевтической композиции или состава по данному изобретению.

[0893] Заместительная терапия является потенциальным способом лечения МВ. Таким образом, в некоторых аспектах данного изобретения полезная нагрузка для лечения МВ, например, полинуклеотиды, например, мРНК, описанная в данном документе, содержат одну или несколько последовательностей, кодирующих полипептид CFTR, который подходит для применения в генной заместительной терапии МВ. В некоторых вариантах осуществления данное изобретение лечит отсутствие CFTR или активности CFTR, либо сниженную или аномальную активность CFTR у субъекта путем предоставления субъекту полинуклеотида, например, мРНК, которая кодирует полипептид CFTR. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид оптимизирован по последовательности. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, мРНК) содержит последовательность нуклеиновой кислоты (например, ОРС), кодирующую полипептид CFTR, где последовательность нуклеиновой кислоты оптимизирована, например, путем модификации ее содержания G/C, уридина или тимидина, и/или полинуклеотид содержит по меньшей мере один химически модифицированный нуклеозид. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит сайт связывания миРНК, например, сайт связывания миРНК, который связывает миРНК-142.

[0894] В некоторых вариантах осуществления введение субъекту композиции или

состава, содержащего полезную нагрузку для лечения МВ, например, полинуклеотида, фармацевтической композиции или состава по данному изобретению, приводит к снижению внутриклеточных уровней натрия в клетках до уровня по меньшей мере на 10%, меньшей мере на 15%, меньшей мере на 20%, меньшей мере на 25%, меньшей мере на 30%, меньшей мере на 35%, меньшей мере на 40%, меньшей мере на 45%, меньшей мере на 50%, меньшей мере на 55%, меньшей мере на 60%, меньшей мере на 65 %, меньшей мере на 70%, меньшей мере на 75 %, меньшей мере на 80%, меньшей мере на 85%, меньшей мере на 90%, меньшей мере на 95% или на 100 % ниже уровня, наблюдаемого до введения композиции или состава.

[0895] В некоторых вариантах осуществления введение полезной нагрузки для лечения МВ, например, полинуклеотида, фармацевтической композиции или состава по данному изобретению, приводит к экспрессии CFTR в клетках субъекта. В некоторых вариантах осуществления введение полинуклеотида, фармацевтической композиции или состава по данному изобретению приводит к увеличению ферментативной активности CFTR у субъекта. Например, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по данному изобретению используют в способах введения композиции или состава, содержащего мРНК, кодирующую полипептид CFTR, субъекту, при этом способ приводит к повышению ферментативной активности CFTR по меньшей мере в некоторых клетках субъекта.

[0896] В некоторых вариантах осуществления введение субъекту полезной нагрузки, например, композиции или состава, содержащего мРНК, кодирующую полипептид CFTR, приводит к повышению ферментативной активности CFTR в клетках до уровня по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15% по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100 % или более от уровня активности, ожидаемого у нормального субъекта, например, у человека, не страдающего МВ.

[0897] В некоторых вариантах осуществления введение полезной нагрузки для лечения МВ, например, полинуклеотида, фармацевтической композиции или состава по данному изобретению, приводит к экспрессии белка CFTR по меньшей мере в некоторых клетках субъекта, которая сохраняется в течение периода времени, достаточного для проявления значительной активности хлоридных каналов.

[0898] В некоторых вариантах осуществления повышена экспрессия кодируемой полезной нагрузки для лечения МВ, например, полипептида. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид повышает уровни экспрессии CFTR в клетках при введении в эти клетки, например, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% по отношению к уровню экспрессии CFTR в клетках перед введением полипептида в клетки.

[0899] В некоторых вариантах осуществления способ или применение включает введение полезной нагрузки для лечения МВ, например, полинуклеотида, *например*, мРНК, содержащей нуклеотидную последовательность, имеющую сходство последовательности с полинуклеотидом SEQ ID NO: 142, где полинуклеотид кодирует полипептид CFTR.

[0900] Другие аспекты данного изобретения относятся к трансплантации клеток, содержащих полезную нагрузку, для лечения МВ, например, полинуклеотидов, субъекту-млекопитающему. Введение клеток субъектам-млекопитающим известно специалистам в данной области техники и включает, помимо прочего, локальную имплантацию (например, местное или подкожное введение), доставку в органы или системную инъекцию (например, внутривенную инъекцию или ингаляцию) и состав клеток в фармацевтически приемлемых носителях.

[0901] В данном изобретении также предложены способы повышения активности CFTR у нуждающегося в этом субъекта, например, у субъекта с МВ, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции или состава, содержащего мРНК, кодирующую полипептид CFTR, описанный в данном документе, например, полипептид CFTR человека, его мутант или слитый белок, содержащий CFTR человека.

[0902] В некоторых аспектах активность CFTR, измеренная после введения субъекту, нуждающемуся в этом, например, субъекту с МВ, представляет собой по меньшей мере нормальный уровень активности CFTR, наблюдаемый у здоровых людей. В некоторых аспектах активность CFTR, измеренная после введения, выше, чем уровень активности CFTR, наблюдаемый у пациентов с МВ, например, у пациентов с МВ без лечения. В некоторых аспектах повышение активности CFTR у

нуждающегося в этом субъекта, например, у субъекта с МВ, после введения субъекту терапевтически эффективного количества композиции или состава, содержащего мРНК, кодирующую полипептид CFTR, описанный в данном документе, составляет по меньшей мере на около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более 100 процентов от нормального уровня активности CFTR, наблюдаемого у здоровых людей. В некоторых аспектах повышение активности CFTR выше уровня активности CFTR, наблюдаемого у пациентов с МВ, после введения субъекту композиции или состава, содержащего мРНК, кодирующую полипептид CFTR, описанный в данном документе (например, после введения однократной дозы), сохраняется в течение по меньшей мере 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 12 дней, 14 дней, 21 дня или 28 дней.

[0903] В данном изобретении также предложен способ лечения, профилактики или облегчения симптомов МВ (например, постоянного кашля, легочной инфекции, свистящего дыхания, одышки, плохого роста, плохой прибавки в весе, частого жирного, обильного стула) у пациента с МВ, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции или состава, содержащего мРНК, кодирующую полипептид CFRT, описанный в данном документе. В некоторых аспектах введение терапевтически эффективного количества композиции или состава, содержащего мРНК, кодирующую полипептид CFTR, описанный в данном документе, субъекту, нуждающемуся в лечении МВ, приводит к уменьшению симптомов МВ.

[0904] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка для лечения МВ, например, полинуклеотиды (например, мРНК), фармацевтические композиции и составы, используемые в способах по изобретению, содержат модифицированную урацилом последовательность, кодирующую полипептид CFTR, описанный в данном документе, и сайт связывания миРНК, описанный в данном документе, например, сайт связывания миРНК, который связывается с miR-142, и/или сайт связывания миРНК, который связывается с miR-126. В некоторых вариантах осуществления модифицированная урацилом последовательность, кодирующая полипептид CFTR, содержит по меньшей мере одно химически модифицированное азотистое основание, например, N1-метилпсевдоурацил или 5-метоксиурацил. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 95 % типа азотистого основания (например, урацила) в модифицированной урацилом последовательности, кодирующей полипептид CFTR по изобретению, представляет

собой модифицированные азотистые основания. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 95 % урацила в модифицированной урацилом последовательности, кодирующей полипептид CFTR, представляет собой 1-N-метилпсевдоурацил или 5-метоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК), описанный в данном документе, составлен с средством доставки, включающим, например, ЛНЧ-01 или ЛНЧ-03, ЛНЧ-04, ЛНЧ-05 или ЛНЧ-06. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК), описанный в данном документе, составлен с средством доставки, включающим, например, ЛНЧ-02. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК), описанный в данном документе, составлен с средством доставки, содержащим, например, соединение формулы (I), например, любое из Соединений 1-232, например, Соединение II; соединение формулы (III), (IV), (V) или (VI), например, любое из Соединений 233-342, например, Соединение VI; или соединение формулы (VIII), например, любое из Соединений 419-428, например, Соединение I, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 47,5:10,5:39,0:3,0 или около 50:10:38,5:1,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением в диапазоне от около 30 до около 60 моль % Соединения II или VI (или родственного подходящего аминолипида) (например, 30-40, 40-45, 45-50, 50-55 или 55-60 моль % Соединения II или VI (или родственного подходящего аминолипида)), от около 5 до около 20 моль % фосфолипида (или родственного подходящего фосфолипида или «вспомогательного липида») (например, 5-10, 10-15 или 15-20 моль % фосфолипида (или родственного подходящего фосфолипида или «вспомогательного липида»)), от около 20 до около 50 моль % холестерина (или родственного стерола или «некатионного» липида) (например, около 20-30, 30-35, 35-40, 40-45 или 45-50 моль % холестерина (или родственного стерола или «некатионного» липида)) и от около 0,05 до около 10 моль % липида ПЭГ (или другого подходящего липида ПЭГ) (например, 0,05-1, 1-2, 2-3, 3-4, 4-5, 5-7 или 7-10 моль% липида ПЭГ (или другого подходящего липида ПЭГ)). Иллюстративное средство доставки может иметь молярное соотношение, например, 47,5:10,5:39,0:3,0 или 50:10:38,5:1,5. В некоторых случаях иллюстративное средство доставки может иметь молярные соотношения, например, 47,5:10,5:39,0:3; 47,5:10:39,5:3;

47,5:11:39,5:2; 47,5:10,5:39,5:2,5; 47,5:11:39:2,5; 48,5:10:38,5:3; 48,5:10,5:39:2; 48,5:10,5:38,5:2,5; 48,5:10,5:39,5:1,5; 48,5:10,5:38,0:3; 47:10,5:39,5:3; 47:10:40,5:2,5; 47:11:40:2; 47:10,5:39,5:3; 48:10,5:38,5:3; 48:10:39,5:2,5; 48:11:39:2 или 48:10,5:38,5:3. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II или VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 47,5:10,5:39,0:3,0. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II или VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 47,5:10,5:39,0:3,0 или около 50:10:38,5:1,5.

[0905] В некоторых вариантах осуществления субъект, получающий лечение, имеет вызывающие МВ мутации в обеих копиях гена CFTR, например, с мутациями, выбранными из группы, состоящей из G542X, W1282X, R553X, F508del, N1303K, I507del, G551D, S549N, D1152H, R347P и R117H.

[0906] Специалисту в данной области техники будет понятно, что терапевтическую эффективность лекарственного средства или лечения по данному изобретению можно охарактеризовать или определить путем измерения уровня экспрессии кодируемого белка (например, фермента) в образце или образцах, взятых у субъекта (например, у субъекта доклинических испытаний (грызунов, приматов и т. д.) или у субъекта клинических испытаний (человека). Аналогичным образом, терапевтическую эффективность лекарственного средства или лечения по данному изобретению можно охарактеризовать или определить путем измерения уровня активности кодируемого белка (например, фермента) в образце или образцах, взятых у субъекта (например, у субъекта доклинических испытаний (грызун, примат и т. д.) или у субъекта клинических испытаний (человек). Кроме того, терапевтическую эффективность лекарственного средства или лечения по данному изобретению можно охарактеризовать или определить путем измерения уровня соответствующего биомаркера в образце(ах), взятом(ых) у субъекта. Уровни белка и/или биомаркеров можно определять после введения однократной дозы терапевтического средства на основе мРНК по изобретению, или их можно определять и/или контролировать в несколько моментов времени после введения однократной дозы, или можно определять и/или контролировать на протяжении всего курса лечения, например, многодозового лечения.

Уровни экспрессии белка CFTR

[0907] Некоторые аспекты изобретения включают измерение, определение и/или

мониторинг уровня или уровней экспрессии белка CFTR у субъекта, например, у животного (например, грызунов, приматов и т.п.) или у человека. Животные включают нормальных, здоровых животных или животных дикого типа, а также модели животных для использования для понимании МВ и его лечения. Примеры моделей животных включают модели грызунов, например, мышей с дефицитом CFTR, также называемых мышами $CFTR^{-/-}$.

[0908] Уровни экспрессии белка CFTR могут быть измерены или определены любым признанным в данной области техники способом определения уровней белка в биологических образцах, например, в образцах крови или пункционной биопсии. Термин «уровень» или «уровень белка», используемый в данном документе, предпочтительно означает вес, массу или концентрацию белка в образце или у субъекта. Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что в некоторых вариантах осуществления образец может быть подвергнут, например, любому из следующих действий: очистке, осаждению, разделению, например, центрифугированием и/или ВЭЖХ, а затем подвергнут определению уровня белка, например, с помощью масс- и/или спектрометрического анализа. В типичных вариантах осуществления для определения уровней экспрессии белка можно использовать твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). В других иллюстративных вариантах осуществления очистка белка, разделение и ЖХ-МС могут использоваться в качестве средств для определения уровня белка по изобретению. В некоторых вариантах осуществления мРНК-терапия по изобретению (например, однократная внутривенная доза) приводит к повышению уровня экспрессии белка CFTR в ткани (например, сердце, печени, головном мозге или скелетных мышцах) субъекта (например, повышение в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз и/или повышение на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 100% от нормального уровня) в течение по меньшей мере 6 часов, по меньшей мере 12 часов, по меньшей мере 24 часов, по меньшей мере 36 часов, по меньшей мере 48 часов, по меньшей мере 60 часов, по меньшей мере 72 часов, по меньшей мере 84 часов, по меньшей мере 96 часов, по меньшей мере 108 часов, по меньшей мере 122 часов после введения однократной дозы мРНК-терапии.

Биомаркеры CFTR

[0909] В некоторых вариантах осуществления введение эффективного количества полезной нагрузки для лечения МВ, например, полинуклеотида, фармацевтической композиции или состава по изобретению, снижает уровни биомаркера CFTR, например, внутриклеточные уровни натрия. В некоторых вариантах осуществления введение полинуклеотида, фармацевтической композиции или состава по изобретению приводит к снижению уровня одного или нескольких биомаркеров CFTR, например, внутриклеточного уровня натрия, в течение короткого периода времени после введения полинуклеотида, фармацевтической композиции или состава по изобретению.

[0910] Дополнительные аспекты изобретения включают определение уровня (или уровней) биомаркера, определенного в образце, по сравнению с уровнем (например, референтным уровнем) того же или другого биомаркера в другом образце, например, от того же пациента, от другого пациента, из контроля, и/или из того же или разных моментов времени, и/или физиологическим уровнем, и/или повышенным уровнем, и/или супрафизиологическим уровнем, и/или уровнем контроля. Специалист в данной области техники должен быть знаком с физиологическими уровнями биомаркеров, например, уровнями у нормальных животных или животных дикого типа, нормальных или здоровых субъектов и т.п., в частности, уровнем или уровнями, характерными для субъектов, которые здоровы и/или нормально функционируют. Используемая в данном документе фраза «повышенный уровень» означает количества, превышающие обычно обнаруживаемые у нормального животного или животного дикого типа в доклинических испытаниях, или у нормального или здорового субъекта, например субъекта-человека. Используемый в данном документе термин «супрафизиологический» означает количества, превышающие обычно обнаруживаемые у нормального животного или животного дикого типа в доклинических испытаниях, или у нормального или здорового субъекта, например субъекта-человека, необязательно вызывающий значительно повышенный физиологический ответ. Используемый в данном документе термин «сравнение» или «по сравнению с» предпочтительно означает математическое сравнение двух или более значений, например, уровней биомаркера(ов). Таким образом, специалисту в данной области техники будет очевидно, является ли одно из значений выше, ниже или идентично другому значению или группе значений, если по меньшей мере два из таких значений сравниваются друг с другом. Сравнивание или сравнение может быть в контексте, например, сравнивания с контрольным значением, например, по сравнению с эталонным уровнем

внутриклеточного натрия в крови, сыворотке, плазме и/или ткани (например, печени) у указанного субъекта перед введением (например, у человека, страдающего МВ) или у нормального или здорового субъекта. Сравнивание или сравнение также может быть в контексте, например, сравнивания с контрольным значением, например, по сравнению с эталонным уровнем внутриклеточного натрия в крови, сыворотке, плазме и/или ткани (например, печени) у указанного субъекта перед введением (например, у человека, страдающего МВ) или у нормального или здорового субъекта.

[0911] Используемый в данном документе термин «контроль» предпочтительно представляет собой образец от субъекта, при этом статус МВ указанного субъекта известен. В одном варианте осуществления контроль представляет собой образец здорового пациента. В другом варианте осуществления контроль представляет собой образец по меньшей мере одного субъекта с известным статусом МВ, например, статусом тяжелого, легкого МВ или здорового, например, контрольного пациента. В другом варианте осуществления контроль представляет собой образец от субъекта, не получающего лечения от МВ. В еще одном варианте осуществления контроль представляет собой образец от одного субъекта или пул образцов от разных субъектов и/или образцы, взятые у субъекта(ов) в разные моменты времени.

[0912] Используемый в данном документе термин «уровень» или «уровень биомаркера» предпочтительно означает вес, массу или концентрацию биомаркера по изобретению в образце или у субъекта. Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что в некоторых вариантах осуществления образец может быть подвергнут, например, одному или нескольким из следующих действий: очистке вещества, осаждению, разделению, например, центрифугированием и/или ВЭЖХ с последующим определением уровня биомаркера, т.е. с помощью масс-спектрометрического анализа. В некоторых вариантах осуществления ЖХ-МС можно использовать в качестве средства определения уровня биомаркера по изобретению.

[0913] Используемый в данном документе термин «определение уровня» биомаркера может означать способы, которые включают количественную оценку количества по меньшей мере одного вещества в образце, взятом у субъекта, например, в биологической жидкости субъекта (например, в сыворотке, плазме, моче, лимфе и т. д.) или в ткани субъекта (например, в печени и т. д.).

[0914] Термин «эталонный уровень», используемый в данном документе, может относиться к уровням (например, биомаркера) у субъекта до введения мРНК-

терапии по изобретению (например, у человека, страдающего МВ), или у нормального или здорового субъекта.

[0915] Используемый в данном документе термин «нормальный субъект» или «здоровый субъект» относится к субъекту, не страдающему симптомами, связанными с МВ. Более того, субъект будет считаться нормальным (или здоровым), если у него нет мутаций функциональных частей или доменов гена *CFTR* и/или мутаций гена *CFTR*, приводящих к снижению или дефициту фермента CFTR или его активности, что приводит к симптомам, связанным с МВ. Указанные мутации будут обнаружены, если образец от субъекта подвергнут генетическому исследованию на такие мутации *CFTR*. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения в качестве контрольного образца используется образец от здорового субъекта или в качестве контроля используется известное или стандартизированное значение уровня биомаркера из образцов здоровых или нормальных субъектов.

[0916] В некоторых вариантах осуществления сравнение уровня биомаркера в образце от субъекта, нуждающегося в лечении от МВ, или у субъекта, проходящего лечение от МВ, с контрольным уровнем биомаркера включает сравнение уровня биомаркера в образце от субъекта (нуждается в лечении или проходящего лечение от МВ) с исходным или эталонным уровнем, при этом, если уровень биомаркера в образце от субъекта (нуждающегося в лечении или получающего лечение от МВ) повышен, увеличен или выше по сравнению с исходным или эталонным уровнем, это свидетельствует о том, что субъект страдает от МВ и/или нуждается в лечении; и/или при этом, если уровень биомаркера в образце от субъекта (нуждающегося в лечении или получающего лечение от МВ) снижен или ниже по сравнению с исходным уровнем, это указывает на то, что субъект не болеет, успешно лечится от МВ или не нуждается в лечении МВ. Чем сильнее снижение (например, снижение по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз и/или снижение по меньшей мере на 10 %, по меньшей мере на 20 %, 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 100 %) уровня биомаркера в течение определенного периода времени, например, в течение 6 часов, в течение 12 часов, 24 часов, 36 часов, 48 часов, 60 часов или 72 часов и/или в течение определенного периода времени,

например, 48 часов, 72 часов, 96 часов, 120 часов, 144 часов, 1 недели, 2 недель, 3 недель, 4 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяцев и т. д., тем более успешной является терапия, такая как, например, мРНК-терапия по изобретению (например, однократная доза или многократное введение).

[0917] Снижение по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на 100% или более уровня биомаркера, в частности, в биологической жидкости (например, плазме, сыворотке, моче, например, мочевом осадке) или в ткани(ях) субъекта (например, в печени), в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более дней после введения указывает на дозу, подходящую для успешного лечения МВ, при этом снижение, используемое в данном документе, предпочтительно означает, что уровень биомаркера, определенный в конце определенного периода времени (например, после введения, например, однократной внутривенной дозы) сравнивают с уровнем того же биомаркера, определенным в начале указанного периода времени (например, перед введением указанной дозы). Примерные периоды времени включают 12, 24, 48, 72, 96, 120 или 144 часа после введения, в частности 24, 48, 72 или 96 часов после введения.

[0918] Устойчивое снижение уровней субстрата (например, биомаркеров) особенно показательно для дозирования терапевтического средства на основе мРНК и/или схем введения, успешных для лечения МВ. Такое устойчивое снижение можно назвать в данном документе «длительностью» эффекта. В иллюстративных вариантах осуществления снижение по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90% или по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99%, по меньшей мере на около 100% или более уровня биомаркера, в частности, в биологической жидкости (например, плазме, сыворотке, моче, например, мочевом осадке) или в ткани(ях) субъекта (например, в печени), в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более дней после введения свидетельствует об успешном терапевтическом подходе. В типичных вариантах осуществления предпочтительным является устойчивое снижение

уровней субстрата (например, биомаркера) в одном или нескольких образцах (например, жидкости и/или ткани). Например, терапия мРНК, приводящая к устойчивому снижению биомаркера, необязательно в сочетании с устойчивым снижением указанного биомаркера по меньшей мере в одной ткани, предпочтительно в двух, трех, четырех, пяти или более тканях, свидетельствует об успешном лечении.

[0919] В некоторых вариантах осуществления однократная доза мРНК-терапии по изобретению составляет от около 0,2 до около 0,8 мг/кг (мг/кг), от около 0,3 до около 0,7 мг/кг, от около 0,4 до около 0,8 мг/кг, или около 0,5 мг/кг. В другом варианте осуществления однократная доза мРНК-терапии по изобретению составляет менее 1,5 мг/кг, менее 1,25 мг/кг, менее 1 мг/кг или менее 0,75 мг/кг.

25. Композиции и составы для применения

[0920] Некоторые аспекты изобретения относятся к композициям или составам, содержащим любой из полинуклеотидов, описанных выше.

[0921] В некоторых вариантах осуществления композиция или состав содержит:

(i) полезную нагрузку для лечения МВ, например, полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК), содержащий нуклеотидную последовательность с оптимизированной последовательностью (например, ОРС), кодирующую полипептид CFTR (например, последовательность дикого типа, его функциональный фрагмент или вариант), при этом полинуклеотид содержит по меньшей мере одно химически модифицированное азотистое основание, например, N1-метилпсевдоурацил или 5-метоксиурацил (например, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 99% или 100% урацилов представляют собой N1-метилпсевдоурацилы или 5-метоксиурацилы), и при этом полинуклеотид дополнительно содержит сайт связывания миРНК, например, сайт связывания миРНК, который связывается с miR-142 (например, сайт связывания miR-142-3p или miR-142-5p), и/или сайт связывания миРНК, который связывается с miR-126 (например, сайт связывания miR-126-3p или miR-126-5p); и

(ii) средство доставки, содержащее, например, ЛНЧ-01, ЛНЧ-03, ЛНЧ-04, ЛНЧ-05 или ЛНЧ-06; соединение формулы (I), например, любое из Соединений 1-

232, например, Соединение II; соединение формулы (III), (IV), (V) или (VI), например, любое из Соединений 233-342, например, Соединение VI; или соединение формулы (VIII), например, любое из Соединений 419-428, например, Соединение I, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления средство доставки представляет собой липидную наночастицу, содержащую Соединение II, Соединение VI, их соль или стереоизомер, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 50:10:38,5:1,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 49:11,2:39,3:0,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 47,5:10,5:39,0:3,0. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 50:10:38,5:1,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 49:11,2:39,3:0,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 47,5:10,5:39,0:3,0.

[0922] В некоторых вариантах осуществления композиция или состав содержит:

(i) полезную нагрузку для лечения МВ, например, полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК), содержащий нуклеотидную последовательность с оптимизированной последовательностью (например, ОРС), кодирующую полипептид CFTR (например, последовательность дикого типа, его функциональный фрагмент или вариант), при этом полинуклеотид содержит по меньшей мере одно химически модифицированное азотистое основание, например, N1-метилпсевдоурацил или 5-метоксиурацил (например, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 99% или 100% урацилов представляют собой N1-метилпсевдоурацилы или 5-метоксиурацилы), и при этом полинуклеотид дополнительно содержит сайт связывания миРНК, например, сайт связывания

миРНК, который связывается с miR-142 (например, сайт связывания miR-142-3p или miR-142-5p), и/или сайт связывания миРНК, который связывается с miR-126 (например, сайт связывания miR-126-3p или miR-126-5p); и

(ii) средство доставки, содержащее, например, ЛНЧ-02; соединение формулы (I), например, любое из Соединений 1-232, например, Соединение II; соединение формулы (III), (IV), (V) или (VI), например, любое из Соединений 233-342, например, Соединение VI; или соединение формулы (VIII), например, любое из Соединений 419-428, например, Соединение I, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления средство доставки представляет собой липидную наночастицу, содержащую Соединение II, Соединение VI, их соль или стереоизомер, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 50:10:38,5:1,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 50,5:10,1:38,9:0,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин и Соединение I или ПЭГ-ДМГ, например, с молярным соотношением около 50,5:10,1:38,9:0,5.

[0923] В некоторых вариантах осуществления композиция или состав содержит:

(i) полезную нагрузку для лечения МВ, например, полинуклеотид (например, РНК, например, мРНК), содержащий нуклеотидную последовательность с оптимизированной последовательностью (например, ОРС), кодирующую полипептид CFTR (например, последовательность дикого типа, его функциональный фрагмент или вариант), при этом полинуклеотид содержит по меньшей мере одно химически модифицированное азотистое основание, например, N1-метилпсевдоурацил или 5-метоксиурацил (например, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 99% или 100% урацилов представляют собой N1-метилпсевдоурацилы или 5-метоксиурацилы), и при этом полинуклеотид дополнительно содержит сайт связывания миРНК, например, сайт связывания миРНК, который связывается с miR-142 (например, сайт связывания miR-142-3p или miR-142-5p), и/или сайт связывания миРНК, который связывается с miR-126

(например, сайт связывания miR-126-3p или miR-126-5p); и

(ii) средство доставки, содержащее, например, ЛНЧ-01, ЛНЧ-02, ЛНЧ-03, ЛНЧ-04, ЛНЧ-05 или ЛНЧ-06; соединение формулы (I), например, любое из Соединений 1-232, например, Соединение II; соединение формулы (III), (IV), (V) или (VI), например, любое из Соединений 233-342, например, Соединение VI; соединение формулы (VIII), например, любое из Соединений 419-428, например, Соединение I, или соединение формулы A1, A2, A3, A4 или A5, например, любое из SA1-SA41, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления средство доставки представляет собой липидную наночастицу, содержащую Соединение II, Соединение VI, их соль или стереоизомер, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления средство доставки представляет собой катионную липидную наночастицу, содержащую GL-67 или его соль. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 47,6:9,5:36,6:1,4:4,9. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 47,3:9,5:36,4:1,4:5,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение II, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 45,8:10,5:36,8:1,4:5,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 47,6:9,5:36,6:1,4:4,9. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 47,3:9,5:36,4:1,4:5,5. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит Соединение VI, DSPC, холестерин, Соединение I или ПЭГ-ДМГ и GL-67 или его соль, например, с молярным соотношением около 45,8:10,5:36,8:1,4:5,5.

[0924] В некоторых вариантах осуществления содержание урацила или тимина в ОРС относительно теоретического минимального содержания урацила или тимина в нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид CFTR (%U_{TM} или %T_{TM}), составляет от около 100% до около 150%.

[0925] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, композиции или составы, указанные выше, применяют для лечения и/или профилактики

заболеваний, расстройств или состояний, связанных с CFTR, например, МВ.

26. Формы введения

[0926] Полезная нагрузка для лечения МВ, например, полинуклеотиды, фармацевтические композиции и составы по изобретению, описанные выше, можно вводить любым способом, который приводит к терапевтически эффективному результату, например, доставкой в легкие. К ним также относятся, помимо прочего, назальное введение (через нос), инсуффляция (вдувание), трансбуккальное (направленное к щеке), внутрилегочное (в легкие или их бронхи), интрасинусное (в носовые или периорбитальные пазухи), или респираторное (в дыхательных путях путем вдыхания перорально или назально для местного или системного действия). В некоторых вариантах осуществления состав для способа введения может включать по меньшей мере один неактивный ингредиент.

[0927] В некоторых случаях полезную нагрузку для лечения МВ, например, полинуклеотиды, фармацевтические композиции и составы по изобретению, описанные выше, можно вводить через ротовую полость. Такой состав может содержать сухие частицы, содержащие активный ингредиент и имеющие диаметр в диапазоне от около 0,5 нм до около 7 нм или от около 1 нм до около 6 нм. В некоторых случаях такой состав может содержать сухие частицы, которые имеют диаметр в диапазоне от около 1 мкм до около 5 мкм или от около 1 мкм до около 6 мкм. Такие композиции обычно представлены в форме сухих порошков для введения с использованием устройства, содержащего резервуар с сухим порошком, куда может быть направлен поток распыляющего вещества для рассеивания порошка, и/или с использованием контейнера, распределяющего самораспыляющийся растворитель/порошок, такого как устройство, содержащее активный ингредиент, растворенный и/или суспендированный в низкокипящем распылительном веществе в герметичном контейнере. Такие порошки содержат частицы, в которых по меньшей мере 98% частиц по массе имеют диаметр более 0,5 нм и по меньшей мере 95% частиц по количеству имеют диаметр менее 7 нм. Альтернативно, по меньшей мере 95% частиц по массе имеют диаметр более 1 нм и по меньшей мере 90% частиц по количеству имеют диаметр менее 6 нм. Композиции в виде сухого порошка могут включать твердый мелкодисперсный порошковый разбавитель, такой как сахар, и обычно представлены в виде стандартной лекарственной формы. К низкокипящим пропеллентам обычно относятся жидкие

пропелленты с температурой кипения ниже 65° F при атмосферном давлении. Обычно пропеллент может составлять от 50 % до 99,9 % (масс./масс.) композиции, и активный ингредиент может составлять от 0,1 % до 20 % (масс./масс.) композиции. Распыляющее вещество может дополнительно содержать дополнительные ингредиенты, такие как жидкое неионное и/или твердое анионные поверхностно-активное вещество и/или твердый разбавитель (который может иметь размер частиц того же порядка, что и частицы, содержащие активный ингредиент). В качестве неограничивающего примера полинуклеотиды, фармацевтические композиции и составы по изобретению, описанные выше, могут быть приготовлены для доставки в легкие способами, описанными в патенте США № 8257685; включенном в данное описание посредством ссылки в полном объеме. Полинуклеотиды, фармацевтические композиции и составы по изобретению, описанные выше, приготовленные для доставки в легкие, могут обеспечивать активный ингредиент в форме капель раствора и/или суспензии. Такие составы могут быть получены, упакованы и/или реализованы в виде водных и/или разбавленных спиртовых растворов и/или суспензий, необязательно стерильных, содержащих активный ингредиент, и обычно их можно вводить с использованием любого распыляющего и/или разбрызгивающего устройства. Подходящие небулайзеры известны в данной области техники, включая, например, ультразвуковые небулайзеры, струйные небулайзеры и небулайзеры с вибрирующей сеткой. В некоторых случаях небулайзер представляет собой небулайзер с вибрирующей сеткой. Такие составы для доставки в легкие могут дополнительно содержать один или более дополнительных ингредиентов, включая, но не ограничиваясь этим, ароматизатор, такой как сахарин натрия, летучее масло, буферный агент, поверхностно-активный агент и/или консервант, такой как метилгидроксибензоат. Капли, обеспечиваемые данным путем введения, могут иметь средний диаметр в диапазоне от около 0,1 нм до около 200 нм.

[0928] В некоторых случаях полезную нагрузку для лечения MB, например, полинуклеотиды, фармацевтические композиции , и составы по изобретению, описанные выше, можно вводить посредством интраназального, назального или трансбуккального введения для доставки в легкие. Например, полинуклеотиды, фармацевтические композиции и составы, описанные в данном документе как применимые для доставки в легкие, применимы для интраназальной доставки фармацевтической композиции. Другой состав, подходящий для интраназального введения, представляет собой крупнодисперсный порошок, содержащий активный

ингредиент, и имеющий средний размер частиц от около 0,2 мкм до 500 мкм. В некоторых случаях такой состав может содержать сухие частицы, которые имеют диаметр в диапазоне от около 1 мкм до около 5 мкм или от около 1 мкм до около 6 мкм. В некоторых случаях такой состав содержится в капсуле или блистере. Такой состав вводят посредством способа, в котором осуществляют вдыхание через нос, т. е. посредством быстрого вдоха через носовой проход из контейнера с порошком, который держат вблизи носа. Полинуклеотиды, фармацевтические композиции и составы, подходящие для назального введения, могут, например, содержать от около 0,1% (масс./масс.) до 100% (масс./масс.) активного ингредиента и могут содержать один или несколько дополнительных ингредиентов, описанных в данном документе. Полинуклеотиды, фармацевтические композиции и составы могут быть приготовлены, упакованы и/или проданы в виде состава, подходящего для трансбуккального введения. Такие составы могут иметь, например, форму таблеток и/или пастилок, полученных с использованием обычных способов, и могут содержать, например, от 0,1 % до 20% (масс./масс.) активного ингредиента, при этом остальная часть включает перорально растворимую и/или разлагаемую композицию и, необязательно, один или более дополнительных ингредиентов, описанных в данном документе. В качестве альтернативы, составы, подходящие для трансбуккального введения, могут содержать порошок и/или распыленный и/или разбрызганный раствор и/или суспензию, содержащие активный ингредиент. Такие порошковые, распыленные и/или разбрызганные составы при диспергировании могут иметь средний размер частиц и/или капель в диапазоне от около 0,1 нм до около 200 нм, и могут дополнительно содержать один или более любых дополнительных ингредиентов, описанных в данном документе.

[0929] Полезная нагрузка для лечения МВ, например, полинуклеотиды по данному изобретению (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR или его функциональный фрагмент или вариант), может быть доставлена клетку в голом виде. Используемый в данном документе термин «голый» относится к доставке полинуклеотидов, свободных от агентов, способствующих трансфекции. Незащищенные полинуклеотиды могут быть доставлены в клетку с использованием способов введения, известных в данной области техники и описанных в данном документе.

[0930] Предпочтительно полинуклеотиды по данному изобретению (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CFTR или его функциональный фрагмент или вариант) могут быть

приготовлены с использованием ЛНЧ и способов, описанных в данном документе. Композиции могут содержать полинуклеотиды, которые могут быть модифицированы и/или немодифицированы. Составы могут дополнительно включать, помимо прочего, агенты для проникновения в клетки, фармацевтически приемлемый носитель, средство доставки, биоразлагаемый или биосовместимый полимер, растворитель и депо для доставки с пролонгированным высвобождением. Составленные полинуклеотиды могут быть доставлены в клетку с использованием способов введения, известных в данной области техники и описанных в данном документе.

[0931] Фармацевтическая композиция для парентерального введения может содержать по меньшей мере один неактивный ингредиент. Любой или ни один из используемых неактивных ингредиентов может не быть одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA). Неисчерпывающий перечень неактивных ингредиентов для применения в фармацевтических композициях для парентерального введения включает соляную кислоту, маннит, азот, ацетат натрия, хлорид натрия и гидроксид натрия.

[0932] Составы можно стерилизовать, например, путем фильтрации через задерживающий бактерии фильтр и/или путем включения стерилизующих агентов в форме стерильных твердых композиций, которые можно растворять или диспергировать в стерильной воде или другой стерильной инъекционной среде непосредственно перед применением.

[0933] Составы можно распылять с использованием способов доставки в легкие, известных в данной области техники. В качестве неограничивающего примера полинуклеотиды, фармацевтические композиции и составы по изобретению, описанные выше, могут быть приготовлены для доставки в легкие способами, описанными в патенте США № 8257685; включенном в данное описание посредством ссылки в полном объеме.

27. Наборы и устройства

a. Наборы

[0934] В изобретении предложено множество наборов для удобного и/или эффективного использования заявленных нуклеотидов по данному изобретению.

Как правило, наборы будут содержать достаточное количество и/или количество компонентов, чтобы пользователь мог проводить несколько процедур лечения субъекта(ов) и/или проводить несколько экспериментов.

[0935] В одном аспекте в данном изобретении предложены наборы, содержащие полезную нагрузку для лечения МВ, например (полинуклеотиды) по изобретению.

[0936] Указанные наборы могут быть предназначены для продукции белка и содержать первые полинуклеотиды, включающие транслируемую область. Набор может дополнительно содержать упаковку и инструкции и/или средство доставки для формирования состава композиции. Средство доставки может включать физиологический раствор, буферный раствор, ЛНЧ или любое средство доставки, описанное в данном документе.

[0937] В некоторых вариантах осуществления буферный раствор может включать хлорид натрия, хлорид кальция, фосфат и/или ЭДТА. В другом варианте осуществления буферный раствор может включать, помимо прочего, физиологический раствор, физиологический раствор с 2 мМ кальция, 5 % сахарозы, 5 % сахарозы с 2 мМ кальция, 5 % маннита, 5 % маннитола с 2 мМ кальция, лактат Рингера, хлорид натрия, хлорид натрия с 2 мМ кальция и маннозы (*см., например*, па. публикацию США № 20120258046; полностью включенную в данное описание посредством ссылки). В другом варианте осуществления буферные растворы можно осаждать или их можно лиофилизировать. Количество каждого компонента можно варьировать, чтобы обеспечить постоянство, воспроизводимость более высоких концентраций физиологического раствора или простых буферных составов. Компоненты также можно варьировать для повышения стабильности модифицированной РНК в буферном растворе в течение определенного периода времени и/или в различных условиях. В одном аспекте в данном изобретении предложены наборы для продукции белка, включающие: полинуклеотид, содержащий транслируемую область, предоставленный в количестве, эффективном для продукции желаемого количества белка, кодируемого транслируемой областью, при введении в клетку-мишень; второй полинуклеотид, содержащий ингибирующую нуклеиновую кислоту в количестве, эффективном для существенного ингибирования врожденного иммунного ответа клетки; и упаковка и инструкция.

[0938] В одном аспекте в данном изобретении предложены наборы для продукции белка, включающие полинуклеотид, содержащий транслируемую область, при этом полинуклеотид проявляет пониженную деградацию под действием клеточной

нуклеазы, а также упаковку и инструкции.

[0939] В одном аспекте в данном изобретении предложены наборы для продукции белка, включающие полезную нагрузку для лечения МВ, например, полинуклеотид, содержащий транслируемую область, при этом полинуклеотид демонстрирует сниженную деградацию под действием клеточной нуклеазы, и клетку млекопитающего, пригодную для трансляции транслируемой области первой нуклеиновой кислоты.

b. Устройства

[0940] В данном изобретении предложены устройства, которые могут включать полезную нагрузку для лечения муковисцидоза, например, полинуклеотиды, кодирующие представляющие интерес полипептиды. Эти устройства содержат в стабильном составе реагенты для синтеза полинуклеотида в составе, доступном для немедленной доставки нуждающемуся в этом субъекту, например пациенту-человеку.

[0941] Устройства для введения могут быть использованы для доставки полезной нагрузки для лечения МВ, например, полинуклеотидов по данному изобретению в соответствии со схемами однократного, многократного или разделенного дозирования, описанными в данном документе. Такие устройства описаны, например, в международной публикации пат. заявки № WO 2013151666, содержание которой полностью включено в данное описание посредством ссылки.

[0942] Способ и устройства, известные в данной области техники для многократного введения в клетки, органы и ткани, предполагаются для использования в сочетании со способами и композициями, описанными в данном документе в качестве вариантов осуществления данного изобретения. К ним относятся, например, устройства для распыления, аэрозолизации, атомизации и ингаляции.

[0943] В соответствии с данным изобретением эти устройства для многократного введения можно использовать для доставки одной, нескольких или разделенных доз, рассматриваемых в данном документе. Такие устройства описаны, например, в международной публикации пат. заявки № WO 2013151666, содержание которой полностью включено в данное описание посредством ссылки.

[0944] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид вводят интраназально, назально или трансбуккально.

c. Способы и устройства, использующие электрический ток

[0945] Способы и устройства, использующие электрический ток, могут применяться для доставки полинуклеотидов по данному изобретению в соответствии с схемами однократного, многократного или разделенного дозирования, описанными в данном документе. Такие способы и устройства описаны в публикации международной пат. заявки № WO 2013151666, содержание которой полностью включено в данное описание посредством ссылки.

d. Способы и устройства доставки в легкие

[0946] Способы и устройства для доставки в легкие (например, небулайзеры, распылители, аэрозольные распылители, ингаляторы) могут быть использованы для доставки полинуклеотидов по данному изобретению в соответствии с схемами однократного, многократного или разделенного дозирования, описанными в данном документе. Такие способы и устройства описаны в публикации международной пат. заявки № WO 2013151666 и патенте США № 8257685, содержание каждого из которых полностью включено в данное описание посредством ссылки.

28. Дыхательная функция и другие тесты для улучшения симптомов МВ

[0947] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая полезную нагрузку для лечения МВ, например, мРНК, содержащую открытую рамку считывания (ОРС), кодирующую полипептид регулятора трансмембранной проводимости при муковисцидозе (CFTR), при введении субъекту, нуждающемуся в этом, достаточна для улучшения измерения по меньшей мере одного дыхательного объема по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25% или по меньшей мере на 30% по сравнению с по меньшей мере одним измеренным эталонным дыхательным объемом у субъекта, не получавшего лечения от муковисцидоза, в течение по меньшей мере 24 часов, по меньшей мере 48 часов, по меньшей мере 72 часов, по меньшей мере 96 часов или по меньшей мере 120 часов после введения. Дыхательный объем – это количество воздуха, вдыхаемого, выдыхаемого и хранящегося в легких в любой момент времени. Ниже приведены неограничивающие примеры различных дыхательных объемов, которые могут быть измерены.

[0948] Общая емкость легких (TLC; англ.: total lung capacity) это объем легких при

максимальном надувании, сумма VC и RV. Средняя общая емкость легких составляет 6000 мл, хотя она зависит от возраста, роста, пола и состояния здоровья.

[0949] Дыхательный объем (TV; англ.: tidal volume) — это объем воздуха, поступающего в легкие или выходящего из них при спокойном дыхании (TV обозначает подразделение легкого; при точном измерении дыхательного объема, как при расчете газообмена, используется символ TV или VT). Средний дыхательный объем составляет 500 мл.

[0950] Остаточный объем (RV; англ.: residual volume) – это объем воздуха, остающийся в легких после максимального выдоха. Остаточный объем (RV/TLC%) выражается в процентах от TLC.

[0951] Резервный объем выдоха (ERV; англ.: expiratory reserve volume) — это максимальный объем воздуха, который можно выдохнуть (сверх дыхательного объема) во время форсированного выдоха.

[0952] Резервный объем вдоха (IRV; англ.: inspiratory reserve volume) — это максимальный объем, который можно вдохнуть из положения в конце вдоха.

[0953] Емкость вдоха (IC; англ.: inspiratory capacity) представляет собой сумму IRV и TV.

[0954] Жизненно важная емкость вдоха (IVC; англ.: inspiratory vital capacity) – это максимальный объем воздуха, вдыхаемый с точки максимального выдоха.

[0955] Жизненно важная емкость легких (VC; англ.: vital capacity) – это объем воздуха, выдыхаемый после самого глубокого вдоха.

[0956] Функциональная остаточная емкость (FRC; англ.: functional residual capacity) – это объем легких в положения в конце выдоха.

[0957] Форсированная жизненно важная емкость легких (FVC; англ.: forced vital capacity) – это определение жизненно важной емкости легких по максимальному усилию форсированного выдоха.

[0958] Объем (время) форсированного выдоха (FEVt; англ.: forced expiratory volume (time)) — общий термин, обозначающий объем воздуха, выдыхаемого в условиях форсированного выдоха в первые t секунд. FEV1 — объем выдоха в конце первой секунды форсированного выдоха. FEFx — скорость форсированного выдоха, связанная с некоторым участком кривой FVC; модификаторы относятся к количеству уже выдохнутой FVC. FEFmax — это максимальная мгновенная скорость, достигаемая во время маневра FVC.

[0959] Скорость форсированного вдоха (FIF; англ.: forced inspiratory flow) представляет собой специфическое измерение кривой форсированного вдоха,

обозначаемое номенклатурой, аналогичной кривой форсированного выдоха. Например, максимальная скорость вдоха обозначается FIFmax. Если не указано иное, квалификаторы объема указывают объем вдоха от RV в точке измерения.

[0960] Пиковая скорость выдоха (PEF; англ.: peak expiratory flow) — это максимальная скорость форсированного выдоха, измеренная с помощью пикфлоуметра.

[0961] Максимальная произвольная вентиляция легких (MVV; англ.: maximal voluntary ventilation) — это объем воздуха, выдыхаемый за определенный период времени при повторяющихся максимальных усилиях.

29. Определения

[0962] Для того, чтобы данное описание было более понятным, сначала определены некоторые термины. Каждый из следующих терминов, используемых в настоящей заявке, если иное прямо не предусмотрено в данном документе, имеет значение, изложенное ниже. Дополнительные определения приведены в тексте заявки.

[0963] Описание данного изобретения включает в себя варианты осуществления изобретения, в которых ровно один член группы присутствует в, применяется в или иным образом относится к данному продукту или способу. Описание изобретения включает в себя варианты осуществления изобретения, в которых более чем один из группы членов присутствует в, применяется в или иным образом относится к данному продукту или способу.

[0964] В данном описании изобретения и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают множественное число, если контекст явно не диктует иное. Термины в форме единственного числа, а также термины «один или более» и «по меньшей мере один» могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо. В определенных аспектах форма единственного числа означает «одно». В других аспектах форма единственного числа включает «два или более» или «несколько».

[0965] Кроме того, использование в настоящем документе союзов «и/или» следует понимать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов вместе с другим или без него. Таким образом, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «A и/или B», предназначен для включения фраз «A и B», «A или B»; «A» (отдельно) и «B» (отдельно). Аналогично, термин «и/или» в контексте такой фразы, как «A, B и/или C», предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: A, B и C; A, B или C; A или C; A или B; B или C; A и C; A и B;

B и C; A (отдельно); B (отдельно) и C (отдельно).

[0966] Если не указано иное, все используемые в настоящем документе технические и научные термины имеют общепринятые значения, понятные специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Например, в словарях Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, для специалистов в данной области техники представлено общее пояснение многих терминов, использованных в раскрытии этого изобретения.

[0967] Везде, где аспекты описаны в данном документе с использованием формулировки «содержащий», в противном случае также предоставляются аналогичные аспекты, описанные терминами «состоящий из» и/или «состоящий по существу из».

[0968] Единицы, префиксы и символы обозначаются в форме, принятой в Международной системе единиц (СИ). Числовые диапазоны включают в себя числа, определяющие диапазон. При приведении диапазона значений следует понимать, что каждое промежуточное целочисленное значение и каждая его часть между указанными верхним и нижним пределами этого диапазона также конкретно раскрывается вместе с каждым поддиапазоном между такими значениями. Верхний и нижний пределы любого диапазона могут независимо включаться в этот диапазон или исключаться из него, и каждый диапазон, в который включены любой из пределов, ни один из пределов либо оба предела, также охватывается настоящим изобретением. Если значение указано явно, следует понимать, что значения, которые имеют приблизительно такое же количество или количество, как и указанное значение, также находятся в пределах объема данного изобретения. При раскрытии комбинации каждая подкомбинация элементов этой комбинации также конкретно раскрывается и находится в пределах объема данного изобретения. И наоборот, если по отдельности раскрываются различные элементы или группы элементов, также раскрываются их комбинации. Если любой элемент данного изобретения раскрывается как имеющий множество альтернатив, также в настоящем документе раскрываются примеры данного изобретение, в которых каждая альтернатива исключена по отдельности или в любой комбинации с другими альтернативами; более чем один элемент данного изобретения может иметь такие исключения, и тем самым раскрываются все комбинации элементов, имеющих такие исключения.

[0969] Нуклеотиды обозначаются их общепринятыми однобуквенными кодами.

Если не указано иное, нуклеиновые кислоты записывают слева направо в направлении от 5′ к 3′. Азотистые основания обозначаются в данном документе их общеизвестными однобуквенными символами, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Соответственно, A представляет собой аденин, C представляет собой цитозин, G представляет собой гуанин, T представляет собой тимин, U представляет собой урацил.

[0970] Аминокислоты обозначаются в настоящем документе либо своими обычно известными трехбуквенными символами, либо однобуквенными символами, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Если не указано иное, аминокислотные последовательности записываются слева направо в ориентации от амино до карбокси.

[0971] *Около:* Термин «около», используемый в связи с числовым значением во всем описании и формуле изобретения, обозначает интервал точности, известный и приемлемый для специалиста в данной области техники, такой интервал точности составляет ± 10 %.

[0972] При указании диапазонов включены конечные точки. Кроме того, если иное не указано или не очевидно из контекста и знаний специалиста в данной области техники, значения, которые выражены как диапазоны, могут принимать любое конкретное значение или поддиапазон в рамках указанных диапазонов в разных вариантах реализации изобретения, до десятой части единицы нижнего предела диапазона, если из контекста явно следует иное.

[0973] *Вводимые в комбинации:* Используемый в данном документе термин «вводимые в комбинации» или «комбинированное введение» означает, что два или более агента вводятся субъекту одновременно или с интервалом, так что может иметь место перекрытие эффекта каждого агента на пациента. В некоторых вариантах осуществления их вводят с интервалом примерно 60, 30, 15, 10, 5 или 1 минуты. В некоторых вариантах осуществления введение агентов осуществляется достаточно близко друг к другу, так что достигается комбинированный (*например,* синергический) эффект.

[0974] *Аминокислотная замена: Термин «аминокислотная замена» относится к замене аминокислотного остатка, присутствующего в исходной или эталонной последовательности (*например, последовательности CFTR дикого типа), другим аминокислотным остатком. Аминокислота может быть заменена в исходной или эталонной последовательности (например в последовательности полипептида CFTR дикого типа), например, с помощью химического пептидного синтеза или

рекомбинантных способов, известных в данной области техники. Соответственно, ссылка на «замену в положении X» относится к замене аминокислоты, присутствующей в положении X, альтернативным аминокислотным остатком. В некоторых аспектах паттерны замещения могут быть описаны в соответствии со схемой AnY, при этом A представляет собой однобуквенный код, соответствующий аминокислоте, естественно или первоначально присутствующую в положении n, и Y представляет собой замещающий аминокислотный остаток. В других аспектах паттерны замещения могут быть описаны в соответствии со схемой An(YZ), при этом A представляет собой однобуквенный код, соответствующий аминокислотному остатку, заменяющему аминокислоту, естественно или первоначально присутствующую в положении X, и Y и Z представляют собой альтернативную замену аминокислотного остатка.

[0975] В контексте данного изобретения замены (даже когда они называются аминокислотной заменой) осуществляются на уровне нуклеиновой кислоты, *т. е.* замена аминокислотного остатка альтернативным аминокислотным остатком осуществляется путем замены кодона, кодирующего первую аминокислоту кодоном, кодирующим вторую аминокислоту.

[0976] *Животное:* Используемый в данном документе термин «животное» относится к любому члену царства животных. В некоторых вариантах осуществления «животное» относится к человеку на любой стадии развития. В некоторых вариантах осуществления изобретения «животное» относится к отличным от человека животным на любой стадии развития. В определенных вариантах осуществления изобретения животное, не являющееся человеком, представляет собой млекопитающее (*например*, грызун, мышь, крысу, кролик, обезьяну, собаку, кошку, овцу, крупный рогатый скот, примат или свинью). В некоторых вариантах осуществления изобретения животные включают, но не ограничиваются ими, млекопитающих, птиц, рептилий, амфибий, рыб и червей. *В некоторых вариантах осуществления изобретения животное может быть трансгенным животным, генно-модифицированным животным или клоном.*

[0977] *Приблизительно:* В контексте данного документа термин «приблизительно» применительно к одному или большему количеству значений, представляющим интерес, относится к значению, которое аналогично установленному эталонному значению. В некоторых вариантах осуществления термин «приблизительно» относится к диапазону значений, которые попадают в пределы 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или

менее в любую сторону (больше или меньше) от установленного эталонного значения, если не указано иное или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышало бы 100 % от возможного значения).

[0978] *Связанный с:* Используемый в данном документе в отношении заболевания термин «связанный с» означает, что рассматриваемый симптом, измерение, характеристика или состояние связаны с диагнозом, развитием, наличием или прогрессированием этого заболевания. Поскольку связь может, но не обязательно, быть причинно связана с болезнью. Например, симптомы, последствия или любые эффекты, вызывающие снижение качества жизни пациента с МВ, считаются связанными с МВ, и в некоторых вариантах осуществления данного изобретения их можно лечить, облегчать или предотвращать введением полинуклеотидов по данному изобретению нуждающемуся в этом субъекту.

[0979] При использовании в отношении двух или более фрагментов термины «связанный с», «конъюгированный», «связанный», «присоединенный» и «привязанный» при использовании в отношении двух или более фрагментов означает, что фрагменты физически соединены или связаны друг с другом, или напрямую, или через один или более дополнительных фрагментов, которые служат связующим агентом, с образованием структуры, которая является достаточно стабильной, так что фрагменты остаются физически связанными в условиях, в которых используется структура, *например*, в физиологических условиях. «Связь» не обязательно должна быть строго прямой ковалентной химической связью. Это также может указывать на ионную или водородную связь или достаточно стабильную связь на основе гибридизации, так что «связанные» объекты остаются физически связанными.

[0980] *Бифункциональный:* Используемый в данном документе термин «бифункциональный» относится к любому веществу, молекуле или фрагменту, которые способны выполнять или поддерживать по меньшей мере две функции. Функции могут влиять на один и тот же результат или на другой результат. Структура, производящая функцию, может быть одинаковой или различной. Например, бифункциональные модифицированные РНК по данному изобретению могут кодировать пептид CFTR (первая функция), в то время как те нуклеозиды, которые включают кодирующую РНК, сами по себе способны продливать период полужизни РНК (вторая функция). В этом примере доставка бифункциональной модифицированной РНК субъекту, страдающему дефицитом белка, будет продуцировать не только пептидную или белковую молекулу, которая может

облегчить или вылечить заболевание или состояние, но также будет поддерживать популяционно-модифицированную РНК, присутствующую у субъекта в течение длительный период времени. В других аспектах бифункциональная модифицированная мРНК может представлять собой химерную или квимерную молекулу, содержащую, например, РНК, кодирующую пептид CFTR (первая функция), и второй белок, либо слитый с первым белком, либо совместно экспрессируемый с первым белком.

[0981] *Биосовместимый*: Используемый в данном документе термин «биосовместимый» означает совместимый с живыми клетками, тканями, органами или системами, практически не представляющий риска повреждения, токсичности или отторжения иммунной системой.

[0982] *Биоразлагаемый*: Используемый в данном документе термин «биоразлагаемый» означает способность расщепляться на безвредные продукты под действием живых организмов.

[0983] *Биологически активный*: Используемый в данном документе термин «биологически активный» относится к характеристике любого вещества, обладающего активностью в биологической системе и/или организме. Например, биологически активным считается вещество, которое при введении в организм оказывает на него биологическое действие. В конкретных вариантах осуществления полинуклеотид по данному изобретению можно считать биологически активным, если хотя бы часть полинуклеотида является биологически активной или имитирует активность, считающуюся биологически значимой.

[0984] *Химера*: Используемый в данном документе термин «химера» представляет собой соединение, имеющее две или более несовместимых или гетерогенных частей или областей. Например, химерная молекула может содержать первую часть, содержащую полипептид CFTR, и вторую часть (например, генетически слитую с первой частью), содержащую второй терапевтический белок (например, белок с отчетливой ферментативной активностью, антигенсвязывающим фрагментом, или фрагментом, способным продлить период полужизни CFTR в плазме, например, Fc-область антитела).

[0985] *Оптимизация последовательности*: Термин «оптимизация последовательности» относится к процессу или серии процессов, посредством которых азотистые основания в эталонной последовательности нуклеиновой кислоты заменяются альтернативными азотистыми основаниями, что приводит к получению последовательности нуклеиновой кислоты с улучшенными свойствами,

например, улучшенной экспрессией белка или сниженной иммуногенностью.

[0986] В общем, целью оптимизации последовательности является получение синонимичной нуклеотидной последовательности, кодирующей ту же самую полипептидную последовательность, кодируемую эталонной нуклеотидной последовательностью. Таким образом, в полипептиде, кодируемом кодон-оптимизированной нуклеотидной последовательностью, отсутствуют аминокислотные замены (в результате оптимизации кодонов) по отношению к полипептиду, кодируемому эталонной нуклеотидной последовательностью.

[0987] *Замена кодона*: Термины «замена кодона» или «замещение кодона» в контексте оптимизации последовательности относятся к замене кодона, присутствующего в эталонной последовательности нуклеиновой кислоты, другим кодоном. Кодон может быть заменен в эталонной последовательности нуклеиновой кислоты, например, с помощью химического пептидного синтеза или с помощью рекомбинантных методов, известных в данной области техники. Соответственно, ссылки на «замену» или «замещение» в определенном месте последовательности нуклеиновой кислоты (например, мРНК) или в определенной области или подпоследовательности последовательности нуклеиновой кислоты (например, мРНК) относятся к замене кодона в таком месте или области альтернативным кодоном.

[0988] Используемые в данном документе термины «кодирующая область» и «область, кодирующая» и их грамматические варианты относятся к открытой рамке считывания (ОРС) в полинуклеотиде, которая при экспрессии дает полипептид или белок.

[0989] *Соединение:* Используемый в данном документе термин «соединение» включает все стереоизомеры и изотопы изображенной структуры. Используемый в данном документе термин «стереоизомер» означает любой геометрический изомер (например, цис- и транс-изомер), энантиомер или диастереомер соединения. Данное изобретение охватывает любые и все стереоизомеры соединений, описанных в данном документе, включая стереомерно чистые формы (например, геометрически чистые, энантиомерно чистые или диастереомерно чистые) и энантиомерные и стереоизомерные смеси, например, рацематы. Энантиомерные и стереомерные смеси соединений и средства их растворения в их сложных энантиомерах или стереоизомерах хорошо известны. «Изотопы» относятся к атомам, имеющим одинаковый атомный номер, но разные массовые числа, возникающие в результате различного количества нейтронов в ядрах. Например, изотопы водорода включают

тритий и дейтерий. Кроме того, соединение, соль или комплекс по изобретению может быть получен в комбинации с растворителем или молекулами воды с образованием сольватов и гидратов посредством обычных способов.

[0990] *Приведение в контакт*: В контексте данного документа термин «приведение в контакт» означает установление физической связи между двумя или более объектами. Например, приведение в контакт клетки млекопитающего с композицией наночастиц означает, что клетка млекопитающего и наночастица достигают взаимодействия при физическом контакте. Способы приведения в контакт клеток с внешними объектами как in vivo, так и ex vivo хорошо известны в области биологии. Например, приведение композиции наночастиц в контакт с клеткой млекопитающего, находящейся внутри млекопитающего, может осуществляться различными способами введения (*например,* доставка в легкие (*например*, интраназальное, назальное или трансбуккальное введение), внутривенное, внутримышечное, внутрикожное и подкожное) и может включать различное количество композиций наночастиц. Более того, композиция наночастиц может контактировать с более чем одной клеткой млекопитающего.

[0991] *Замена консервативной аминокислоты:* «Замена консервативной аминокислоты» представляет собой замену аминокислотного остатка в белковой последовательности аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, были определены в данной области техники, включая основные боковые цепи (*например,* лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (*например,* аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (*например,* глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин или цистеин), неполярные боковые цепи (*например,* аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин или триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (*например,* треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (*например*, тирозин, фенилаланин, триптофан или гистидин). Таким образом, при замене аминокислоты в полипептиде другой аминокислотой из того же семейства боковых цепей аминокислотная замена считается консервативной. В другом аспекте последовательность аминокислот может быть консервативно заменена структурно аналогичной последовательностью, которая отличается порядком и/или составом представителей семейства боковых цепей.

[0992] *Неконсервативная аминокислотная замена*: Неконсервативные аминокислотные замены включают те, в которых (i) остаток, имеющий

электроположительную боковую цепь (*например,* Arg, His или Lys), заменен электроотрицательным остатком (*например,* Glu или Asp), (ii) гидрофильный остаток (*например,* Ser или Thr) заменен на или гидрофобным остатком (*например,* Ala, Leu, Ile, Phe или Val), (iii) цистеин или пролин заменены на или любым другим остатком, или (iv) остаток с объемной гидрофобной или ароматической боковой цепью (*например,* Val, His, Ile или Trp) заменен на или остатком с меньшей боковой цепью (*например,* Ala или Ser) или без боковой цепи (*например*, Gly).

[0993] Другие аминокислотные замены могут быть легко идентифицированы специалистами в данной области техники. Например, для аминокислоты аланина замена может быть взята из любого из D-аланина, глицина, бета-аланина, L-цистеина и D-цистеина. Для лизина заменой может быть любой из D-лизина, аргинина, D-аргинина, гомоаргинина, метионина, D-метионина, орнитина или D-орнитина. Как правило, замены в функционально важных областях, которые, как можно ожидать, будут вызывать изменения свойств выделенных полипептидов, представляют собой замены, в которых (i) полярный остаток, *например*, серин или треонин, заменен (или замещен) гидрофобным остатком, *например*, лейцином, изолейцином, фенилаланином или аланином; (ii) остаток цистеина заменен (или замещен) любым другим остатком; (iii) остаток, имеющий электроположительную боковую цепь, *например*, лизин, аргинин или гистидин, заменен (или замещен) остатком, имеющим электроотрицательную боковую цепь, *например*, глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты; или (iv) остаток, имеющий объемную боковую цепь, *например*, фенилаланин, заменен (или замещен) остатком, не имеющим такой боковой цепи, *например*, глицином. Вероятность того, что одна из вышеперечисленных неконсервативных замен может изменить функциональные свойства белка, также коррелирует с положением замены по отношению к функционально важным участкам белка: соответственно, некоторые неконсервативные замены могут оказывать незначительное влияние или совсем не влиять на биологические свойства.

[0994] *Консервативный*: В контексте настоящего документа термин «консервативный» относится к нуклеотидам или аминокислотным остаткам полинуклеотидной последовательности или полипептидной последовательности, соответственно, которые встречаются неизмененными в одном и том же положении двух или более сравниваемых последовательностей. Нуклеотиды или аминокислоты, которые являются сравнительно консервативными, представляют собой такие, которые консервативны в наиболее родственных последовательностях

по сравнению с нуклеотидами или аминокислотами, встречающимися в других местах в последовательности.

[0995] В некоторых вариантах осуществления две или более последовательности являются «полностью консервативными», если они на 100% идентичны друг другу. В некоторых вариантах изобретения две или более последовательности являются «высококонсервативными», если они на по меньшей мере 70% идентичны, по меньшей мере 80% идентичны, по меньшей мере 90% идентичны или по меньшей мере 95% идентичны друг другу. В некоторых вариантах изобретения две или более последовательности являются «высококонсервативными», если они на около 70% идентичны, около 80% идентичны, около 90% идентичны, около 95%, около 98% или около 99% идентичны друг другу. В некоторых вариантах изобретения две или более последовательности являются «консервативными», если они на по меньшей мере 30% идентичны, по меньшей мере 40% идентичны, по меньшей мере 50% идентичны, по меньшей мере 60% идентичны, по меньшей мере 70% идентичны, по меньшей мере 80% идентичны, по меньшей мере 90% идентичны или по меньшей мере 95% идентичны друг другу. В некоторых вариантах изобретения две или более последовательности являются «консервативными», если они на около 30% идентичны, около 40% идентичны, около 50% идентичны, около 60% идентичны, около 70% идентичны, около 80% идентичны, около 90% идентичны, около 95% идентичны, около 98% идентичны или около 99% идентичны друг другу. Консервативность последовательности может применяться ко всей длине полинуклеотида или полипептида или может применяться к их части, области или характеристике.

[0996] *Контролируемое высвобождение:* Используемый в данном документе термин «контролируемое высвобождение» относится к профилю высвобождения фармацевтической композиции или соединения, который соответствует определенной схеме высвобождения для достижения терапевтического результата.

[0997] *Циклический или циклизованный:* Используемый в данном документе термин «циклический» относится к наличию непрерывной петли. Циклические молекулы не обязательно должны быть круглыми, они должны быть соединены в неразрывную цепь субъединиц. Циклические молекулы, такие как сконструированные РНК или мРНК по данному изобретению, могут быть одиночными единицами или мультимерами или содержать один или несколько компонентов сложной структуры или структуры более высокого порядка.

[0998] *Цитотоксический*: Используемый в данном документе термин

«цитотоксический» относится к уничтожению или вызыванию повреждающего, токсического или смертельного действия на клетку (*например*, клетку млекопитающего (*например*, клетку человека)), бактерию, вирус, грибок, простейшее, паразита, приона, или их комбинаций.

[0999] *Доставка*: В контексте данного документа термин «доставка» означает обеспечение вещества в необходимом месте. Например, доставка полинуклеотида субъекту может включать введение субъекту композиции наночастиц, включающей полинуклеотид (например, доставка в легкие, например, интраназальное, назальное или трансбуккальное введение). В качестве другого примера, доставка полинуклеотида субъекту может включать введение субъекту композиции наночастиц, включающей полинуклеотид, *например*, внутривенным, внутримышечным, внутрикожным или подкожным способом. Введение композиции наночастиц млекопитающему или в клетку млекопитающего может включать приведение в контакт одной или нескольких клеток с композицией наночастиц.

[1000] *Средство доставки*: Используемый в данном документе термин «средство доставки» относится к любому веществу, которое облегчает, по меньшей мере частично, доставку полинуклеотида в клетки-мишени *in vivo, in vitro или ex vivo.*

[1001] *Дестабилизированный*: Используемый в данном документе термин «дестабилизированный», «дестабилизирующий» или «дестабилизирующая область» означает область или молекулу, которые менее стабильны, чем исходная, дикого типа или нативная форма той же области или молекулы.

[1002] *Диастереомер*: Используемый в данном документе термин «диастереомер» означает стереоизомеры, которые не являются зеркальными отображениями друг друга и не накладываются друг на друга.

[1003] *Расщепление*: Используемый в данном документе термин «расщепление» означает распад на более мелкие части или компоненты. Когда речь идет о полипептидах или белках, расщепление приводит к образованию пептидов.

[1004] *Дистальный*: Используемый в данном документе термин «дистальный» означает расположенный вдали от центра или вдали от интересующей точки или области.

[1005] *Домен*: В контексте данного документа термин «домен» в отношении к полипептидам относится к мотиву полипептида, имеющему одну или более идентифицируемых структурных или функциональных характеристик или свойств (например, связывающую способность, служащую в качестве сайта для белок-

белковых взаимодействий).

[1006] *Схема дозирования*: Используемый здесь термин «схема дозирования» или «схема введения доз» представляет собой график введения или определенную врачом схему лечения, профилактики или паллиативного ухода.

[1007] *Эффективное количество:* Используемый в данном документе термин «эффективное количество» агента представляет собой такое количество, которое достаточно для достижения полезных или желаемых результатов, например, клинических результатов, и, как таковое, «эффективное количество» зависит от контекста, в котором оно применяется. Например, в контексте введения агента, который лечит дефицит белка (например, дефицит CFTR), эффективное количество агента представляет собой, например, количество мРНК, экспрессирующей достаточное количество CFTR для облегчения, снижения, устранения или предотвращения симптомы, связанных с дефицитом CFTR, по сравнению с тяжестью симптомов, наблюдаемых без введения агента. Термин «эффективное количество» может использоваться взаимозаменяемо с «эффективной дозой», «терапевтически эффективным количеством» или «терапевтически эффективной дозой».

[1008] *Энантиомер*: Используемый в данном документе термин «энантиомер» означает каждую индивидуальную оптически активную форму соединения по изобретению, имеющую оптическую чистоту или энантиомерный избыток (как определено стандартными методами в данной области техники) не менее 80% (*т.е.* не менее 90% одного энантиомера и не более 10% другого энантиомера), не менее 90% или не менее 98%.

[1009] *Инкапсулировать*: Используемый в данном документе термин «инкапсулировать» означает заключать, окружать или заключать в оболочку.

[1010] *Эффективность инкапсуляции*: В контексте данного документа термин «эффективность инкапсуляции» относится к количеству полинуклеотида, которое становится частью композиции наночастиц, по отношению к начальному общему количеству полинуклеотида, используемого при приготовлении композиции наночастиц. Например, если 97 мг полинуклеотида инкапсулировано в композицию из наночастиц из общих 100 мг полинуклеотида, первоначально представленных в композиции, эффективность инкапсуляции может составлять 97%. Как используется в данном документе, «инкапсуляция» может относиться к полной, значительной или частичной капсуляции, окружению, ограничению, заключению.

[1011] *Сигнал расщепления кодируемого белка*: Используемый в данном документе

термин «сигнал расщепления кодируемого белка» относится к нуклеотидной последовательности, которая кодирует сигнал расщепления белка.

[1012] *Сконструированный*: Используемый в данном документе вариант осуществления изобретения является «сконструированным», когда он предназначен для того, чтобы иметь признак или свойство, будь то структурное или химическое, которое варьируется от исходной точки, молекулы дикого типа или нативной молекулы.

[1013] *Улучшенная доставка*: В контексте данного документа термин «усиленная доставка» означает доставку большего количества (например, по меньшей мере в 1,5 раза большего, по меньшей мере в 2 раза больше, по меньшей мере 3 раза больше, по меньшей мере в 4 раза больше, по меньшей мере в 5 раз больше, по меньшей мере в 6 раз больше, по меньшей мере в 7 раз больше, по меньшей мере в 8 раз больше, по меньшей мере в 9 раз больше, по меньшей мере в 10 раз больше) полинуклеотида посредством наночастицы в представляющую интерес целевую ткань (например, печень млекопитающего) по сравнению с уровнем доставки полинуклеотида посредством контрольной наночастицы в представляющую интерес целевую ткань (например, MC3, KC2 или DLinDMA). Уровень доставки наночастицы в конкретную ткань можно измерить, сравнивая количество белка, продуцируемого в ткани, с массой указанной ткани, сравнивая количество полинуклеотида в ткани с массой указанной ткани, сравнивая количество белка, продуцируемого в ткани, с количеством общего белка в указанной ткани, или сравнивая количество полинуклеотида в ткани с количеством общего полинуклеотида в указанной ткани. Следует понимать, что усиленную доставку наночастицы в целевую ткань не требуется определять у субъекта, подлежащего лечению, ее можно определить в суррогате, таком как животная модель (например, крысиная модель).

[1014] *Экзосома*: Используемый в данном документе термин «экзосома» представляет собой везикулу, секретируемую клетками млекопитающих, или комплекс, участвующий в расщеплении РНК.

[1015] *Экспрессия*: Используемый в данном документе термин «экспрессия» последовательности нуклеиновой кислоты относится к одному или нескольким из следующих событий: (1) получение матрицы мРНК из последовательности ДНК (*например*, путем транскрипции); (2) процессинг транскрипта мРНК (*например,* путем сплайсинга, редактирования, формирования 5'-кэпа и/или процессинга 3'-конца); (3) трансляция мРНК в полипептид или белок; и (4) посттрансляционная модификация полипептида или белка.

[1016] *Ex Vivo*: В контексте данного документа термин «ex vivo» относится к явлениям, которые происходят вне организма (*например*, животного, растения или микроба, или их клетки или ткани). Явления ex vivo могут происходить в среде, минимально отличающейся от природной (*например*, in vivo) среды.

[1017] *Признак:* Используемый в данном документе термин «признак» относится к характеристике, свойству или отличительному элементу. Когда речь идет о полипептидах, «признаки» определяются как отдельные компоненты молекулы, основанные на аминокислотной последовательности. Признаки полипептидов, кодируемых полинуклеотидами по данному изобретения включают проявления на поверхности, локальную конформационную форму, складки, петли, полупетли, домены, полудомены, сайты, концы или любую их комбинацию.

[1018] *Состав*: Используемый в данном документе термин «состав» включает по меньшей мере полинуклеотид и один или несколько из носителя, эксципиента и средства доставки.

[1019] *Фрагмент:* Термин «фрагмент», как используется в данном документе, относится к части. Например, фрагменты белков могут включать полипептиды, полученные расщеплением полноразмерного белка, выделенного из культивируемых клеток. В некоторых вариантах осуществления фрагмент представляет собой подпоследовательность полноразмерного белка (например, CFTR), в которой удалены N-концевые, и/или С-концевые, и/или внутренние подпоследовательности. В некоторых предпочтительных аспектах данного изобретения фрагменты белка по данному изобретению представляют собой функциональные фрагменты.

[1020] *Функциональный*: В контексте данного документа «функциональная» биологическая молекула представляет собой биологическую молекулу в форме, в которой она проявляет свойство и/или активность, которыми она характеризуется. Таким образом, функциональный фрагмент полинуклеотида по данному изобретению представляет собой полинуклеотид, способный экспрессировать функциональный фрагмент CFTR. Используемый в данном документе термин «функциональный фрагмент CFTR» относится к фрагменту CFTR дикого типа (т. е. к фрагменту любой из его встречающихся в природе изоформ) или к его мутанту или варианту, где фрагмент сохраняет по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15 %, по меньшей мере около 20 %, по меньшей мере около 25 %, по меньшей мере около 30 %, по меньшей мере около 35 %, по меньшей мере около 40 %, по меньшей мере около 45 %, по меньшей мере около 50 %, по меньшей мере около 55

%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90% или по меньшей мере около 95% биологической активности соответствующего полноразмерного белка.

[1021] *Заболевание, связанное с CFTR:* Используемые в данном документе термины «заболевание, связанное с CFTR » или «расстройство, связанное с CFTR » относятся к заболеваниям или расстройствам, соответственно, которые возникают в результате аберрантной активности CFTR (например, снижении активности или повышении активности). В качестве неограничивающего примера МВ представляет собой заболевание, связанное с CFTR. В данной области техники известны многочисленные клинические варианты МВ. См., например, www.omim.org/entry/219700.

[1022] Термины «ферментативная активность CFTR» и «активность CFTR» используются взаимозаменяемо в данном описании и относятся к способности CFTR транспортировать ионы хлора через клеточную мембрану. Соответственно, фрагмент или вариант, сохраняющий или обладающий ферментативной активностью CFTR или активностью CFTR, относится к фрагменту или варианту, который имеет измеримый перенос хлоридов через клеточную мембрану.

[1023] *Вспомогательный липид*: Используемый в данном документе термин «вспомогательный липид» относится к соединению или молекуле, которая включает липидный фрагмент (для введения в липидный слой, например, липидный бислой) и полярный фрагмент (для взаимодействия с физиологическим раствором на поверхности липидного слоя). Обычно вспомогательный липид представляет собой фосфолипид. Функция вспомогательного липида заключается в «дополнении» аминолипида и повышении фузогенности бислоя и/или облегчении выхода из эндосомы, например, нуклеиновой кислоты, доставленной в клетки. Вспомогательные липиды также считаются ключевым структурным компонентом поверхности ЛНЧ.

[1024] *Гомология*: Используемый в данном документе термин «гомология» относится к общему сродству между полимерными молекулами, *т.е.* между молекулами нуклеиновых кислот (*например,* молекулами ДНК и/или молекулами РНК) и/или между молекулами полипептидов. Обычно термин «гомология» подразумевает эволюционные отношения между двумя молекулами. Таким образом, две гомологичные молекулы будут иметь общего эволюционного предка. В контексте данного изобретения термин «гомология» охватывает как идентичность,

так и сходство.

[1025] В некоторых вариантах изобретения полимерные молекулы считаются «гомологичными» друг другу, если по меньшей мере 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% мономеров в молекуле являются идентичными (точно такой же мономер) или подобными (консервативные замены). Термин «гомологичный» обязательно относится к сравнению по меньшей мере двух последовательностей (полинуклеотидных или полипептидных последовательностей).

[1026] *Идентичность*: В контексте настоящего документа термин «идентичность» относится к общей консервативности мономера между полимерными молекулами, *например*, между молекулами полинуклеотидов (*например,* молекулами ДНК и/или молекулами РНК) и/или между молекулами полипептидов. Например, вычисление процентной идентичности двух полинуклеотидных последовательностей может быть выполнено путем выравнивания двух последовательностей с целью оптимального сравнения (*например*, гэпы могут быть введены в одну или обе из первой и второй последовательностей нуклеиновых кислот для оптимального выравнивания и неидентичные последовательности могут игнорироваться с целью сравнения). В определенных вариантах осуществления 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 % длины эталонной последовательности. Затем сравнивают нуклеотиды в соответствующих положениях нуклеотидов. Когда положение в первой последовательности занято тем же нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы в этом положении идентичны. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией от числа совпадающих положений в последовательностях с учетом числа гэпов и длины каждого гэпа, которые необходимо вносить для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно осуществлять с помощью математического алгоритма. При сравнении ДНК и РНК тимин (T) и урацил (U) могут считаться эквивалентными.

[1027] Подходящие программы из системы программного обеспечения доступны из различных источников и предназначены для выравнивания как белковых, так и нуклеотидных последовательностей. Одной подходящей программой для

определения процента идентичности последовательностей является bl2seq, часть набора программ BLAST, доступная на веб-сайте BLAST Национального центра биотехнологической информации правительства США (blast.ncbi.nlm.nih.gov). Bl2seq выполняет сравнение между двумя последовательностями, применяя либо алгоритм BLASTN, либо алгоритм BLASTP. BLASTN применяют для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот, тогда как BLASTP применяют для сравнения аминокислотных последовательностей. Другими подходящими программами являются, например, Needle, Stretcher, Water или Matcher, часть пакета программ биоинформатики EMBOSS, которые также доступны в Европейском институте биоинформатики (EBI) по адресу www.ebi.ac.uk/Tools/psa.

[1028] Выравнивание последовательностей можно проводить с использованием способов, известных в данной области техники, таких как MAFFT, Clustal (ClustalW, Clustal X или Clustal Omega), MUSCLE и т.д.

[1029] Каждая из различных областей в одной целевой полинуклеотидной или полипептидной последовательности, выравниваемой с эталонной полинуклеотидной или полипептидной последовательностью, может обладать собственной процентной идентичностью последовательностей. Отмечают, что процентное значение идентичности последовательности округляют до ближайшей десятой. Например, 80,11, 80,12, 80,13 и 80,14 округляются до 80,1, а 80,15, 80,16, 80,17, 80,18 и 80,19 округляются до 80,2. Также следует отметить, что значение длины всегда будет представлять собой целое число.

[1030] В определенных аспектах процент идентичности (% ID) первой аминокислотной последовательности (или последовательности нуклеиновой кислоты) со второй аминокислотной последовательностью (или последовательностью нуклеиновой кислоты) рассчитывается как % ID = 100 x (Y/Z), где Y представляет собой количество аминокислотных остатков (или азотистых оснований), оцененных как идентичные совпадения при выравнивании первой и второй последовательностей (при выравнивании путем визуального осмотра или конкретной программы выравнивания последовательностей), а Z представляет собой общее количество остатков во второй последовательности. Если длина первой последовательности больше, чем длина второй последовательности, процент идентичности первой последовательности со второй последовательностью будет выше, чем процент идентичности второй последовательности с первой последовательностью.

[1031] Специалисту в данной области техники будет понятно, что построение

выравнивания последовательностей для расчета процента идентичности последовательностей не ограничивается бинарным сравнением двух последовательностей, обусловленным исключительно первичными данными о последовательностях. Также будет понятно, что выравнивания последовательностей могут быть получены путем интеграции данных последовательностей с данными из гетерогенных источников, таких как структурные данные (например, кристаллографические структуры белков), функциональные данные (например, местоположение мутаций) или филогенетические данные. Подходящей программой, которая объединяет разнородные данные для получения множественного выравнивания последовательностей, является T-Coffee, доступная на сайте www.tcoffee.org или в качестве альтернативы доступная, например, в EBI. Также будет понятно, что окончательное выравнивание, используемое для расчета процента идентичности последовательностей, может быть проведено автоматически или вручную.

[1032] *Иммунный ответ:* Термин «иммунный ответ» относится к действию, например, лимфоцитов, антигенпрезентирующих клеток, фагоцитирующих клеток, гранулоцитов и растворимых макромолекул, продуцируемых указанными выше клетками или печенью (включая антитела, цитокины и комплемент), что приводит к избирательному повреждению, разрушению или элиминации из организма человека вторгшихся патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых клеток или, в случаях аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей человека. В некоторых случаях введение наночастицы, содержащей липидный компонент и инкапсулированный терапевтический агент, может вызвать иммунный ответ, который может быть вызван (i) инкапсулированным терапевтическим агентом (например, мРНК), (ii) продуктом экспрессии таким инкапсулированным терапевтическим агентом (например, полипептидом, кодируемым мРНК), (iii) липидным компонентом наночастицы или (iv) их комбинацией.

[1033] *Воспалительная реакция*: «Воспалительная реакция» относится к иммунным реакциям с участием специфических и неспецифических защитных систем. Реакция специфической защитной системы – это реакция специфической иммунной системы на антиген. Примеры реакций специфических защитных систем включают ответы антител. Реакция неспецифической защитной системы представляет собой воспалительную реакцию, опосредованную лейкоцитами, обычно неспособными к иммунологической памяти, например, макрофагами, эозинофилами и

нейтрофилами. В некоторых аспектах иммунный ответ включает секрецию воспалительных цитокинов, что приводит к повышенным уровням воспалительных цитокинов.

[1034] *Воспалительные цитокины*: Термин «воспалительный цитокин» относится к цитокинам, уровень которых повышается при воспалительной реакции. Примеры воспалительных цитокинов включают интерлейкин-6 (IL-6), CXCL1 (лиганд 1 хемокина (мотив C-X-C); также известный как GROα, интерферон-γ (IFNγ), фактор некроза опухоли α (TNFα), интерферон γ-индуцированный белок 10 (IP-10) или гранулоцитарно-колониестимулирующий фактор (G-CSF). Термин «воспалительные цитокины» включает также другие цитокины, связанные с воспалительными реакциями, известные в данной области техники, например, интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-8 (IL-8), интерлейкин-12 (IL-12), интерлейкин-13 (Il-13), интерферон α (IFN-α) и др.

[1035] *In Vitro*: В контексте данного документа термин «in vitro» относится к явлениям, которые происходят в искусственной среде, например, в пробирке для испытаний или реакционном сосуде, в клеточной культуре, в чашке Петри и т. д., а не в организме (например, животном, растении или микроорганизме).

[1036] *In Vivo:* В контексте данного документа термин «in vivo» относится к явлениям, которые происходят в организме (например, животном, растении или микроорганизме, или их клетке или ткани).

[1037] *Варианты с инсерцией и делецией:* «Варианты с инсерцией» применительно к полипептидам представляют собой те, в которых одна или несколько аминокислот встроены непосредственно рядом с аминокислотой в определенном положении в нативной или исходной последовательности. «Непосредственно рядом» с аминокислотой означает связанный либо с альфа-карбоксильной, либо с альфа-амино функциональной группой аминокислоты. «Варианты с делецией» применительно к полипептидам представляют собой варианты, в которых удалена одна или несколько аминокислот в нативной или исходной аминокислотной последовательности. Обычно варианты с делецией содержат одну или более аминокислот, удаленных в определенной области молекулы.

[1038] *Интактный*: Используемый в данном документе в контексте полипептида термин «интактный» означает сохранение аминокислоты, соответствующей белку дикого типа, *например,* отсутствие мутации или замены аминокислоты дикого типа. И наоборот, в контексте нуклеиновой кислоты термин «интактный» означает сохранение нуклеинового основания, соответствующего нуклеиновой кислоте

дикого типа, например, отсутствие мутации или замены нуклеинового основания дикого типа.

[1039] *Ионизируемый аминолипид*: Термин «ионизируемый аминолипид» включает липиды, имеющие одну, две, три или более жирных кислот или жирных алкильных цепей и pH-титруемую аминогруппу (например, алкиламино- или диалкиламино-головную группу). Ионизируемый аминолипид обычно протонирован (т.е. положительно заряжен) при pH ниже pKa амино-головной группы и по существу не заряжен при pH выше pKa. Такие ионизируемые аминолипиды включают, помимо прочего, DLin-MC3-DMA (MC3) и (13Z,165Z)-N,N-диметил-3-нонидокоза-13-16-диен-1-амин (L608).

[1040] *Выделенный*: Используемый в данном документе термин «выделенный» относится к веществу или объекту, которые были отделены по меньшей мере от некоторых компонентов, с которыми оно было связано (будь то в природе или в экспериментальных условиях). Выделенные вещества (*например*, полинуклеотиды или полипептиды) могут иметь различные уровни чистоты по отношению к веществам, из которых они были выделены. Выделенные вещества и/или объекты могут быть отделены по меньшей мере от около 10 %, около 20 %, около 30 %, около 40 %, около 50 %, около 60 %, около 70 %, около 80 %, около 90 % или более из других компонентов, с которыми они были изначально связаны. В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенные вещества составляют более около 80 %, около 85 %, около 90 %, около 91 %, около 92 %, около 93 %, около 94 %, около 95 %, около 96 %, около 97 %, около 98 %, около 99 % или более около 99 % чистоты. Как используется в данном документе, вещество является «чистым», если оно по существу не содержит других компонентов.

[1041] *По существу выделенный*: Под термином «по существу выделенный» подразумевается, что соединение по меньшей мере частично или по существу отделено от окружающей среды, в которой оно было образовано или обнаружено. Частичное разделение может включать, например, композицию, обогащенную соединением по данному изобретению. Существенное разделение может включать композиции, содержащие по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 97% или по меньшей мере около 99% по массе соединения по данному изобретению или его солей.

[1042] Полинуклеотид, вектор, полипептид, клетка или любая композиция, описанные в данном документе, которые являются «выделенными», представляют

собой полинуклеотид, вектор, полипептид, клетку или композицию, которые находятся в форме, не встречающейся в природе. Выделенные полинуклеотиды, векторы, полипептиды или композиции включают те, которые были очищены до такой степени, что они больше не находятся в форме, в которой они встречаются в природе. В некоторых аспектах выделенный полинуклеотид, вектор, полипептид или композиция является по существу чистым.

[1043] *Изомер:* Используемый в данном документе термин «изомер» означает любой таутомер, стереоизомер, энантиомер или диастереомер любого соединения по изобретению. Признано, что соединения по изобретению могут иметь один или несколько хиральных центров и/или двойных связей и, следовательно, существовать в виде стереоизомеров, таких как изомеры с двойной связью (*т.е.* геометрические изомеры E/Z) или диастереомеры (*например,* энантиомеры (*т.е.* (+) или (-)) или цис/транс изомеры). Согласно данному изобретению химические структуры, изображенные в данном документе, и, следовательно, соединения по данному изобретению, охватывают все соответствующие стереоизомеры, то есть как стереомерно чистую форму (*например,* геометрически чистую, энантиомерно чистую или диастереомерно чистую), так и энантиомерные и стереоизомерные смеси, *например,* рацематы. Энантиомерные и стереоизомерные смеси соединений по данному изобретению обычно можно разделить на составляющие их энантиомеры или стереоизомеры с помощью хорошо известных методов, таких как хирально-фазовая газовая хроматография, хирально-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография, кристаллизация соединения в виде хирального солевого комплекса, или кристаллизации соединения в хиральном растворителе. Энантиомеры и стереоизомеры также могут быть получены из стереомерно или энантиомерно чистых промежуточных продуктов, реагентов и катализаторов хорошо известными методами асимметричного синтеза.

[1044] *Линкер*: Используемый в данном документе термин «линкер» относится к группе атомов, например, 10-1000 атомов, и может состоять из атомов или групп, таких как, помимо прочего, углерод, амино, алкиламино, кислород, сера, сульфоксид, сульфонил, карбонил и имин. Линкер может быть присоединен к модифицированному нуклеозиду или нуклеотиду на азотистом основании или фрагменте сахара на первом конце и к полезной нагрузке, например, обнаруживаемому или терапевтическому агенту, на втором конце. Линкер может иметь достаточную длину, чтобы не мешать включению в последовательность нуклеиновой кислоты. Линкер можно использовать для любой полезной цели, такой

как образование мультимеров полинуклеотидов (например, путем связывания двух или более молекул химерных полинуклеотидов или полинуклеотидов IVT) или конъюгатов полинуклеотидов, а также для введения полезной нагрузки, как описано в данном документе. Примеры химических групп, которые могут быть включены в линкер, включают, помимо прочего, алкил, алкенил, алкинил, амидо, аминогруппу, простой эфир, тиоэфир, сложный эфир, алкилен, гетероалкилен, арил или гетероциклил, каждая из которых может быть необязательно заменена, как описано в данном документе. Примеры линкеров включают, помимо прочего, ненасыщенные алканы, полиэтиленгликоли (например, мономерные звенья этилена или пропиленгликоля, например, диэтиленгликоль, дипропиленгликоль, триэтиленгликоль, трипропиленгликоль, тетраэтиленгликоль или тетраэтиленгликоль) и полимеры декстрана и их производные. Другие примеры включают, помимо прочего, расщепляемые фрагменты внутри линкера, такие как, например, дисульфидная связь (-S-S-) или азосвязь (-N=N-), которые могут расщепляться с помощью восстановителя или фотолиза. Неограничивающие примеры селективно расщепляемой связи включают амидную связь, которая может быть расщеплена, например, с использованием трис(2-карбоксиэтил)фосфина (TCEP) или других восстановителей и/или фотолиза, а также сложноэфирную связь, которая может быть расщеплена, например, кислотным или основным гидролизом.

[1045] *Способы введения*: Используемый в данном документе термин «способы введения» может включать доставку в легкие (*например*, интраназальную, назальную, трансбуккальную), внутривенную, внутримышечную, внутрикожную, подкожную или другие способы доставки композиции субъекту. Способ введения может быть выбран для целевой доставки (*например*, для конкретной доставки) в конкретную область или систему организма.

[1046] *Модифицированный*: Используемый в данном документе термин «модифицированный» относится к измененному состоянию или структуре молекулы по изобретению. Молекулы можно модифицировать разными способами, в том числе химически, структурно и функционально. В некоторых вариантах осуществления молекулы мРНК по данному изобретению модифицированы введением неприродных нуклеозидов и/или нуклеотидов, *например,* поскольку они относятся к природным рибонуклеотидам A, U, G и C. Неканонические нуклеотиды, такие как кэп-структуры, не считаются «модифицированными», хотя они отличаются от химической структуры рибонуклеотидов A, C, G, U.

[1047] *Слизь*: Используемый в данном документе термин «слизь» относится к

природному веществу, которое является вязким и содержит гликопротеины муцина.

[1048] *Композиция наночастиц*: В контексте данного документа «композиция наночастиц» представляет собой композицию, содержащую один или более липидов. Композиции наночастиц обычно имеют размер порядка микрометров или меньше и могут включать липидный бислой. Композиции наночастиц охватывают липидные наночастицы (ЛНЧ), липосомы (*например*, липидные везикулы) и липоплексы. Например, композиция наночастиц может представлять собой липосому, имеющую липидный бислой диаметром 500 нм или менее.

[1049] *Встречающийся в природе*: В контексте данного документа «встречающийся в природе» означает существующий в природе без помощи извне.

[1050] *Позвоночное животное, отличное от человека*: Используемый в данном документе термин «позвоночное животное, отличное от человека» включает всех позвоночных, кроме *Homo sapiens*, включая дикие и одомашненные виды. Примеры позвоночных животных, отличных от человека, включают, помимо прочего, млекопитающих, таких как альпака, бантенг, бизон, верблюд, кошка, крупный рогатый скот, олень, собака, осел, гаял, коза, морская свинка, лошадь, лама, мул, свинья , кролик, северный олень, овца, буйвол и як.

[1051] *Последовательность нуклеиновой кислоты*: Термины «последовательность нуклеиновой кислоты», «последовательность нуклеотидов» или «последовательность полинуклеотидов» используются взаимозаменяемо и относятся к непрерывной последовательности нуклеиновой кислоты. Последовательность может представлять собой либо одноцепочечную, либо двухцепочечную ДНК или РНК, *например,* мРНК.

[1052] Термин «нуклеиновая кислота» в самом широком смысле включает любое соединение и/или вещество, которое содержит полимер нуклеотидов. Эти полимеры часто называют «полинуклеотидами». Примеры нуклеиновых кислот или полинуклеотидов по изобретению включают, помимо прочего, рибонуклеиновые кислоты (РНК), дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), треозо-нуклеиновая кислота (ТНК), гликоль-нуклеиновые кислоты (ГНК), пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК), закрытые нуклеиновые кислоты (ЗНК, включая ЗНК, имеющую β-D-рибо-конфигурацию, α-ЗНК, имеющую α-L-рибо-конфигурацию (диастереомер ЗНК), 2′-амино-ЗНК, имеющую 2′-аминофункционализацию, и 2′-амино-α-ЗНК, имеющую 2'-аминофункционализацию), этиленовые нуклеиновые кислоты (ЭНК), циклогексенильные нуклеиновые кислоты (ЦНК) или гибриды, или их комбинации.

[1053] Фраза «кодирующая нуклеотидная последовательность» относится к

нуклеиновой кислоте, кодирующей последовательность, (*например*, молекулу мРНК или ДНК), которая кодирует полипептид. Кодирующая последовательность может дополнительно содержать сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регуляторными элементами, включая промотор и сигнал полиаденилирования, способными управлять экспрессией в клетках индивида или млекопитающего, которым вводят нуклеиновую кислоту. Кодирующая последовательность может дополнительно содержать последовательности, которые кодируют сигнальные пептиды.

[1054] *Нецелевой*: Используемый в данном документе термин «нецелевой» относится к любому непреднамеренному воздействию на любую одну или несколько мишеней, генов или клеточных транскриптов.

[1055] *Открытая рамка считывания*: Используемый в данном документе термин «открытая рамка считывания» или «ОРС» относится к последовательности, которая не содержит стоп-кодона в данной рамке считывания.

[1056] *Функционально связанные*: Используемая в данном документе фраза «функционально связанные» относится к функциональной связи между двумя или более молекулами, конструкциями, транскриптами, веществами, фрагментами и т.п.

[1057] *Необязательно замещенный*: В данном документе фраза в виде «необязательно замещенный X» (*например*, необязательно замещенный алкил) эквивалента фразе «X, где X необязательно замещен» (*например*, «алкил, где указанный алкил необязательно замещен») . Это не означает, что признак «X» (*например*, алкил) *сам по себе* является необязательным.

[1058] *Часть*: Используемый в данном документе термин «часть» или «область» полинуклеотида определяется как любая часть полинуклеотида, длина которой меньше полной длины полинуклеотида.

[1059] *Пациент*: В контексте данного документа термин «пациент» относится к субъекту, который может болеть или нуждаться в лечении, требовать лечение, получать лечение, будет получать лечение, или субъекту, который находится под наблюдением квалифицированного специалиста в отношении конкретного заболевания или патологического состояния. В некоторых вариантах осуществления лечение необходимо, требуется или проводится для предотвращения или снижения риска развития острого заболевания, то есть это профилактическое лечение.

[1060] *Фармацевтически приемлемый*: Выражение «фармацевтически приемлемый» используется в данном документе для обозначения тех соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые с медицинской точки

зрения являются подходящими для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерных токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соразмерно разумному соотношению польза/риск.

[1061] *Фармацевтически приемлемый эксципиент*: Фраза «фармацевтически приемлемый эксципиент», используемая в данном документе, относится к любому ингредиенту, отличному от соединений, описанных в данном документе (например, носитель, способный суспендировать или растворять активное соединение) и имеющему свойства не вызывать токсичности и воспалительного эффекта для пациента. Наполнители могут включать, например, следующее: антиадгезивы, антиоксиданты, связывающие вещества, покрытия, добавки для прессования, разрыхлители, красящие вещества (красители), мягчительные средства, эмульгаторы, наполнители (разбавители), пленкообразователи или покрытия, вкусоароматические добавки, ароматизаторы, вещества, способствующие скольжению (усилители сыпучести), смазывающие вещества, консерванты, печатные краски, сорбенты, суспендирующие или диспергирующие средства, подсластители и гидратационную воду. Иллюстративные наполнители включают, без ограничения, следующие: бутилированный гидрокситолуол (BHT), карбонат кальция, фосфат кальция (двухосновный), стеарат кальция, кросскармелозу, сшитый поливинилпирролидон, лимонную кислоту, кросповидон, цистеин, этилцеллюлозу, желат,ин, гидроксипропилцеллюлозу гидроксипропилметилцеллюлозу, лактозу, стеарат магния, мальтит, маннит, метионин, метилцеллюлозу, метилпарабен, микрокристаллическую целлюлозу, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, повидон, прежелатинизированный крахмал, пропилпарабен, ретинилпальмитат, шеллак, диоксид кремния, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, цитрат натрия, натрий-гликолят крахмала, сорбит, крахмал (кукурузный), стеариновую кислоту, сахарозу, тальк, диоксид титана, витамин А, витамин Е, витамин С и ксилит.

[1062] *Фармацевтически приемлемые соли*: Данное изобретение также включает фармацевтически приемлемые соли, описанных в данном документе соединений. Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемые соли» относится к производным раскрытых соединений, в которых исходное соединение модифицировано путем преобразования существующего кислотного или основного фрагмента в его солевую форму (*например*, путем взаимодействия группы свободного основания с подходящей органической кислотой). Примеры фармацевтически приемлемых солей включают, но не ограничиваются ими, соли минеральных или органических кислот основных остатков, таких как амины;

щелочные или органические соли кислотных остатков, таких как карбоновые кислоты; и тому подобное. Репрезентативные кислотно-аддитивные соли включают ацетат, уксусную кислоту, адипинат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензолсульфоновую кислоту, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанепропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидробромид, гидрохлорид, гидроиодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, толуолсульфонат, ундеканоат, валерианат и тому подобное. Репрезентативные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают соли натрия, лития, калия, кальция, магния и тому подобное, а также нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, включая, но не ограничиваясь этим, аммоний, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, метиламин, диметиламин, триметиламин, триэтиламин, этиламин и тому подобное. Фармацевтически приемлемые соли по данному изобретению включают обычные нетоксичные соли исходного соединения, образованные, например, из нетоксичных неорганических или органических кислот. Фармацевтически приемлемые соли по данному изобретению могут быть синтезированы из исходного соединения, которое содержит основной или кислотный фрагмент, обычными химическими способами. Как правило, такие соли могут быть получены реакцией форм свободной кислоты или основания этих соединений со стехиометрическим количеством соответствующего основания или кислоты в воде или в органическом растворителе, или в их смеси; обычно используются неводные среды, такие как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил. Перечни подходящих 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 полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[1063] *Фармацевтически приемлемый сольват*. Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый сольват» означает соединение по изобретению, в котором молекулы подходящего растворителя включены в кристаллическую решетку. Подходящий растворитель является физиологически

переносимым при вводимой дозе. Например, сольваты могут быть получены путем кристаллизации, перекристаллизации или осаждения из раствора, который включает органические растворители, воду или их смесь. Примерами подходящих растворителей являются этанол, вода (например, моно-, ди- и тригидраты), *N*-метилпирролидинон (NMP), диметилсульфоксид (DMSO), *N,N'*-диметилформамид (DMF), *N,N'*-диметилацетамид (DMAC), 1,3-диметил-2-имидазолидинон (DMEU), 1,3-диметил-3,4,5,6-тетрагидро-2-(1H)-пиримидинон (DMPU), ацетонитрил (ACN), пропиленгликоль, этилацетат, бензиловый спирт, 2-пирролидон, бензилбензоат и т.п. Когда растворителем является вода, сольват называют «гидратом».

[1064] *Фармакокинетика*: Используемый в данном документе термин «фармакокинетика» относится к любому одному или нескольким свойствам молекулы или соединения, связанным с определением судьбы веществ, вводимых в живой организм. Фармакокинетика подразделяется на несколько областей, включая степень и скорость всасывания, распределения, метаболизма и выведения. Это обычно называют ADME, где: (A) Абсорбция – это процесс поступления вещества в кровоток; (D) Распределение – это рассеивание или распространение веществ по жидкостям и тканям тела; (M) Метаболизм (или биотрансформация) – это необратимое превращение исходных соединений в дочерние метаболиты; и (E) Экскреция (или Элиминация) относится к выведению веществ из организма. В редких случаях некоторые препараты необратимо накапливаются в тканях организма.

[1065] *Физико-химический:* Используемый в данном документе термин «физико-химический» означает или относится к физическому и/или химическому свойству.

[1066] *Полинуклеотид:* В контексте настоящего документа термин «полинуклеотид» относится к полимерам нуклеотидов любой длины, включая рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды, их аналоги или их смеси. Этот термин относится к первичной структуре молекулы. Таким образом, термин включает в себя трех-, двух- и одноцепочечную дезоксирибонуклеиновую кислоту («ДНК»), а также трех-, двух- и одноцепочечную рибонуклеиновую кислоту («РНК»). Он также включает в себя модифицированные, например, путем алкилирования и/или кэппирования, и немодифицированные формы полинуклеотида. Более конкретно, термин «полинуклеотид» включает в себя полидезоксирибонуклеотиды (содержащие 2-дезокси-D-рибозу), полирибонуклеотиды (содержащие D-рибозу), включая тРНК, рРНК, гРНК, миРНК и мРНК, сплайсированные или несплайсированные, любой другой тип полинуклеотида, который представляет

собой N- или C-гликозид пуринового или пиримидинового основания, и другие полимеры, содержащие ненуклеотидные остовы, например, полиамид (*например,* пептидные нуклеиновые кислоты «ПНК») и полиморфолиновые полимеры, а также другие синтетические полимеры нуклеиновых кислот, специфичные для последовательности, при условии, что полимеры содержат нуклеиновые основания в конфигурации, которая допускает спаривание оснований и стэкинг оснований, как, например, в ДНК и РНК. В конкретных аспектах полинуклеотид содержит мРНК. В другом аспекте мРНК представляет собой синтетическую мРНК. В некоторых аспектах синтетическая мРНК содержит по меньшей мере одно неприродное нуклеиновое основание. В некоторых аспектах все нуклеиновые основания определенного класса заменены неприродными нуклеиновыми основаниями (*например,* все уридины в полинуклеотиде, описанном в настоящем документе, могут быть заменены неприродным нуклеиновым основанием, *например,* 5-метоксиуридином). В некоторых аспектах полинуклеотид (*например,* синтетическая РНК или синтетическая ДНК) содержит только природные азотистые основания, *т. е.* A (аденозин), G (гуанозин), C (цитидин) и T (тимидин) в случае синтетического ДНК или A, C, G и U (уридин) в случае синтетической РНК.

[1067] Специалисту в данной области техники будет понятно, что T-основания в описанных в данном документе картах кодонов присутствуют в ДНК, тогда как T-основания будут заменены на U-основания в соответствующих РНК. Например, кодон-оптимизированная нуклеотидная последовательность, описанная в данном документе, в форме ДНК, *например*, вектора или матрицы для трансляции in vitro (IVT), должна иметь свои T-основания, транскрибированные как U на основе соответствующей транскрибируемой мРНК. В этом отношении как кодон-оптимизированные последовательности ДНК (включающие T), так и соответствующие им последовательности мРНК (включающие U) считаются кодон-оптимизированными нуклеотидными последовательностями по данному изобретению. Специалисту в данной области техники будет понятно, что эквивалентные карты кодонов могут быть созданы путем замены одного или нескольких оснований неприродными основаниями. Таким образом, *например*, кодон TTC (карта ДНК) будет соответствовать кодону UUC (карта РНК), который, в свою очередь, будет соответствовать кодону ΨΨC (карта РНК, в которой U заменен псевдоуридином).

[1068] Стандартные пары оснований A-T и G-C образуются в условиях, которые позволяют образование водородных связей между N3-H и C4-окси тимидина и N1 и

C6-NH2, соответственно, аденозина, а также между C2-окси, N3 и C4-NH2 цитидина и C2-NH2, N'-H и C6-окси, соответственно, гуанозина. Так, например, гуанозин (2-амино-6-окси-9-β-D-рибофуранозилпурин) может быть модифицирован с образованием изогуанозина (2-окси-6-амино-9-β-D-рибофуранозилпурина). Такая модификация приводит к нуклеозидному основанию, которое больше не будет эффективно образовывать стандартную пару оснований с цитозином. Однако модификация цитозина (1-β-D-рибофуранозил-2-окси-4-аминопиримидин) с образованием изоцитозина (1-β-D-рибофуранозил-2-амино-4-оксипиримидин-) приводит к модифицированному нуклеотиду, который не образует эффективную пару оснований с гуанозином, но образует пару оснований с изогуанозином (патент США № 5681702, выданный Collins et al.). Изоцитозин доступен от Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.); изоцитидин можно получить способом, описанным по Switzer et al. (1993) Biochemistry 32:10489-10496 и цитируемыми в нем ссылками; 2'-дезокси-5-метилизоцитидин можно получить по методу Tor et al., 1993, J. Am. Chem. Soc. 115:4461-4467 и цитируемыми в нем ссылками; и изогуаниновые нуклеотиды могут быть получены с использованием метода, описанного в Switzer et al., 1993, см. выше, и Mantsch et al., 1993, Biochem. 14:5593-5601, или способом, описанным в патенте США № 5780610, выданным Collins et al. Другие неприродные пары оснований могут быть синтезированы методом, описанным в Piccirilli et al., 1990, Nature 343:33-37, для синтеза 2,6-диаминопиримидина и его комплемента (1-метилпиразоло-[4,3]пиримидин- 5,7-(4H,6H)-дион. Известны другие такие модифицированные нуклеотидные единицы, которые образуют уникальные пары оснований, такие как описанные в Leach et al. (1992) J. Am. Chem. Soc. 114:3675-3683 and Switzer et al., см. выше.

[1069] *Полипептид:* Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются в даггом документе взаимозаменяемо для обозначения аминокислотных полимеров любой длины. Полимер может содержать модифицированные аминокислоты. Кроме того, указанные термины включают аминокислотный полимер, который был модифицирован природным путем или путем вмешательства; например, образованием дисульфидных связей, гликозилированием, липидацией, ацетилированием, фосфорилированием или любыми другими манипуляциями или модификациями, такие как конъюгация с меченым компонентом. Также в определение включены, например, полипептиды, содержащие один или несколько аминокислотных аналогов (включая, например, неприродные аминокислоты, такие как гомоцистеин, орнитин, p-ацетилфенилаланин, D-аминокислоты и креатин), а

также другие модификации, известные в данной области техники.

[1070] Термин в контексте данного документа относится к белкам, полипептидам и пептидам любого размера, структуры или функции. Полипептиды включают в себя продукты кодированного полинуклеотида, встречающиеся в природе полипептиды, синтетические полипептиды, гомологи, ортологи, паралоги, фрагменты и другие эквиваленты, варианты и аналоги вышеперечисленного.Полипептид может представлять собой мономер или может представлять собой многомолекулярный комплекс, такой как димер, тример или тетрамер. Они также могут содержать одноцепочечные или многоцепочечные полипептиды. Чаще всего дисульфидные связи обнаруживаются в многоцепочечных полипептидах. Термин «полипептид» может также применяться к аминокислотным полимерам, в которых один или несколько аминокислотных остатков являются искусственным химическим аналогом соответствующей встречающейся в природе аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления «пептид» может иметь длину не более 50 аминокислот, например, длину около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот.

[1071] *Вариант полипептида*: Используемый в данном документе термин «вариант полипептида» относится к молекулам, которые отличаются по своей аминокислотной последовательности от нативной или эталонной последовательности. Варианты аминокислотной последовательности могут иметь замены, делеции и/или вставки в определенных положениях в аминокислотной последовательности по сравнению с нативной или эталонной последовательностью. Обычно варианты обладают идентичностью по меньшей мере около 50%, идентичностью по меньшей мере около 60%, идентичностью по меньшей мере около 70%, идентичностью по меньшей мере около 80%, идентичностью по меньшей мере около 90%, идентичностью по меньшей мере около 95%, идентичностью по меньшей мере около 99% идентичность с нативной или эталонной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления они будут по меньшей мере на около 80% или по меньшей мере на около 90% идентичны нативной или эталонной последовательности.

[1072] *Полипептид на единицу лекарственного средства (PUD)*: Используемый в данном документе термин PUD или продукт на единицу лекарственного средства определяется как часть общей суточной дозы, обычно 1 мг, пг, кг и т. д., продукта (такого как полипептид), измеренная в биологической жидкости или ткани, обычно определяемая в концентрации, такой как пмоль/мл, ммоль/мл и т. д., разделенной на показатель в биологической жидкости.

[1073] *Предотвращение*: При употреблении в контексте данного документа термин «предотвращение» относится к частичной или полной отсрочке начала инфекции, заболевания, расстройства и/или патологического состояния; частичной или полной отсрочке появления одного или большего числа симптомов, признаков или клинических проявлений конкретной инфекции, конкретного заболевания, расстройства и/или патологического состояния; частичной или полной отсрочке появления одного или большего числа симптомов, признаков или проявлений конкретной инфекции, конкретного заболевания, расстройства и/или патологического состояния; частичному или полному замедлению прогрессирования конкретной инфекции, конкретного заболевания, расстройства и/или патологического состояния, и/или снижению риска развития патологии, связанной с инфекцией, заболеванием, расстройством и/или патологическим состоянием.

[1074] *Пролиферировать:* Используемый в данном документе термин «пролиферировать» означает расти, размножаться или увеличиваться или вызывать быстрый рост, размножение или увеличение. «Пролиферативный» означает способность к размножению. «Антипролиферативный» означает обладающий свойствами, противоречащими или несовместимыми с пролиферативными свойствами.

[1075] *Профилактический*: Используемый в данном документе термин «профилактический» относится к терапевтическому или курсовому действию, используемому для предотвращения распространения заболевания.

[1076] *Профилактика:* Используемый в данном документе термин «профилактика» относится к мерам, принимаемым для поддержания здоровья и предотвращения распространения заболевания. «Иммунная профилактика» относится к мерам по созданию активного или пассивного иммунитета для предотвращения распространения заболевания.

[1077] *Сайт расщепления белка*: Используемый в данном документе термин «сайт расщепления белка» относится к сайту, в котором контролируемое расщепление аминокислотной цепи может быть осуществлено химическими, ферментативными или фотохимическими средствами.

[1078] *Сигнал расщепления белка*: Используемый в данном документе термин «сигнал расщепления белка» относится по меньшей мере к одной аминокислоте, которая помечает или маркирует полипептид для расщепления.

[1079] *Представляющий интерес белок*: Используемые в данном документе

термины «представляющие интерес белки» или «желаемые белки» включают белки, представленные в данном документе, а также их фрагменты, мутанты, варианты и изменения.

[1080] *Проксимальный*: Используемый в данном документе термин «проксимальный» означает расположенный ближе к центру или к интересующей точке или области.

[1081] *Псевдоуридин*: Используемый в данном документе термин псевдоуридин (ψ) относится к С-гликозидному изомеру нуклеозида уридина. «Аналог псевдоуридина» представляет собой любую модификацию, вариант, изоформу или производное псевдоуридина. Например, аналоги псевдоуридина включают, помимо прочего, 1-карбоксиметил-псевдоуридин, 1-пропинил-псевдоуридин, 1-тауринометил-псевдоуридин, 1-тауринометил-4-тио-псевдоуридин, 1-метилпсевдоуридин ($m^1\psi$) (также известный как N1-метил-псевдоуридин), 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-деаза-псевдоуридин, 2-тио-1-метил-1-деаза-псевдоуридин, дигидропсевдоуридин, 2-тио-дигидропсевдоуридин, 2-метоксиуридин, 2-метокси-4-тиоуридин, 4-метокси-псевдоуридин, 4-метокси-2-тио-псевдоуридин, 1-метил-3-(3-амино-3-карбоксипропил)псевдоуридин ($acp^3\ \psi$) и 2'-О-метил-псевдоуридин (ψm).

[1082] *Очищенный*: Используемый в данном документе термин «очистить», «очищенный», «очистка» означает сделать по существу чистым или очищенным от нежелательных компонентов, загрязнения материала, примеси или дефектов.

[1083] *Эталонная последовательность нуклеиновой кислоты*: Термин «эталонная последовательность нуклеиновой кислоты», или «эталонная нуклеиновая кислота», или «эталонная нуклеотидная последовательность», или «эталонная последовательность» относится к исходной последовательности нуклеиновой кислоты (например, РНК, например, последовательности мРНК), которая может быть оптимизирована по последовательности. В некоторых вариантах осуществления эталонная последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты дикого типа, ее фрагмент или вариант. В некоторых вариантах осуществления эталонная последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой предварительно оптимизированную последовательность нуклеиновой кислоты.

[1084] *Соли*: в некоторых аспектах фармацевтическая композиция для доставки, описанная в данном документе, содержит соли некоторых липидных компонентов.

Термин «соль» включает любой анионный и катионный комплекс. Неограничивающие примеры анионов включают неорганические и органические анионы, например, фторид, хлорид, бромид, йодид, оксалат (например, гемиоксалат), фосфат, фосфонат, гидрофосфат, дигидрофосфат, оксид, карбонат, бикарбонат, нитрат, нитрит, нитрид, бисульфит, сульфид, сульфит, бисульфат, сульфат, тиосульфат, гидросульфат, борат, формиат, ацетат, бензоат, цитрат, тартрат, лактат, акрилат, полиакрилат, фумарат, малеат, итаконат, гликолат, глюконат, малат, манделат, тиглат, аскорбат, салицилат, полиметакрилат, перхлорат, хлорат, хлорит, гипохлорит, бромат, гипобромит, йодат, алкилсульфонат, арилсульфонат, арсенат, арсенит, хромат, дихромат, цианид, цианат, тиоцианат, гидроксид, пероксид, перманганат, и их смеси.

[1085] *Образец*: Используемый в данном документе термин «образец» или «биологический образец» относится к подмножеству его тканей, клеток или составных частей (*например,* биологических жидкостей, включая, помимо прочего, кровь, слизь, лимфатическую жидкость, синовиальную жидкость, спинномозговую жидкость, слюну, амниотическую жидкость, амниотическую пуповинную кровь, мочу, вагинальную жидкость и сперму). Образец также может включать гомогенат, лизат или экстракт, полученный из целого организма или подмножества его тканей, клеток или составных частей, или их фракции или части, включая, помимо прочего, например, плазму, сыворотку, спинномозговую жидкость, лимфатическую жидкость, внешние участки кожи, дыхательные, кишечные и мочеполовые пути, слезы, слюну, молоко, клетки крови, опухоли, органы. Образец также относится к среде, такой как питательный бульон или гель, которая может содержать клеточные компоненты, такие как белки или молекулы нуклеиновой кислоты.

[1086] *Сигнальная последовательность:* Используемые в данном документе фразы «сигнальная последовательность», «сигнальный пептид» и «транзитный пептид» используются взаимозаменяемо и относятся к последовательности, которая может направлять транспорт или локализацию белка в определенной органелле, клеточном компартменте, или внеклеточный экспорт. Термин охватывает как полипептид сигнальной последовательности, так и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сигнальную последовательность. Таким образом, ссылки на сигнальную последовательность в контексте нуклеиновой кислоты фактически относятся к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид сигнальной последовательности.

[1087] *Путь передачи сигнала*: Термин «путь передачи сигнала» относится к

биохимической взаимосвязи между различными молекулами передачи сигналов, которые играют роль в передаче сигнала от одной части клетки к другой части клетки. Используемая в данном документе фраза «рецептор клеточной поверхности» включает, например, молекулы и комплексы молекул, способные принимать сигнал и передавать такой сигнал через плазматическую мембрану клетки.

[1088] *Сходство*: В контексте настоящего документа термин «сходство» относится к общему сходству между полимерными молекулами, *например*, между полинуклеотидными молекулами (*например,*молекулами ДНК и/или молекулами РНК) и/или между молекулами полипептидов. Расчет процентного сходства полимерных молекул друг с другом может быть выполнен таким же образом, как расчет процентного сходства, за исключением того, что расчет процентного сходства принимает во внимание консервативные замены, как известно в данной области техники.

[1089] *Стандартная единичная доза*: Используемый в данном документе термин «стандартная единичная доза» представляет собой дозу любого терапевтического средства, вводимого в виде одной дозы/одновременно/одним путем/одной точкой контакта, *т.е.* событие однократного введения.

[1090] *Разделенная доза*: Используемый в данном документе термин «разделенная доза» представляет собой разделение стандартной единичной дозы или общей суточной дозы на две или более доз.

[1091] *Специфическая доставка*: В контексте данного документа термин «специфическая доставка», «доставка специфическим образом» или «доставление специфическим образом» означает доставку большего количества (*например,* по меньшей мере в 1,5 раза больше, по меньшей мере в 2 раза больше, по меньшей мере в 3 раза больше, по меньшей мере в 4 раза больше, по меньшей мере в 5 раз больше, по меньшей мере в 6 раз больше, по меньшей мере в 7 раз больше, по меньшей мере в 8 раз больше, по меньшей мере в 9 раз больше, по меньшей мере в 10 раз больше) полинуклеотида посредством наночастицы в представляющую интерес целевую ткань (*например,* печень млекопитающего) по сравнению с нецелевой тканью (*например*, селезенкой млекопитающего). Уровень доставки наночастицы в конкретную ткань можно измерить, сравнивая количество белка, продуцируемого в ткани, с массой указанной ткани, сравнивая количество полинуклеотида в ткани с массой указанной ткани, сравнивая количество белка, продуцируемого в ткани, с количеством общего белка в указанной ткани, или сравнивая количество полинуклеотида в ткани с количеством общего полинуклеотида в указанной ткани.

Например, для реноваскулярного нацеливания полинуклеотид специфически доставляют в почку млекопитающего по сравнению с печенью и селезенкой, при доставке в почку в 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 15 раз или в 20 раз большего количества полинуклеотида на 1 г ткани по сравнению с количеством, доставленным в печень или селезенку после системного введения полинуклеотида. Следует понимать, что способность наночастицы специфически доставлять в целевую ткань не требуется определять у субъекта, подлежащего лечению, ее можно определить в суррогате, таком как животная модель (*например,* крысиная модель).

[1092] *Стабильный*: Используемый в данном документе термин «стабильный» относится к соединению, которое является достаточно устойчивым, чтобы выдержать выделение до приемлемой степени чистоты из реакционной смеси, и в некоторых случаях может быть включено в состав эффективного терапевтического агента.

[1093] *Стабилизированный*: Используемый в данном документе термин «стабилизировать», «стабилизированный», «стабилизированная область» означает сделать или стать стабильным.

[1094] *Стереоизомер*: Используемый в данном документе термин «стереоизомер» относится ко всем возможным различным изомерным, а также конформационным формам, которыми может обладать соединение (*например*, соединение любой формулы, описанной в данном документе), в частности ко всем возможным стереохимически и конформационно изомерным формам, всем диастереомерам, энантиомерам и/или конформерам основной молекулярной структуры. Некоторые соединения по данному изобретению могут существовать в различных таутомерных формах, причем все последние включены в объем настоящего изобретения.

[1095] *Субъект*: Под «субъектом», или «индивидуумом», или «животным», или «пациентом», или «млекопитающим» подразумевается любой субъект, в частности субъект-млекопитающее, для которого желателен диагноз, прогноз или терапия. Субъекты-млекопитающие включают, помимо прочего, людей, домашних животных, сельскохозяйственных животных, животных зоопарка, спортивных животных, домашних животных, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы; приматы, такие как человекообразные обезьяны, мартышки, орангутанги и шимпанзе; псовые, такие как собаки и волки; кошачьих, таких как кошки, львы и тигры; непарнокопытные, такие как лошади, ослы и зебры; медведи, пищевые животные, такие как коровы, свиньи и овцы; копытные, такие как олени и жирафы; грызуны, такие как мыши, крысы,

хомяки и морские свинки; и так далее. В некоторых вариантах осуществления млекопитающим является человек. В других вариантах осуществления субъект представляет собой пациента-человека. В конкретном варианте осуществления субъект представляет собой пациента-человека, нуждающегося в лечении.

[1096] *По существу*: Используемый в данном документе термин «по существу» относится к качественному состоянию проявления полной или почти полной степени или интересующей степени характеристики или свойства. Специалисту в области биологии будет понятно, что биологические и химические характеристики редко, если вообще когда-либо, доходят до завершения и/или переходят к завершению или исключают абсолютный результат. Таким образом, термин «по существу» используется в данном документе, чтобы отразить потенциальный недостаток полноты, присущей многим биологическим и химическим характеристикам.

[1097] *По существу равные*: Используемый в данном документе термин, относящийся к разнице во времени между дозами, означает плюс/минус 2%.

[1098] *По существу одновременный*: Используемый в данном документе и относящийся к множеству доз, термин означает в течение 2 секунд.

[1099] *Страдает от*: Индивидуум, который «страдает» заболеванием, расстройством и/или состоянием, имеет или проявляет один или несколько симптомов заболевания, расстройства и/или состояния.

[1100] *Восприимчивость к*: лицо, которое «восприимчиво» к заболеванию, расстройству и/или состоянию, у которого не было диагностировано и/или не может проявляться симптомов заболевания, расстройства и/или состояния, но имеется склонность к развитию заболевания или его симптомов. В некоторых вариантах осуществления индивидуум, предрасположенный к заболеванию, расстройству и/или состоянию (например, МВ), может характеризоваться одним или несколькими из следующих признаков: (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, связанные с развитием заболевания, расстройства и/или состояния; (5) семейный анамнез заболевания, расстройства и/или состояния; и (6) воздействие и/или заражение микроорганизмом, связанным с развитием заболевания, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления у

индивидуума, предрасположенного к заболеванию, расстройству и/или состоянию, разовьется заболевание, расстройство и/или состояние. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума, предрасположенного к заболеванию, расстройству и/или патологическому состоянию, заболевание, расстройство и/или патологическое состояние не разовьется.

[1101] *Замедленное высвобождение:* Используемый в данном документе термин «замедленное высвобождение» относится к профилю высвобождения фармацевтической композиции или соединения, который соответствует скорости высвобождения в течение определенного периода времени.

[1102] *Синтетический*: термин «синтетический» означает произведенный, приготовленный и/или изготовленный руками человека. Синтез полинуклеотидов или других молекул по данному изобретению может быть химическим или ферментативным.

[1103] *Клетки-мишени:* Используемый в данном документе термин «клетки-мишени» относится к любой одной или нескольким представляющим интерес клеткам. Клетки могут находиться *in vitro*, *in vivo*, *in situ* или в ткани или органе организма. Организм может быть животным, например млекопитающим, человеком, субъектом или пациентом.

[1104] *Целевая ткань*: В контексте данного документа «целевая ткань» относится к любым одному или более типам представляющих интерес тканей, в которых доставка полинуклеотида будет обеспечивать необходимый биологический и/или фармакологический эффект. Примеры целевых тканей, представляющих интерес, включают конкретные ткани, органы и системы, или их группы. В конкретных применениях целевой тканью может быть печень, почка, легкое, селезенка или сосудистый эндотелий в сосудах (например, внутрикоронарных или внутрибедренных). «Нецелевая ткань» относится к любым одному или более типам тканей, в которых экспрессия кодированного белка не обеспечивает необходимый биологический и/или фармакологический эффект.

[1105] Присутствие терапевтического агента в нецелевой ткани может быть результатом: (i) утечки полинуклеотида из места введения в периферическую ткань или отдаленную нецелевую ткань посредством диффузии или кровотока (например, полинуклеотид, предназначенный для экспрессии полипептида в определенной ткани, достигнет нецелевой ткани, и полипептид будет экспрессироваться в нецелевой ткани); или (ii) утечки полипептида после введения полинуклеотида, кодирующего такой полипептид, в периферическую ткань или отдаленную

нецелевую ткань посредством диффузии или через кровоток (например, полинуклеотид будет экспрессировать полипептид в целевой ткани, и полипептид будет диффундировать в периферическую ткань).

[1106] *Нацеливающая последовательность*: Используемая в данном документе фраза «нацеливающая последовательность» относится к последовательности, которая может управлять транспортом или локализацией белка или полипептида.

[1107] *Конец*: Используемые в данном документе термины «конец» или «концевой» применительно к полипептидам относятся к концу пептида или полипептида. Такой конец не ограничивается только первым или конечным участком пептида или полипептида, но может включать дополнительные аминокислоты в концевые области. Полипептид на основе молекул по изобретению может быть охарактеризован как имеющий как N-конец (заканчивающийся аминокислотой со свободной аминогруппой (NH_2)) так и С-конец (заканчивающийся аминокислотой со свободной карбоксильной группой (COOH)). В некоторых случаях белки по изобретению состоят из нескольких полипептидных цепей, объединенных дисульфидными связями или нековалентными силами (мультимерами, олигомерами). Эти типы белков будут иметь несколько N- и С-концов. Альтернативно, концы полипептидов можно модифицировать таким образом, чтобы они начинались или заканчивались, в зависимости от конкретного случая, фрагментом, не основанным на полипептидах, таким как органический конъюгат.

[1108] *Терапевтический агент:* Термин «терапевтический агент» относится к агенту, который при введении субъекту обладает терапевтическим, диагностическим и/или профилактическим эффектом и/или вызывает желаемый биологический и/или фармакологический эффект. Например, в некоторых вариантах осуществления мРНК, кодирующая полипептид CFTR, может представлять собой терапевтический агент.

[1109] *Терапевтически эффективное количество*: Используемый в данном документе термин «терапевтически эффективное количество» означает количество доставляемого агента (*например,* нуклеиновой кислоты, лекарственного средства, терапевтического агента, диагностического агента, профилактического агента и т. д.), которое является достаточным при введении субъекту, страдающему или восприимчивому к инфекции, заболеванию, расстройству и/или состоянию, для лечения, улучшения симптомов, диагностики, предотвращения и/или задержки начала инфекции, заболевания, расстройства и/или состояния.

[1110] *Терапевтически эффективный результат*: Используемый в данном

документе термин «терапевтически эффективный результат» означает результат, достаточный у субъекта, страдающего инфекцией, заболеванием, расстройством и/или состоянием или восприимчивого к нему, для лечения, улучшения симптомов, диагностики, предотвращения и/или отсрочки начала инфекции, заболевания, расстройства и/или состояния.

[1111] *Общая суточная доза:* В контексте данного документа «общая суточная доза» представляет собой количество, введенное или прописанное в течение периода 24 часа. Общая суточная доза может быть введена в виде стандартной единичной дозы или разделенной дозы.

[1112] *Фактор транскрипции:* Используемый в данном документе термин «фактор транскрипции» относится к ДНК-связывающему белку, который регулирует транскрипцию ДНК в РНК, например, путем активации или подавления транскрипции. Некоторые факторы транскрипции влияют на регуляцию транскрипции в одиночку, в то время как другие действуют совместно с другими белками. Некоторые транскрипционные факторы могут как активировать, так и репрессировать транскрипцию при определенных условиях. Как правило, факторы транскрипции связывают специфическую целевую последовательность или последовательности, очень похожие на специфическую консенсусную последовательность в регуляторной области целевого гена. Факторы транскрипции могут регулировать транскрипцию целевого гена отдельно или в комплексе с другими молекулами.

[1113] *Транскрипция*: Используемый в данном документе термин «транскрипция» относится к способам получения мРНК (*например*, последовательности или матрицы мРНК) из ДНК (*например*, матрицы или последовательности ДНК).

[1114] *Трансфекция*: Используемый в данном документе термин «трансфекция» относится к введению полинуклеотида (например, экзогенных нуклеиновых кислот) в клетку, в которой экспрессируется полипептид, кодируемый этим полинуклеотидом (например, мРНК), или полипептид модулирует клеточную функцию (например, миРНК, микроРНК). Используемый в данном документе термин «экспрессия» последовательности нуклеиновой кислоты относится к трансляции полинуклеотида (например, мРНК) в полипептид или белок и/или посттрансляционной модификации полипептида или белка. Способы трансфекции включают, помимо прочего, химические способы, физическую обработку и катионные липиды или их смеси.

[1115] *Лечить, лечение, терапия*: Используемый в данном документе термин

«лечить» или «лечение» или «терапия» относится к частичному или полному облегчению, ослаблению, улучшению, облегчению, отсрочке начала, ингибированию прогрессирования, уменьшению тяжести и/или снижение частоты возникновения одного или нескольких симптомов или признаков заболевания, *например*, МВ. Например, «лечение» МВ может относиться к уменьшению симптомов, связанных с заболеванием, увеличению продолжительности жизни (повышению выживаемости) пациентов, уменьшению тяжести заболевания, предупреждению или отсрочке начала заболевания и т. д. Лечение можно назначать субъекту, у которого нет признаков заболевания, расстройства и/или состояния, и/или субъекту, у которого проявляются только ранние признаки заболевания, расстройства и/или состояния, с целью снижения риска развития патологии связанных с заболеванием, расстройством и/или состоянием.

[1116] *Немодифицированный*: Используемый в данном документе термин «немодифицированный» относится к любому веществу, соединению или молекуле до того, как он будет каким-либо образом изменен. Немодифицированный может, но не всегда, относиться к дикому типу или нативной форме биомолекулы. Молекулы могут подвергаться серии модификаций, в результате чего каждая модифицированная молекула может служить в качестве «немодифицированной» исходной молекулы для последующей модификации.

[1117] *Урацил*: Урацил является одним из четырех азотистых оснований в нуклеиновой кислоте РНК и обозначается буквой U. Урацил может быть присоединен к кольцу рибозы или, точнее, к рибофуранозе через β-N_1-гликозидную связь с образованием нуклеозида уридина. Нуклеозид уридин также обычно обозначается аббревиатурой в соответствии с однобуквенным кодом его азотистого основания, т. е. U. Таким образом, в контексте данного изобретения, когда мономер в полинуклеотидной последовательности представляет собой U, такой U взаимозаменяемо обозначается как «урацил» или «уридин».

[1118] *Содержание уридина*: Термины «содержание уридина» или «содержание урацила» являются взаимозаменяемыми и относятся к количеству урацила или уридина, присутствующего в определенной последовательности нуклеиновой кислоты. Содержание уридина или урацила может быть выражено как абсолютное значение (общее количество уридина или урацила в последовательности) или относительное (процентное содержание уридина или урацила по отношению к общему числу азотистых оснований в последовательности нуклеиновой кислоты).

[1119] *Уридин-модифицированная последовательность*: Термины «уридин-

модифицированная последовательность» относятся к оптимизированной по последовательности нуклеиновой кислоте (например, к синтетической последовательности мРНК) с различным общим или локальным содержанием уридина (более высоким или низким содержанием уридина) или с различными структурами уридина (например, градиентное распределение или кластеризация) в отношении содержания уридина и/или структуры уридина предполагаемой последовательности нуклеиновой кислоты. В содержании данного раскрытия термины «уридин-модифицированная последовательность» и «урацил-модифицированная последовательность» считаются эквивалентными и взаимозаменяемыми.

[1120] «Кодон с высоким уровнем уридина» определяется как кодон, содержащий два или три уридина, «кодон с низким уровнем уридина» определяется как кодон, содержащий один уридин, и «безуридиновый кодон» представляет собой кодон без каких-либо уридинов. В некоторых вариантах осуществления уридин-модифицированная последовательность содержит замены кодонов с высоким уровнем уридина кодонами с низким уровнем уридина, замены кодонов с высоким уровнем уридина кодонами без уридина, замены кодонов с низким уровнем уридина кодонами с высоким уровнем уридина, замены кодонов с низким уровнем уридина кодонами без уридина, замена кодонов без уридина кодонами с низким уровнем уридина, замена кодонов без уридина кодонами с высоким уровнем уридина и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления кодон с высоким уровнем уридина может быть заменен другим кодоном с высоким уровнем уридина. В некоторых вариантах осуществления кодон с низким уровнем уридина может быть заменен другим кодоном с низким уровнем уридина. В некоторых вариантах осуществления кодон без уридина может быть заменен другим кодоном без уридина. Уридин-модифицированная последовательность может быть обогащенной уридином или обедненный уридином.

[1121] *Обогащенная уридином*: Используемые в данном документе термины «обогащенный уридином» и грамматические варианты относятся к увеличению содержания уридина (выраженного в абсолютном значении или в процентном значении) в оптимизированной по последовательности нуклеиновой кислоте (например, синтетической последовательности мРНК) по отношению к содержанию уридина в соответствующей кандидатной последовательности нуклеиновой кислоты. Обогащение уридином может быть осуществлено путем замены кодонов в предполагаемой последовательности нуклеиновой кислоты синонимичными

кодонами, содержащими меньше азотистых оснований уридина. Обогащение уридином может быть глобальным (т.е. относительно всей длины предполагаемой последовательности нуклеиновой кислоты) или локальным (т.е. относительно подпоследовательности или области предполагаемой последовательности нуклеиновой кислоты).

[1122] *Обедненная уридином*: Используемые в данном документе термины «обедненный уридином» и грамматические варианты относятся к уменьшению содержания уридина (выраженного в абсолютном значении или в процентном значении) в оптимизированной по последовательности нуклеиновой кислоте (например, синтетической последовательности мРНК) по отношению к содержанию уридина в соответствующей кандидатной последовательности нуклеиновой кислоты. Обеднение уридином может быть осуществлено путем замены кодонов в предполагаемой последовательности нуклеиновой кислоты синонимичными кодонами, содержащими меньше азотистых оснований уридина. Обеднение уридином может быть глобальным (т.е. относительно всей длины предполагаемой последовательности нуклеиновой кислоты) или локальным (т.е. относительно подпоследовательности или области предполагаемой последовательности нуклеиновой кислоты).

[1123] *Вариант*: Термин «вариант», используемый в данном описании, относится как к естественным вариантам (например, полиморфизмам, изоформам и т. д.), так и к искусственным вариантам, в которых по меньшей мере один аминокислотный остаток в нативной или исходной последовательности (например, последовательности дикого типа) был удален, а на его место в том же положении вставлена другая аминокислота. Эти варианты можно охарактеризовать как «варианты с заменами». Замены могут быть одиночными, когда была заменена только одна аминокислота в молекуле, или они могут быть множественными, когда две или более аминокислоты были заменены в одной и той же молекуле. Если аминокислоты вставлены или удалены, результирующий вариант будет «вариантом с инсерцией» или «вариантом с делецией», соответственно.

[1124] *Инициирующий кодон*: Используемый в данном документе термин «инициирующий кодон», используемый взаимозаменяемо с термином «стартовый кодон», относится к первому кодону открытой рамки считывания, который транслируется рибосомой и состоит из триплета связанных азотистых оснований аденина-урацила-гуанина. Инициирующий кодон обозначается первыми буквенными кодами аденина (A), урацила (U) и гуанина (G) и часто пишется просто

как «AUG». Хотя природные мРНК могут использовать кодоны, отличные от AUG, в качестве инициирующего кодона, которые упоминаются в данном документе как «альтернативные инициирующие кодоны», инициирующие кодоны полинуклеотидов, описанные в данном документе, используют кодон AUG. В процессе инициации трансляции последовательность, содержащая инициирующий кодон, распознается путем комплементарного спаривания оснований с антикодоном инициаторной тРНК (Met-tRNA$_i^{Met}$), связанной рибосомой. Открытые рамки считывания могут содержать более одного инициирующего кодона AUG, которые упоминаются в данном документе как «альтернативные инициирующие кодоны».

[1125] Инициирующий кодон играет критическую роль в инициации трансляции. Инициирующий кодон является первым кодоном открытой рамки считывания, которая транслируется рибосомой. Как правило, инициирующий кодон содержит нуклеотидный триплет AUG, однако в некоторых случаях инициация трансляции может происходить в других кодонах, состоящих из отдельных нуклеотидов. Инициация трансляции у эукариот представляет собой многоэтапный биохимический процесс, который включает многочисленные взаимодействия белок-белок, белок-РНК и РНК-РНК между молекулами матричными РНК (мРНК), 40S рибосомальной субъединицей, другими компонентами механизма трансляции (например, эукариотическими факторами инициации; eIF). Современная модель инициации трансляции мРНК постулирует, что преинициирующий комплекс (альтернативно «43S преинициирующий комплекс»; сокращенно «PIC») транслоцируется из сайта рекрутирования на мРНК (обычно 5'-кэп) в инициирующий кодон сканируя нуклеотиды в направлении от 5’ до 3', пока не встретится первый кодон AUG, который находится в специфическом нуклеотидном контексте, вызывающем трансляцию (последовательность Козак) (Kozak (1989) J Cell Biol 108:229-241). Сканирование с помощью PIC заканчивается комплементарным спариванием оснований между нуклеотидами, содержащими антикодон инициаторной транспортной РНК Met-tRNA$_i^{Met}$ и нуклеотидами, содержащими инициирующий кодон мРНК. Продуктивное спаривание оснований между кодоном AUG и антикодоном Met-tRNA$_i^{Met}$ вызывает серию структурных и биохимических событий, которые завершаются присоединением большой 60S рибосомной субъединицы к PIC с образованием активной рибосомы, которая способна к удлинению трансляции.

[1126] *Последовательность Козак* : Термин «последовательность Козак» (также называемая «консенсусной последовательностью Козак») относится к элементу,

усиливающему инициацию трансляции, который усиливает экспрессию гена или открытой рамки считывания, и который у эукариот находится в 5′-НТО. Консенсусная последовательность Козак первоначально была определена как последовательность GCCRCC (SEQ ID NO: 72), где R = пурин, после анализа эффектов одиночных мутаций, окружающих кодон инициации (AUG), на трансляцию гена препроинсулина (Kozak (1986) Cell 44:283-292). Полинуклеотиды, раскрытые в данном документе, содержат консенсусную последовательность Козак или ее производное или модификацию. (Примеры композиций, усиливающих трансляцию, и способов их применения см. в патенте США № 5807707, Andrews et al., полностью включенном в данный документ посредством ссылки; в патенте США № 5723332, выданном Chernajovsky, полностью включенном в данный документ посредством ссылки; патенте США № 5891665, выданном Wilson, полностью включенном в данный документ посредством ссылки.)

[1127] *Модифицированный*: Используемый в данном документе термин «модифицированный» или «модификация» относится к измененному состоянию или изменению состава или структуры полинуклеотида (например, мРНК). Полинуклеотиды могут быть модифицированы различными способами, в том числе химически, структурно и/или функционально. Например, полинуклеотиды могут быть структурно модифицированы путем включения одного или более элементов РНК, причем элемент РНК содержит последовательность и/или вторичную структуру (структуры) РНК, которая обеспечивает одну или более функций (например, трансляционную регуляторную активность). Соответственно, полинуклеотиды согласно раскрытию могут содержать одну или более модификаций (например, могут включать одну или более химических, структурных или функциональных модификаций, включая любую их комбинацию).

[1128] *Азотистое основание*: Используемый в данном документе термин «азотистое основание» (альтернативно «нуклеотидное основание» или «азотистое основание») относится к гетероциклическому соединению пурина или пиримидина, обнаруженному в нуклеиновых кислотах, включая любые производные или аналоги природных пуринов и пиримидинов, которые придают улучшенные свойства (например, аффинность связывания, резистентность к нуклеазе, химическую стабильность) нуклеиновой кислоте или ее части или сегмента. Аденин, цитозин, гуанин, тимин и урацил являются азотистыми основаниями, преимущественно встречающимися в природных нуклеиновых кислотах. Другие природные, неприродные и/или синтетические азотистые основания, известные в данной

области техники и/или описанные в данном документе, могут быть включены в нуклеиновые кислоты. Если не указано иное, последовательность азотистых оснований SEQ ID NO, описанная в данном документе, охватывает как природные азотистые основания, так и химически модифицированные азотистые основания (например, обозначение «U» в SEQ ID NO охватывает как урацил, так и химически модифицированный урацил).

[1129] *Нуклеозид/нуклеотид*: Используемый в данном документе термин «нуклеозид» относится к соединению, содержащему молекулу сахара (например, рибозу в РНК или дезоксирибозу в ДНК), или его производному или аналогу, ковалентно связанному с азотистым основанием (например, пурином или пиримидином) или его производным или аналогом (также называемым в данном документе « азотистым основанием»), но не содержащим межнуклеозидную связывающую группу (например, фосфатную группу). Используемый в данном документе термин «нуклеотид» относится к нуклеозиду, ковалентно связанному с межнуклеозидной связывающей группой (например, фосфатной группой), или к любому его производному, аналогу или модификации, которые придают улучшенные химические и/или функциональные свойства (например, аффинность связывания, резистентность к нуклеазам, химическую стабильность) нуклеиновой кислоте или ее части или сегменту.

[1130] *Нуклеиновая кислота:* Используемый в данном документе термин «нуклеиновая кислота» используется в самом широком смысле и охватывает любое соединение и/или вещество, которое включает полимер нуклеотидов или их производные или аналоги. Эти полимеры часто называют «полинуклеотидами». Соответственно, используемые в данном документе термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» эквивалентны и используются взаимозаменяемо. Иллюстративные нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды согласно раскрытию включают, но не ограничиваются ими, рибонуклеиновые кислоты (РНК), дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), гибриды ДНК-РНК, РНКи-индуцирующие агенты, агенты РНКи, миРНК, кшРНК, мРНК, модифицированные мРНК, микроРНК, антисмысловые РНК, рибозимы, каталитическую ДНК, РНК, которые индуцируют образование тройной спирали, треозо-нуклеиновые кислоты (ТНК), гликоль-нуклеиновые кислоты (ГНК), пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК), закрытые нуклеиновые кислоты (ЗНК, включая ЗНК, имеющую β-D-рибо-конфигурацию, α-ЗНК, имеющую α-L-рибо-конфигурацию (диастереомер ЗНК), 2'-амино-ЗНК, имеющую 2'-аминофункционализацию, и 2'-амино-α-ЗНК, имеющую 2'-

аминофункционализацию), или их гибриды.

[1131] *Структура нуклеиновой кислоты*: Используемый в данном документе термин «структура нуклеиновой кислоты» (используемый взаимозаменяемо с «полинуклеотидной структурой») относится к расположению или организации атомов, химических компонентов, элементов, мотивов и/или последовательности связанных нуклеотидов или их производных или аналогов, которые содержат нуклеиновую кислоту (например, мРНК). Термин также относится к двумерному или трехмерному состоянию нуклеиновой кислоты. Соответственно, термин «структура РНК» относится к расположению или организации атомов, химических компонентов, элементов, мотивов и/или последовательности связанных нуклеотидов или их производных или аналогов, содержащих молекулу РНК (например, мРНК) и/или относится к двумерному и/или трехмерному состоянию молекулы РНК. Структура нуклеиновой кислоты может быть дополнительно разделена на четыре организационные категории, упоминаемые в данном документе как «молекулярная структура», «первичная структура», «вторичная структура» и «третичная структура», в зависимости от возрастающей организационной сложности.

[1132] *Открытая рамка считывания*: Используемый в данном документе термин «открытая рамка считывания», сокращенно обозначенный как «ОРС», относится к сегменту или области молекулы мРНК, которая кодирует полипептид. ОРС содержит непрерывный участок непересекающихся кодонов в рамке считывания, начиная с инициирующего кодона и заканчивая стоп-кодоном, и транслируется рибосомой.

[1133] *Преинициирующий комплекс (PIC):* Используемый в данном документе термин «преинициирующий комплекс» (альтернативно «43S преинициирующий комплекс»; сокращенно «PIC») относится к рибонуклеопротеиновому комплексу, содержащему 40S рибосомную субъединицу, эукариотическим факторам инициации (eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5) и тройному комплексу eIF2-GTP-Met-$tRNA_i^{Met}$, который способен по существу присоединяться к 5'-кэп-структуре молекулы мРНК и после присоединения выполнять рибосомное сканирование 5'-НТО.

[1134] *Элемент РНК*: Используемый в данном документе термин «элемент РНК» относится к части, фрагменту или сегменту молекулы РНК, которая обеспечивает биологическую функцию и/или обладает биологической активностью (например, трансляционной регуляторной активностью). Модификация полинуклеотида путем включения одного или более элементов РНК, таких как описанные в данном

документе, обеспечивает одно или более желаемых функциональных свойств для модифицированного полинуклеотида. Элементы РНК, как описано в данном документе, могут быть встречающимися в природе, не встречающимися в природе, синтетическими, сконструированными или любой их комбинацией. Например, элементы природной РНК, которые обеспечивают регуляторную активность, включают элементы, обнаруженные в транскриптомах вирусов, прокариотических и эукариотических организмов (например, людей). Было показано, что элементы РНК, в частности эукариотические мРНК и транслированные вирусные РНК, участвуют в обеспечении многих функций в клетках. Иллюстративные природные элементы РНК включают, но не ограничиваются ими, элементы инициации трансляции (например, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), см. Kieft et al., (2001) RNA 7(2):194-206), усиливающие трансляцию элементы (например, усиливающий трансляцию элемент мРНК APP, см. Rogers et al., (1999) J Biol Chem 274(10):6421-6431), элементы стабильности мРНК (например, богатые AU элементы (ARE), см. Garneau et al., (2007) Nat Rev Mol Cell Biol 8(2):113-126), элементы репрессии трансляции (см., например, Blumer et al., (2002) Mech Dev 110(1-2):97-112), белок-связывающие элементы РНК (например, железосвязывающий элемент, см. Selezneva et al., (2013) J Mol Biol 425(18):3301-3310), элементы цитоплазматического полиаденилирования (Villalba et al., (2011) Curr Opin Genet Dev 21(4):452-457), и элементы каталитической РНК (например, рибозимы, см. Scott et al., (2009) Biochim Biophys Acta 1789(9-10):634-641).

[1135] *Время пребывания*: Используемый в данном документе термин «время пребывания» относится ко времени нахождения преинициирующего комплекса (PIC) или рибосомы в дискретном положении или местоположении вдоль молекулы мРНК.

[1136] *Трансляционная регуляторная активность*: Используемый в данном документе термин «трансляционная регуляторная активность» (используется взаимозаменяемо с «трансляционной регуляторной функцией») относится к биологической функции, механизму или процессу, который модулирует (например, регулирует, влияет, контролирует, изменяет) активность трансляционного аппарата, включая активность PIC и/или рибосомы. В некоторых аспектах желаемая трансляционная регуляторная активность способствует и/или повышает точность трансляции мРНК. В некоторых аспектах желаемая трансляционная регуляторная активность уменьшает и/или ингибирует ослабленное сканирование.

30. Эквиваленты и объем

[1137] Специалистам в данной области техники понятны или же они смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления в соответствии с изобретением, описанным в данном документе. Объем данного изобретения не предназначен для ограничения приведенного выше описания, а скорее изложено в прилагаемой формуле изобретения.

[1138] В формуле изобретения формы единственного числа могут означать один или более чем один, если не указано иное или это иным образом не очевидно из контекста. Формула изобретения или описания, которые включают «или» между одним или большим количеством представителей группы, считаются удовлетворенными, если один, несколько или все представители группы присутствуют, применяются или иным образом относятся к данному продукту или процессу, если не указано иное или иным образом не следует из контекста. Описание данного изобретения включает в себя варианты осуществления изобретения, в которых ровно один член группы присутствует в, применяется в или иным образом относится к данному продукту или способу. Описание изобретения включает в себя варианты осуществления изобретения, в которых более чем один из группы членов присутствует в, применяется в или иным образом относится к данному продукту или способу.

[1139] Также отмечается, что термин «содержащий» предназначен для того, чтобы быть открытым и допускать включения дополнительных элементов или этапов, но не требует этого. Следовательно, в тех случаях, когда в данном документе употребляется термин «включающий в себя», также охватываются и описываются термины «содержащий» и «состоящий из».

[1140] При указании диапазонов включены конечные точки. Кроме того, следует понимать, что если не указано иное или это иным образом не очевидно из контекста и понимания специалиста в данной области техники, значения, которые выражаются как диапазоны, могут принимать любое конкретное значение или поддиапазон в указанных диапазонах в разных вариантах осуществления изобретения, до десятой части единицы нижнего предела диапазона, если из контекста явно следует иное.

[1141] Кроме того, следует понимать, что любой конкретный вариант осуществления данного изобретения, который относится к предшествующему уровню техники, может быть явно исключен из любого одного или более пунктов формулы изобретения. Поскольку такие варианты осуществления данного изобретения считаются известными для специалиста в данной области техники, они

могут быть исключены, даже если это исключение явно не изложено в данном документе. Любой конкретный вариант осуществления композиций по изобретению (*например*, любая нуклеиновая кислота или кодируемый ею белок; любой способ получения; любой способ применения и т. д.) может быть исключен из любого одного или нескольких пунктов формулы изобретения по любой причине, независимо от того, связан ли он с существованием известного уровня техники.

[1142] Все цитируемые источники, например, ссылки, публикации, базы данных, записи в базах данных и статьи, цитируемые в данном документе, включены в данную заявку посредством ссылки, даже если это прямо не указано в цитировании. В случае противоречивых утверждений цитируемого источника и данной заявки, утверждение в данной заявке имеет преимущественную силу.

[1143] Заголовки разделов и таблиц не предназначены быть ограничивающими.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ КОНСТРУКЦИИ

Под «**G5**» подразумевают, что все урацилы (U) в мРНК заменены N1-метилпсевдоурацилами.

Под «**G6**» подразумевают, что все урацилы (U) в мРНК заменены 5-метоксиурацилами.

	Название мРНК	**Последовательность ОРС (аминокислотная)**	**Последовательность ОРС (нуклеотидная)**	**Последовательность 5'-НТО**	**Последовательность 3'-НТО**	**Последовательность конструкции**
SEQ ID NO:		**1**	**142**	**25**	**45**	**153**
	CFTR-03.**G5** Кэп: m^7G-ppp-Gm-AG	MQRSPLEKA SVVSKLFFSW TRPILRKGYR QRLELSDIYQ IPSVDSADNL SEKLEREWD RELASKKNP	AUGCAGCGGA GCCCUCUGGAG AAGGCCAGCG UGGUGAGCAA GCUGUUCUUC AGCUGGACCA GGCCCAUCCUG	AGGA AAUCG CAAAA UUUGC UCUUC GCGUU AGAU	UAAGU CUAAG CUGGA GCCUC CUGAG AGACC UGUGU	SEQ ID NO: 153 от 5'-конца к 3'-концу состоит из: 5'-НТО SEQ ID NO:

	Название мРНК	**Последовательность ОРС (аминокислотная)**	**Последовательность ОРС (нуклеотидная)**	**Последовательность 5'-НТО**	**Последовательность 3'-НТО**	**Последовательность конструкции**
	Хвост поли-А: A100-UCUAG-A20-инвертированный дезокситимидин (SEQ ID NO: 211)	KLINALRRCF FWRFMFYGIF LYLGEVTKA VQPLLLGRII ASYDPDNKE ERSIAIYLGIG LCLLFIVRTL LLHPAIFGLH HIGMQMRIA MFSLIYKKTL KLSSRVLDKI SIGQLVSLLS NNLNKFDEG LALAHFVWI APLQVALLM GLIWELLQAS AFCGLGFLIV LALFQAGLG RMMMKYRD QRAGKISERL VITSEMIENIQ SVKAYCWEE AMEKMIENL RQTELKLTRK AAYVRYFNS SAFFFSGFFV VFLSVLPYAL IKGIILRKIFTT ISFCIVLRMA VTRQFPWAV	CGAAAGGGCU ACAGACAGAG GCUGGAGCUG UCCGACAUCUA CCAGAUUCCAU CCGUGGACAGC GCCGACAAUCU GAGCGAGAAG CUGGAGAGGG AGUGGGACCG CGAGCUGGCCA GCAAGAAGAA CCCUAAGCUGA UCAACGCCCUG CGCCGCUGCUU CUUCUGGAGG UUCAUGUUCU ACGGCAUCUUC CUGUACCUGG GCGAGGUGAC CAAGGCCGUCC AGCCUCUGCUG CUGGGCCGCAU CAUCGCCAGCU ACGAUCCCGAC AACAAGGAGG AACGCUCCAUC GCCAUCUACCU GGGCAUCGGCC UGUGUCUGCU	UUCUU UUAG UUUUC UCGCA ACUAG CAAGC UUUU UGUUC UCGCC	GAACU AUUGA GAAGA UCGGA ACAGC UCCUU ACUCU GAGGA AGUUG GUACC CCCGU GGUCU UUGAA UAAAG UCUGA GUGGG CGGC	25, последовательность ОРС SEQ ID NO: 142 и 3'-НТО SEQ ID NO: 45.

	Название мРНК	Последовательность ОРС (аминокислотная)	Последовательность ОРС (нуклеотидная)	Последовательность 5'-НТО	Последовательность 3'-НТО	Последовательность конструкции
		QTWYDSLGA	GUUCAUCGUG			
		INKIQDFLQK	CGGACCCUGCU			
		QEYKTLEYN	GCUGCACCCCG			
		LTTTEVVME	CCAUCUUCGGC			
		NVTAFWEEG	CUGCAUCACAU			
		FGELFEKAKQ	CGGCAUGCAG			
		NNNNRKTSN	AUGAGGAUCG			
		GDDSLFFSNF	CCAUGUUCUCC			
		SLLGTPVLKD	CUGAUCUACA			
		INFKIERGQL	AGAAGACCCU			
		LAVAGSTGA	GAAGCUGUCC			
		GKTSLLMMI	AGCCGCGUGCU			
		MGELEPSEG	GGAUAAGAUC			
		KIKHSGRISFC	AGCAUCGGGC			
		SQFSWIMPGT	AGCUGGUGAG			
		IKENIIFGVSY	CCUGCUGAGCA			
		DEYRYRSVIK	ACAACCUGAAC			
		ACQLEEDISK	AAGUUCGACG			
		FAEKDNIVLG	AGGGGUUGGC			
		EGGITLSGGQ	GCUGGCCCACU			
		RARISLARAV	UCGUGUGGAU			
		YKDADLYLL	UGCCCCGCUGC			
		DSPFGYLDVL	AGGUGGCUCU			
		TEKEIFESCV	GCUGAUGGGG			
		CKLMANKTR	CUGAUCUGGG			
		ILVTSKMEHL	AGCUGCUGCA			
		KKADKILILH	GGCCUCUGCCU			
		EGSSYFYGTF	UCUGCGGGCU			
		SELQNLQPDF	GGGGUUUCUG			
		SSKLMGCDSF	AUCGUGCUGG			

	Название мРНК	Последовательность ОРС (аминокислотная)	Последовательность ОРС (нуклеотидная)	Последовательность 5'-НТО	Последовательность 3'-НТО	Последовательность конструкции
		DQFSAERRNS	CCCUGUUCCAA			
		ILTETLHRFSL	GCUGGCCUGG			
		EGDAPVSWT	GCCGCAUGAU			
		ETKKQSFKQT	GAUGAAGUAC			
		GEFGEKRKN	CGCGAUCAGA			
		SILNPINSIRK	GGGCCGGCAA			
		FSIVQKTPLQ	GAUCAGCGAG			
		MNGIEEDSDE	CGCCUGGUGA			
		PLERRLSLVP	UCACUAGCGA			
		DSEQGEAILP	GAUGAUAGAG			
		RISVISTGPTL	AACAUCCAGA			
		QARRRQSVL	GCGUGAAGGC			
		NLMTHSVNQ	UUACUGUUGG			
		GQNIHRKTTA	GAGGAGGCCA			
		STRKVSLAPQ	UGGAGAAGAU			
		ANLTELDIYS	GAUCGAGAAC			
		RRLSQETGLE	CUGAGGCAGA			
		ISEEINEEDLK	CCGAGCUGAA			
		ECFFDDMESI	GCUGACUAGA			
		PAVTTWNTY	AAGGCAGCCU			
		LRYITVHKSL	ACGUGAGGUA			
		IFVLIWCLVIF	UUUCAACUCCA			
		LAEVAASLV	GCGCCUUCUUC			
		VLWLLGNTP	UUCAGCGGCU			
		LQDKGNSTH	UCUUCGUGGU			
		SRNNSYAVII	GUUCCUGAGC			
		TSTSSYYVFY	GUGCUGCCCUA			
		IYVGVADTLL	CGCCCUGAUCA			
		AMGFFRGLP	AGGGCAUCAU			
		LVHTLITVSKI	CCUGAGGAAG			

	Название мРНК	Последовательность ОРС (аминокислотная)	Последовательность ОРС (нуклеотидная)	Последовательность 5'-НТО	Последовательность 3'-НТО	Последовательность конструкции
		LHHKMLHSV	AUCUUCACCAC			
		LQAPMSTLN	CAUUAGCUUC			
		TLKAGGILNR	UGCAUCGUGC			
		FSKDIAILDD	UGCGCAUGGCC			
		LLPLTIFDFIQ	GUGACCAGGC			
		LLLIVIGAIAV	AGUUCCCUUG			
		VAVLQPYIFV	GGCCGUGCAG			
		ATVPVIVAFI	ACUUGGUACG			
		MLRAYFLQT	ACAGCCUGGG			
		SQQLKQLESE	AGCCAUCAACA			
		GRSPIFTHLV	AGAUCCAGGA			
		TSLKGLWTL	CUUUCUGCAG			
		RAFGRQPYFE	AAGCAGGAAU			
		TLFHKALNL	AUAAGACCCU			
		HTANWFLYL	GGAGUACAAC			
		STLRWFQMRI	CUGACCACCAC			
		EMIFVIFFIAV	CGAGGUGGUG			
		TFISILTTGEG	AUGGAGAACG			
		EGRVGIILTL	UGACCGCCUUC			
		AMNIMSTLQ	UGGGAGGAGG			
		WAVNSSIDV	GCUUCGGCGA			
		DSLMRSVSR	GCUGUUCGAG			
		VFKFIDMPTE	AAGGCCAAGC			
		GKPTKSTKPY	AGAACAAUAA			
		KNGQLSKVM	CAACCGCAAGA			
		IIENSHVKKD	CCAGCAACGGC			
		DIWPSGGQM	GACGACUCCCU			
		TVKDLTAKY	CUUCUUCAGCA			
		TEGGNAILEN	ACUUUAGCCU			
		ISFSISPGQRV	GCUGGGCACCC			

	Название мРНК	**Последовательность ОРС (аминокислотная)**	**Последовательность ОРС (нуклеотидная)**	**Последовательность 5'-НТО**	**Последовательность 3'-НТО**	**Последовательность конструкции**
		GLLGRTGSG KSTLLSAFLR LLNTEGEIQI DGVSWDSITL QQWRKAFGV IPQKVFIFSGT FRKNLDPYE QWSDQEIWK VADEVGLRS VIEQFPGKLD FVLVDGGCV LSHGHKQLM CLARSVLSKA KILLLDEPSA HLDPVTYQII RRTLKQAFA DCTVILCEHR IEAMLECQQF LVIEENKVRQ YDSIQKLLNE RSLFRQAISPS DRVKLFPHR NSSKCKSKPQ IAALKEETEE EVQDTRL	CUGUGCUGAA GGACAUCAAC UUCAAGAUCG AAAGAGGCCA ACUGCUGGCCG UGGCCGGAUC UACCGGCGCCG GCAAGACCAGC CUGCUGAUGA UGAUCAUGGG CGAGCUGGAG CCCAGCGAGGG CAAGAUCAAG CACAGCGGCCG GAUCUCCUUCU GCUCCCAGUUC UCCUGGAUCA UGCCCGGCACC AUCAAGGAGA ACAUCAUCUUC GGCGUGAGCU ACGACGAGUA CAGGUACCGG AGCGUGAUCA AGGCCUGCCAG CUGGAGGAGG ACAUCUCCAAA UUUGCCGAGA AGGACAACAU UGUGCUGGGC			

	Название мРНК	**Последовательность ОРС (аминокислотная)**	**Последовательность ОРС (нуклеотидная)**	**Последовательность 5'-НТО**	**Последовательность 3'-НТО**	**Последовательность конструкции**
			GAAGGCGGGA UCACCCUGUCC GGUGGCCAGC GUGCACGCAUC UCCCUGGCCCG GGCUGUGUAC AAGGACGCCG ACCUGUACCUG CUGGACAGCCC UUUUGGCUAC CUGGACGUGC UGACCGAGAA GGAGAUCUUC GAGUCCUGCG UGUGUAAGCU GAUGGCCAAC AAGACCAGAA UCCUGGUGACC AGCAAGAUGG AGCAUCUGAA GAAGGCCGAC AAGAUCCUGA UCCUGCACGAG GGGUCCAGCU ACUUCUACGGC ACCUUCAGCGA GCUGCAGAACC UGCAGCCCGAC UUCAGCUCCAA GCUGAUGGGC			

	Название мРНК	Последовательность ОРС (аминокислотная)	Последовательность ОРС (нуклеотидная)	Последовательность 5'-НТО	Последовательность 3'-НТО	Последовательность конструкции
			UGCGAUAGCU UCGACCAGUUC UCCGCCGAGAG AAGGAACUCC AUUCUGACCG AGACCCUGCAC CGAUUCUCCCU GGAGGGAGAC GCCCCAGUGAG CUGGACCGAG ACCAAGAAGC AGAGCUUCAA GCAGACCGGCG AGUUCGGAGA GAAGCGCAAG AACUCCAUCCU CAACCCCAUCA ACAGCAUCCGG AAGUUCAGCA UCGUGCAGAA GACCCCUCUGC AGAUGAACGG GAUCGAGGAG GACAGCGACG AGCCCCUGGAA CGGCGACUGUC CCUCGUGCCCG ACAGCGAGCA GGGCGAGGCC AUCCUGCCCCG			

	Название мРНК	Последовательность ОРС (аминокислотная)	Последовательность ОРС (нуклеотидная)	Последовательность 5'-НТО	Последовательность 3'-НТО	Последовательность конструкции
			GAUCUCCGUG AUCUCCACUGG GCCCACCCUGC AAGCCCGACGG CGGCAAAGCG UGCUGAACCU GAUGACCCACA GCGUGAACCA GGGCCAGAAU AUCCACCGCAA GACUACAGCCA GCACCCGCAAG GUGAGCCUGG CUCCCCAGGCC AACCUGACCGA GCUGGACAUC UACAGCAGGA GGCUGAGCCA GGAGACAGGC CUGGAGAUCA GCGAGGAGAU CAACGAGGAG GACCUGAAGG AGUGCUUCUU CGACGACAUG GAGUCCAUCCC CGCCGUGACCA CCUGGAACACC UACCUGAGAU ACAUCACCGUG			

	Название мРНК	**Последовательность ОРС (аминокислотная)**	**Последовательность ОРС (нуклеотидная)**	**Последовательность 5'-НТО**	**Последовательность 3'-НТО**	**Последовательность конструкции**
			CACAAGAGCCU GAUCUUCGUG CUGAUCUGGU GCCUGGUGAU CUUCUUGGCCG AGGUAGCCGCC UCACUGGUGG UGCUGUGGCU GCUGGGCAAU ACCCCACUGCA GGACAAGGGG AACUCCACCCA CAGCCGGAACA ACAGCUACGCC GUGAUCAUCA CCUCCACCAGC AGCUACUACG UGUUCUACAU CUACGUGGGC GUGGCCGACAC ACUGCUGGCCA UGGGCUUCUU CAGAGGCCUCC CUCUGGUGCAC ACACUGAUCAC CGUGAGCAAG AUCCUGCACCA CAAGAUGCUG CACAGCGUGCU GCAGGCUCCCA			

	Название мРНК	**Последовательность ОРС (аминокислотная)**	**Последовательность ОРС (нуклеотидная)**	**Последовательность 5'-НТО**	**Последовательность 3'-НТО**	**Последовательность конструкции**
			UGUCAACCCUG AACACCCUGAA GGCCGGCGGCA UCCUGAACAG GUUCAGCAAG GACAUCGCCAU UCUGGACGAU CUGCUGCCCCU GACCAUCUUCG ACUUCAUCCAG CUGCUGCUGA UCGUGAUCGG GGCCAUCGCCG UGGUGGCCGU GCUGCAGCCCU ACAUCUUCGU GGCCACAGUGC CCGUGAUCGU GGCCUUCAUCA UGCUGCGCGCC UACUUCCUGCA GACCUCCCAGC AGCUGAAGCA GCUGGAGAGC GAAGGCCGCA GCCCCAUCUUC ACCCACCUGGU GACUAGCCUG AAGGGGCUGU GGACCCUGCGC			

	Название мРНК	Последовательность ОРС (аминокислотная)	Последовательность ОРС (нуклеотидная)	Последовательность 5'-НТО	Последовательность 3'-НТО	Последовательность конструкции
			GCCUUCGGCAG GCAGCCCUACU UCGAGACCCUG UUCCACAAGGC UCUGAACCUGC ACACCGCCAAC UGGUUCCUGU ACCUCAGCACC CUGCGCUGGU UCCAGAUGCG GAUCGAGAUG AUCUUCGUGA UCUUCUUCAUC GCCGUGACCUU CAUCUCCAUCC UGACCACCGGG GAAGGCGAGG GACGGGUGGG AAUCAUCCUG ACCCUGGCCAU GAAUAUCAUG AGCACCCUGCA GUGGGCCGUG AACAGCAGCA UCGACGUGGA CAGCCUGAUGC GGUCCGUGUCC CGGGUGUUCA AGUUCAUCGA CAUGCCCACCG			

	Название мРНК	**Последовательность ОРС (аминокислотная)**	**Последовательность ОРС (нуклеотидная)**	**Последовательность 5'-НТО**	**Последовательность 3'-НТО**	**Последовательность конструкции**
			AGGGCAAGCCC ACCAAGAGCAC CAAGCCCUACA AGAACGGCCA GCUGAGCAAG GUGAUGAUUA UCGAGAACAG CCACGUGAAG AAGGACGACA UCUGGCCUUCC GGCGGCCAGA UGACCGUGAA GGACCUGACCG CCAAGUACACC GAGGGCGGCA ACGCCAUCCUG GAGAACAUCA GCUUCUCCAUU AGCCCUGGACA GCGGGUGGGC CUGUUGGGAC GGACCGGCAG UGGGAAGAGC ACCCUGCUGUC CGCCUUCCUGC GGCUGCUGAA CACGGAGGGC GAGAUCCAGA UCGACGGGGU GAGCUGGGAC			

	Название мРНК	Последовательность ОРС (аминокислотная)	Последовательность ОРС (нуклеотидная)	Последовательность 5'-НТО	Последовательность 3'-НТО	Последовательность конструкции
			AGCAUCACCCU GCAGCAGUGG CGAAAGGCCU UCGGCGUGAU CCCACAGAAGG UGUUUAUUUU CUCUGGCACCU UUAGGAAGAA CCUGGACCCCU ACGAGCAGUG GUCCGACCAGG AGAUCUGGAA GGUGGCCGAC GAGGUGGGCC UGCGGUCAGU GAUCGAGCAG UUCCCCGGCAA GCUGGACUUC GUGCUGGUGG ACGGCGGCUGC GUGCUGAGCC ACGGCCACAAG CAGCUGAUGU GCCUGGCACGC AGCGUGCUGA GCAAGGCCAA GAUCCUGCUGC UGGACGAGCCC UCCGCGCACCU GGAUCCCGUG			

	Название мРНК	**Последовательность ОРС (аминокислотная)**	**Последовательность ОРС (нуклеотидная)**	**Последовательность 5'-НТО**	**Последовательность 3'-НТО**	**Последовательность конструкции**
			ACCUACCAGAU CAUCAGGCGG ACCCUGAAGCA GGCCUUCGCCG ACUGCACCGUG AUCCUGUGCG AGCACAGAAU CGAGGCUAUG CUGGAGUGCC AGCAGUUCCU GGUGAUCGAG GAGAACAAGG UGCGGCAGUA CGACUCCAUCC AGAAGCUGCU GAACGAGCGC AGCCUGUUCA GACAGGCUAU CUCUCCCAGCG AUCGCGUGAA GCUGUUCCCUC ACAGGAACAG CAGCAAGUGC AAGUCUAAGC CACAGAUCGCC GCCCUGAAGG AGGAGACCGA GGAGGAGGUG CAGGAUACCCG CCUG			

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

Синтез химерных полинуклеотидов

A. Трифосфатный путь

[1144] Две области или части химерного полинуклеотида можно соединить или лигировать, используя трифосфатную химию. В соответствии с этим способом первая область или часть, состоящая из 100 нуклеотидов или менее, может быть химически синтезирована с 5'-монофосфатом и концевым 3'-дезОН или блокированным ОН. Если область длиннее 80 нуклеотидов, она может быть синтезирована как две цепи для лигирования.

[1145] Если первая область или часть синтезируется как непозиционно модифицированная область или часть с использованием транскрипции *in vitro* (IVT), может последовать превращение в 5′-монофосфат с последующим кэпированием 3′-конца. Монофосфатные защитные группы могут быть выбраны из любых известных в данной области техники.

[1146] Вторая область или часть химерного полинуклеотида могут быть синтезированы с использованием методов химического синтеза или IVT. Способы IVT могут включать РНК-полимеразу, которая может использовать праймер с модифицированным кэпом. Альтернативно кэп длиной до 80 нуклеотидов может быть синтезирован химическим путем и присоединен к области или части IVT.

[1147] Отмечено, что для методов лигирования лигирование ДНК-лигазой Т4 с последующей обработкой ДНКазой должно легко избежать конкатенации.

[1148] Нет необходимости изготавливать весь химерный полинуклеотид с фосфатно-сахарным остовом. Если одна из областей или частей кодирует полипептид, тогда такая область или часть может содержать фосфатно-сахарный остов.

[1149] Затем может быть проведено лигирование с использованием любой известной клик-химии, ортоклик-химии, технологии solulink или других биоконъюгатных химических методик, известных специалистам в данной области

техники.

B. Путь синтезирования

[1150] Химерный полинуклеотид может быть получен с использованием ряда начальных сегментов. К таким сегментам относятся:

(a) Кэпированный и защищенный 5′-сегмент, содержащий нормальный 3′-OH (СЕГ. 1)

(b) 5'-трифосфатный сегмент, который может включать кодирующую область полипептида и содержащий нормальный 3'-OH (СЕГ. 2)

(c) 5'-монофосфатный сегмент для 3'-конца химерного полинуклеотида (*например,* хвоста), содержащий кордицепин или не содержащий 3'-OH (СЕГ. 3)

[1151] После синтеза (химического или IVT) сегмент 3 (СЕГ. 3) могут обрабатывать кордицепином, а затем пирофосфатазой для создания 5'-монофосфата.

[1152] Затем сегмент 2 (СЕГ. 2) могут лигировать с СЕГ. 3 с использованием РНК-лигазы. Затем лигированный полинуклеотид могут очищать и обрабатывать пирофосфатазой для расщепления дифосфата. Обработанную конструкция СЕГ.2-СЕГ. 3 затем очищают и СЕГ. 1 лигируют с 5'-концом. Может быть проведен дополнительный этап очистки химерного полинуклеотида.

[1153] Если химерный полинуклеотид кодирует полипептид, лигированные или соединенные сегменты могут быть представлены как: 5'-НТО (СЕГ.1), открытая рамка считывания или ОРС (СЕГ.2) и 3'-НТО+Поли А (СЕГ.3).

[1154] Выходы на каждом этапе могут достигать 90-95 %.

Пример 2

Получение ДНК

[1155] **ПЦР для получения кДНК**

[1156] Процедуры ПЦР для получения кДНК могут выполнять с использованием 2x KAPA HIFI™ HotStart ReadyMix от Kapa Biosystems (Вобурн, штат Массачусетс). Данная система включает 2x KAPA ReadyMix по 12,5 мкл; прямой праймер (10 мкМ) 0,75 мкл; обратный праймер (10 мкМ) 0,75 мкл; матрицу кДНК 100 нг; и dH_20, разбавленный до 25,0 мкл. Условия ПЦР реакции могут быть следующими: 95°C в течение 5 минут и 25 циклов при 98°C в течение 20 секунд, затем при 58°C в течение 15 секунд, затем при 72°C в течение 45 секунд, затем при 72°C в течение 5 минут затем при 4°C до завершения.

[1157] Обратный праймер по данному изобретению может включать поли-T_{120} (SEQ ID NO: 210) для поли-A_{120} (SEQ ID NO: 209) в мРНК. Другие обратные праймеры с более длинными или более короткими поли(Т)-путями можно использовать для регулирования длины хвоста поли(А) в полинуклеотидной мРНК. Альтернативно, хвост поли-А можно добавить к полученной мРНК путем лигирования (см. Пример 5 ниже).

[1158] Реакционную смесь можно очистить с помощью микронабора для ПЦР от Invitrogen PURELINK™ (Карлсбад, Калифорния) в соответствии с инструкциями производителя (до 5 мкг). Более крупные реакции потребуют очистки с использованием продукта большей емкости. После очистки кДНК можно количественно определить с помощью NANODROP™ и проанализировать с помощью электрофореза в агарозном геле, чтобы подтвердить ожидаемый размер кДНК. Затем кДНК можно отправить на анализ секвенирования перед тем, как перейти к реакции транскрипции *in vitro*.

[1159] **Получение ДНК с помощью бактерий**

[1160] Векторы ДНК также могут быть амплифицированы в бактериальных (например, *E. coli*) клетках.

Пример 3:

Транскрипция* in vitro *(IVT)

[1161] Реакции транскрипции *in vitro* могут генерировать полинуклеотиды, содержащие однотипно модифицированные полинуклеотиды. Такие однотипно модифицированные полинуклеотиды могут включать область или часть полинуклеотидов по изобретению. Вводимая смесь нуклеотидтрифосфатов (НТФ) может быть изготовлена с использованием природных и неприродных НТФ.

[1162] Типичная реакция транскрипции *in vitro* может включать следующее:

1 Матрица ДНК — 1,0 мкг

2 10х буфер для транскрипции (400 мМ Трис-HCl pH 8,0, 190 мМ $MgCl_2$, 50 мМ DTT, 10 мМ спермидин)— 2,0 мкл

3 Пользовательские НТФ (всего 25 мМ) — 7,2 мкл

4 Ингибитор РНКазы— 20 ед.

5 РНК-полимераза Т7 — 3000 ед.

6 dH_20— до 20,0 мкл. и

7 Инкубация при 37°С в течение 3-5 часов.

[1163] Неочищенную смесь IVT можно хранить при 4°C в течение ночи для очистки на следующий день. Затем 1 единицу ДНКазы, не содержащей РНКазу, можно использовать для расщепления исходной матрицы. После 15 минут инкубации при 37°C мРНК можно очистить с использованием имеющихся в продаже реагентов, например набора MEGACLEAR™ от Ambion (Остин, Техас), следуя инструкциям производителя. Этот набор способен очистить до 500 мкг РНК. После очистки РНК можно количественно определить с помощью NanoDrop и проанализировать с помощью электрофореза в агарозном геле, чтобы подтвердить, что РНК имеет надлежащий размер и что не произошло деградации РНК.

Пример 4:

Ферментативное кэпирование

[1164] Кэпирование полинуклеотида может быть выполнено смесью, включающей: IVT РНК 60 мкг-180 мкг и dH_20 до 72 мкл. Смесь можно инкубировать при 65°C в течение 5 минут для денатурации РНК, а затем можно сразу перенести на лед.

[1165] Затем протокол может включать смешивание 10x буфера для кэпирования (0,5 М Трис-HCl (pH 8,0), 60 мМ KCl, 12,5 мМ $MgCl_2$) (10,0 мкл); 20 мМ GTP (5,0 мкл); 20 мМ S-аденозилметионина (2,5 мкл); ингибитора РНКазы (100 ЕД); 2'-O-метилтрансферазы (400 ЕД); кэпирующего фермента вируса коровьей оспы (гуанилилтрансфераза) (40 ЕД); dH_20 (до 28 мкл); и инкубацию при 37°C в течение 30 минут для 60 мкг РНК или до 2 часов для 180 мкг РНК.

[1166] Затем полинуклеотид можно очистить, используя, например, набор MEGACLEAR™ от Ambion (Остин, Техас) в соответствии с инструкциями производителя. После очистки РНК можно определить количественно, например, с помощью NANODROP™ (ThermoFisher, Waltham, MA) и проанализировать с помощью электрофореза в агарозном геле, чтобы подтвердить, что РНК имеет надлежащий размер и что не произошло деградации РНК. Продукт РНК также можно секвенировать, запустив ПЦР с обратной транскрипцией для получения кДНК для секвенирования.

Пример 5:

Наращивание хвоста полиА

[1167] **Реакция наращивания хвоста полиА**

[1168] Без поли-Т в кДНК перед очисткой конечного продукта необходимо провести

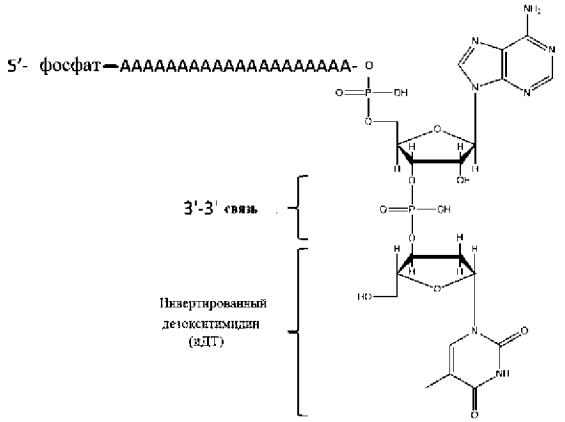
реакцию наращивания хвоста поли-А. Это можно сделать путем смешивания кэпированной IVT РНК (100 мкл); ингибитора РНКазы (20 ЕД); 10х буфера для наращивания хвоста (0,5 М Трис-HCl (pH 8,0), 2,5 М NaCl, 100 мМ $MgCl_2$) (12,0 мкл); 20 мМ АТФ (6,0 мкл); поли-А-полимеразы (20 ЕД); dH_20 до 123,5 мкл и инкубации при 37°С в течение 30 мин. Если хвост поли-А уже присутствует в транскрипте, то реакцию наращивания хвоста можно пропустить и перейти непосредственно к очистке с помощью набора MEGACLEAR™ от Ambion (Остин, Техас) (до 500 мкг). Поли-А-полимераза в некоторых случаях представляет собой рекомбинантный фермент, экспрессируемый в дрожжах.

[1169] Следует понимать, что процессивность или целостность реакции наращивания хвоста полиА не всегда приводит к точному размеру хвоста полиА. Следовательно, хвосты полиА длиной примерно 40-200 нуклеотидов, *например*, около 40, 50, 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 150-165, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164 или 165, входят в объем изобретения.

[1170] **Лигирование ПолиА**

[1171] Конструкции мРНК модифицируют лигированием для стабилизации хвоста поли(А). Лигирование выполняли с использованием 0,5-1,5 мг/мл мРНК (5’ кэп 1, 3’ А100), 50 мМ Трис-HCl pH 7,5, 10 мМ $MgCl_2$, 1 мМ TCEP, 1000 единиц/мл Т4 РНК-лигазы 1, 1 мМ АТФ, 20% мас./об. полиэтиленгликоля 8000 и молярное соотношение модифицирующего олигонуклеотид к мРНК 5:1. Модифицирующий олигонуклеотид имеет последовательность 5'-фосфат-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-(инвертированный дезокситимидин (idT)) (SEQ ID NO: 212) (см. ниже). Реакции лигирования смешивают и инкубируют при комнатной температуре (~22°С) в течение 4 часов. Стабильную мРНК, содержащую хвост, очищают очисткой dT, очисткой с обращенной фазой, очисткой с помощью гидроксиапатита, ультрафильтрацией в воде и стерилизующей фильтрацией. Эффективность лигирования для каждой мРНК составляет >80% по оценке разделения лигированной и нелигированной мРНК с помощью СЭЖХ. Полученные стабильные мРНК, содержащие хвост, содержат следующую структуру на 3'-конце, начиная с области поли-А: A_{100}-UCUAGAAAAAAAAAAAAAAAAAA-инвертированный дезокситимидин (SEQ ID NO: 211).

[1172] Модификация олигонуклеотида для стабилизации хвоста (5’-фосфат-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-(инвертированный дезокситимидин) (SEQ ID NO: 212)):



Пример 6:

Естественные 5'-кэпы и аналоги 5'-кэпов

[1173] 5'-кэпирование полинуклеотидов может быть завершено одновременно во время реакции транскрипции *in vitro* с использованием следующих химических аналогов РНК-кэпа для создания структуры 5'-гуанозинового кэпа в соответствии с протоколами производителя: 3'-O-Me-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'-кэпирование модифицированной РНК может быть завершено посттранскрипционно с использованием кэпирующего фермента вируса коровьей оспы, для создания структуры «Кэп 0»: m7G(5')ppp(5')G (New England BioLabs, Ипсвич, Массачусетс). Структура Кэп 1 может быть получена с помощью как кэпирующего фермента вируса коровьей оспы, так и 2′-O метилтрансферазы с получением: m7G(5')ppp(5')G-2′-O-метила. Структура Кэп 2 может быть получена из структуры Кэп 1 с последующим 2′-O-метилированием 5′-предпредпоследнего нуклеотида, используя 2′-O метилтрансферазу. Структура Кэп 3 может быть получена из структуры Кэп 2 с последующим 2′-O-метилированием 5′-предпредпредпоследнего нуклеотида, используя 2′-O метилтрансферазу. Ферменты могут быть получены из рекомбинантного источника.

[1174] При трансфекции в клетки млекопитающих модифицированные мРНК могут иметь стабильность в течение 12-18 часов или более 18 часов, *например*, 24, 36, 48, 60, 72 или более 72 часов.

Пример 7:

Анализы

A. Анализ экспрессии белка

[1175] Полинуклеотиды, кодирующие полипептид, содержащий любой из описанных в данном документе кэпов, могут быть трансфицированы в клетки в равных концентрациях. Через 6, 12, 24 и 36 часов после трансфекции количество белка, секретируемого в культуральную среду, можно определить с помощью ИФА. Синтетические полинуклеотиды, которые секретируют более высокие уровни белка в среду, будут соответствовать синтетическим полинуклеотидам с более трансляционно-компетентной структурой кэпа.

B. Чистота анализа синтеза

[1176] Полинуклеотиды, кодирующие полипептид, содержащий любой из описанных в данном документе кэпов, можно сравнить на предмет чистоты с помощью денатурирующего электрофореза в агарозно-мочевинном геле или анализа ВЭЖХ. Полинуклеотиды с одного объединенного бэнда с помощью электрофореза соответствуют продукту более высокой чистоты по сравнению с полинуклеотидами с несколькими бэндами или смазанными бэндами. Синтетические полинуклеотиды с одним пиком ВЭЖХ также соответствовали бы продукту более высокой чистоты. Реакция кэпирования с более высокой эффективностью обеспечила бы более чистую популяцию полинуклеотидов.

C. Анализ цитокинов

[1177] Полинуклеотиды, кодирующие полипептид, содержащий любой из описанных в данном документе кэпов, могут быть трансфицированы в клетки в различных концентрациях. Через 6, 12, 24 и 36 часов после трансфекции количество провоспалительных цитокинов, таких как TNF-альфа и IFN-бета, секретируемых в культуральную среду, можно определить с помощью ИФА. Полинуклеотиды, приводящие к секреции более высоких уровней провоспалительных цитокинов в среду, будут соответствовать полинуклеотидам, содержащим структуру иммуноактивирующего кэпа.

D. Эффективность реакции кэпирования

[1178] Полинуклеотиды, кодирующие полипептид, содержащие любой из описанных в данном документе кэпов, могут быть проанализированы на эффективность реакции кэпирования с помощью ЖХ-МС после обработки нуклеазой. Обработка нуклеазой кэпированных полинуклеотидов дает смесь

свободных нуклеотидов и кэпированной 5'-5-трифосфатной структуры кэпа, обнаруживаемой с помощью ЖХ-МС. Количество кэпированного продукта в спектрах ЖХ-МС может быть выражено в процентах от общего количества полинуклеотидов в реакции и будет соответствовать эффективности реакции кэпирования. Структура кэпа с более высокой эффективностью реакции кэпирования будет иметь большее количество кэппированного продукта по данным ЖХ-МС.

Пример 8:

Электрофорез в агарозном геле модифицированной РНК или продуктов ОТ-ПЦР

[1179] Отдельные полинуклеотиды (200–400 нг в объеме 20 мкл) или продукты ПЦР с обратной транскрипцией (200–400 нг) можно загрузить в лунку на неденатурирующем 1,2% агарозном E-геле (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) и прогнать в течение 12-15 минут согласно протоколу производителя.

Пример 9:

Количественное определение модифицированной РНК с помощью Nanodrop и данные УФ-спектра

[1180] Модифицированные полинуклеотиды в буфере TE (1 мкл) можно использовать для измерения УФ-поглощения с помощью Nanodrop для количественной оценки выхода каждого полинуклеотида в результате химического синтеза или реакции транскрипции *in vitro*.

Пример 10:

Приготовление модифицированной мРНК с использованием липидоидов

[1181] Полинуклеотиды могут быть приготовлены для экспериментов *in vitro* путем смешивания полинуклеотидов с липидоидом в заданном соотношении перед добавлением к клеткам. Приготовление *in vivo* может потребовать добавления дополнительных ингредиентов для облегчения циркуляции по всему телу. Чтобы проверить способность этих липидоидов образовывать частицы, подходящие для работы *in vivo*, в качестве отправной точки можно использовать стандартный процесс приготовления, используемый для составов миРНК -липидоид. После образования частицы можно добавить полинуклеотид и дать возможность

интегрироваться в комплекс. Эффективность инкапсуляции можно определить с помощью стандартных анализов исключения красителя.

Пример 11:

Метод скрининга экспрессии белка

A. Ионизация электрораспылением

[1182] Биологический образец, который может содержать белки, кодируемые полинуклеотидом, введенным субъекту, может быть приготовлен и проанализирован в соответствии с протоколом производителя для ионизации электрораспылением (ESI) с использованием 1, 2, 3 или 4 масс-анализаторов. Биологический образец также можно анализировать с помощью тандемной системы масс-спектрометрии ESI.

[1183] Образцы белковых фрагментов или целых белков можно сравнить с известными контролями для данного белка, и путем сравнения можно определить идентичность.

B. Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

[1184] Биологический образец, который может содержать белки, кодируемые одним или несколькими полинуклеотидами, вводимыми субъекту, может быть приготовлен и проанализирован в соответствии с протоколом производителя для матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI).

[1185] Образцы белковых фрагментов или целых белков можно сравнить с известными контролями для данного белка, и путем сравнения можно определить идентичность.

C. Жидкостная хроматография-масс-спектрометрия-масс-спектрометрия

[1186] Биологический образец, который может содержать белки, кодируемые одним или несколькими полинуклеотидами, может быть обработан ферментом трипсином для расщепления содержащихся в нем белков. Полученные пептиды можно анализировать с помощью жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии-масс-спектрометрии (ЖХ/МС/МС). Пептиды могут быть фрагментированы в масс-спектрометре для получения диагностических паттернов, которые можно сопоставить с базами данных последовательностей белков с помощью

компьютерных алгоритмов. Расщепленный образец может быть разбавлен до получения 1 нг или менее исходного материала для данного белка. Биологические образцы, содержащие простой фоновый буфер (*например*, вода или летучие соли), поддаются прямому расщеплению в растворе; более сложные фоны (*например*, детергент, нелетучие соли, глицерин) требуют дополнительной очистки для облегчения анализа образца.

[1187] Образцы белковых фрагментов или целых белков можно сравнить с известными контролями для данного белка, и путем сравнения можно определить идентичность.

Пример 12:

Синтез мРНК, кодирующей CFTR

[1188] Полинуклеотид с оптимизированной последовательностью, кодирующий полипептид CFTR, синтезируют и характеризуют, как описано в Примерах 1-11.

[1189] мРНК, кодирующая CFTR человека, может быть сконструирована, например, с использованием последовательности ОРС (аминокислоты), представленной в SEQ ID NO: 1. Последовательность мРНК включает как 5'-, так и 3'-НТО области, фланкирующие последовательность ОРС (нуклеотид). В иллюстративной конструкции последовательности 5'-НТО и 3'-НТО представляют собой SEQ ID NO: 25 и 45, соответственно.

5′-НТО:

AGGAAAUCGCAAAAUUUGCUCUUCGCGUUAGAUUUCUUUUAGUUUUCUCG
CAACUAGCAAGCUUUUUGUUCUCGCC (SEQ ID NO: 25)

3′-НТО:

UAAGUCUAAGCUGGAGCCUCCUGAGAGACCUGUGUGAACUAUUGAG
AAGAUCGGAACAGCUCCUUACUCUGAGGAAGUUGGUACCCCCGUGG
UCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (SEQ ID NO: 45)

В другой иллюстративной конструкции последовательности 5'-НТО и 3'-НТО представляют собой SEQ ID NO: 24 и 45, соответственно.

5′-НТО:

GGGAAAUCGCAAAAUUUGCUCUUCGCGUUAGAUUUCUUUUAGUUUUCUCG
CAACUAGCAAGCUUUUUGUUCUCGCC (SEQ ID NO: 24)

3′-НТО:

UAAGUCUAAGCUGGAGCCUCCUGAGAGACCUGUGUGAACUAUUGAG
AAGAUCGGAACAGCUCCUUACUCUGAGGAAGUUGGUACCCCCGUGG
UCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (SEQ ID NO: 45)

[1190] Последовательность мРНК CFTR получают в виде модифицированной мРНК. В частности, во время транскрипции in vitro можно создать модифицированную мРНК с использованием N1-метилпсевдоуридин-5'-трифосфата, чтобы гарантировать, что мРНК содержат 100% N1-метилпсевдоуридина вместо уридина. В качестве альтернативы, во время транскрипции in vitro можно создать модифицированную мРНК с использованием N1-метоксиуридин-5'-трифосфата, чтобы убедиться, что мРНК содержат 100% 5-метоксиуридина вместо уридина. Кроме того, мРНК CFTR может быть синтезирована с праймером, который вводит хвост полиА, и структурой кэпа для включения кэпа 1 m^7G-ppp-Gm-AG на 5'-конце или, альтернативно, можно использовать кэпирующий фермент вируса коровьей оспы для ферментативного включения кэпа 1 m7G-pppGmGG на 5'-конце. В качестве альтернативы можно синтезировать мРНК CFTR и ввести хвост полиА во время сборки матрицы ДНК по Гибсону.

[1191] Описание мРНК CFTR (все содержат 100% N1-метилпсевдоуридина вместо уридина), полученных и протестированных в приведенных ниже Примерах, представлено в следующей таблице:

	Последовательность мРНК (за исключением поли-А)	**5′-НТО**	**ОРС**	**3′-НТО**	**Поли-А**
CFTR-01	SEQ ID NO:151	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:143	SEQ ID NO:37	A100 (SEQ ID NO:127)
CFTR-02	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	A100 (SEQ ID

	NO:152	NO:24	NO:142	NO:45	NO:127)
CFTR-03	SEQ ID NO:153	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:142	SEQ ID NO:45	A100-UCUAG-A20-idT (SEQ ID NO: 211)
CFTR-04	SEQ ID NO:152	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:142	SEQ ID NO:45	A100 (SEQ ID NO:127)
CFTR-05	SEQ ID NO:154	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:142	SEQ ID NO:71	A100 (SEQ ID NO:127)
CFTR-06	SEQ ID NO:155	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:143	SEQ ID NO:37	A100 (SEQ ID NO:127)
CFTR-07	SEQ ID NO:156	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:144	SEQ ID NO:37	A100 (SEQ ID NO:127)
CFTR-08	SEQ ID NO:157	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:142	SEQ ID NO:37	A100 (SEQ ID NO: 127)
CFTR-09	SEQ ID NO:151	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:143	SEQ ID NO:37	A100-UCUAG-A20-idT (SEQ ID NO: 211)

Последовательности, соответствующие приведенной выше таблице, представлены в следующей таблице:

SEQ ID NO	**Последовательность**
151	SEQ ID NO: 151 от 5'-конца к 3'-концу состоит из: 5'-HTO SEQ ID NO: 2, последовательность OPC SEQ ID NO: 143 и 3'-HTO SEQ ID NO: 37
152	SEQ ID NO: 152 от 5'-конца к 3'-концу состоит из: 5'-HTO SEQ ID NO: 24, последовательность OPC SEQ ID NO: 142 и 3'-HTO SEQ ID NO: 45
153	SEQ ID NO: 153 от 5’-конца к 3'-концу состоит из: 5'-HTO SEQ ID NO: 25, последовательность OPC SEQ ID NO: 142 и 3'-HTO SEQ ID NO: 45.
154	SEQ ID NO: 154 от 5'-конца к 3'-концу состоит из: 5'-HTO SEQ ID NO: 24, последовательность OPC SEQ ID NO: 142 и 3'-HTO SEQ ID NO: 71

SEQ ID NO	**Последовательность**
155	SEQ ID NO: 155 от 5'-конца к 3'-концу состоит из: 5'-HTO SEQ ID NO: 24, последовательность OPC SEQ ID NO: 143 и 3'-HTO SEQ ID NO: 37
156	SEQ ID NO: 156 от 5'-конца к 3'-концу состоит из: 5'-HTO SEQ ID NO: 2, последовательность OPC SEQ ID NO: 144 и 3'-HTO SEQ ID NO: 37
157	SEQ ID NO: 157 от 5'-конца к 3'-концу состоит из: 5'-HTO SEQ ID NO: 2, последовательность OPC SEQ ID NO: 142 и 3'-HTO SEQ ID NO: 37
2	GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACC
24	GGGAAAUCGCAAAAUUUGCUCUUCGCGUUAGAUUUCUUUUAGUUUUCUCGCAACUAGCAAGCUUUUUGUUCUCGCC
25	AGGAAAUCGCAAAAUUUGCUCUUCGCGUUAGAUUUCUUUUAGUUUUCUCGCAACUAGCAAGCUUUUUGUUCUCGCC
142	AUGCAGCGGAGCCCUCUGGAGAAGGCCAGCGUGGUGAGCAAGCUGUUCUUCAGCUGGACCAGGCCCAUCCUGCGAAAGGGCUACAGACAGAGGCUGGAGCUGUCCGACAUCUACCAGAUUCCAUCCGUGGACAGCGCCGACAAUCUGAGCGAGAAGCUGGAGAGGGAGUGGGACCGCGAGCUGGCCAGCAAGAAGAACCCUAAGCUGAUCAACGCCCUGCGCCGCUGCUUCUUCUGGAGGUUCAUGUUCUACGGCAUCUUCCUGUACCUGGGCGAGGUGACCAAGGCCGUCCAGCCUCUGCUGCUGGGCCGCAUCAUCGCCAGCUACGAUCCCGACAACAAGGAGGAACGCUCCAUCGCCAUCUACCUGGGCAUCGGCCUGUGUCUGCUGUUCAUCGUGCGGACCCUGCUGCUGCACCCCGCCAUCUUCGGCCUGCAUCACAUCGGCAUGCAGAUGAGGAUCGCCAUGUUCUCCCUGAUCUACAAGAAGACCCUGAAGCUGUCCAGCCGCGUGCUGGAUAAGAUCAGCAUCGGGCAGCUGGUGAGCCUGCUGAGCAACAACCUGAACAAGUUCGACGAGGGGUUGGCGCUGGCCCACUUCGUGUGGAUUGCCCCGCUGCAGGUGGCUCUGCUGAUGGGGCUGAUCUGGGAGCUGCUG

SEQ ID NO	Последовательность
	CAGGCCUCUGCCUUCUGCGGGCUGGGGUUUCUGAUCGUG CUGGCCCUGUUCCAAGCUGGCCUGGGCCGCAUGAUGAUG AAGUACCGCGAUCAGAGGGCCGGCAAGAUCAGCGAGCGC CUGGUGAUCACUAGCGAGAUGAUAGAGAACAUCCAGAG CGUGAAGGCUUACUGUUGGGAGGAGGCCAUGGAGAAGA UGAUCGAGAACCUGAGGCAGACCGAGCUGAAGCUGACU AGAAAGGCAGCCUACGUGAGGUAUUUCAACUCCAGCGCC UUCUUCUUCAGCGGCUUCUUCGUGGUGUUCCUGAGCGU GCUGCCCUACGCCCUGAUCAAGGGCAUCAUCCUGAGGAA GAUCUUCACCACCAUUAGCUUCUGCAUCGUGCUGCGCAU GGCCGUGACCAGGCAGUUCCCUUGGGCCGUGCAGACUUG GUACGACAGCCUGGGAGCCAUCAACAAGAUCCAGGACUU UCUGCAGAAGCAGGAAUAUAAGACCCUGGAGUACAACC UGACCACCACCGAGGUGGUGAUGGAGAACGUGACCGCCU UCUGGGAGGAGGGCUUCGGCGAGCUGUUCGAGAAGGCC AAGCAGAACAAUAACAACCGCAAGACCAGCAACGGCGAC GACUCCCUCUUCUUCAGCAACUUUAGCCUGCUGGGCACC CCUGUGCUGAAGGACAUCAACUUCAAGAUCGAAAGAGG CCAACUGCUGGCCGUGGCCGGAUCUACCGGCGCCGGCAA GACCAGCCUGCUGAUGAUGAUCAUGGGCGAGCUGGAGC CCAGCGAGGGCAAGAUCAAGCACAGCGGCCGGAUCUCCU UCUGCUCCCAGUUCUCCUGGAUCAUGCCCGGCACCAUCA AGGAGAACAUCAUCUUCGGCGUGAGCUACGACGAGUAC AGGUACCGGAGCGUGAUCAAGGCCUGCCAGCUGGAGGA GGACAUCUCCAAAUUUGCCGAGAAGGACAACAUUGUGC UGGGCGAAGGCGGGAUCACCCUGUCCGGUGGCCAGCGUG CACGCAUCUCCCUGGCCCGGGCUGUGUACAAGGACGCCG ACCUGUACCUGCUGGACAGCCCUUUUGGCUACCUGGACG UGCUGACCGAGAAGGAGAUCUUCGAGUCCUGCGUGUGU AAGCUGAUGGCCAACAAGACCAGAAUCCUGGUGACCAGC AAGAUGGAGCAUCUGAAGAAGGCCGACAAGAUCCUGAU CCUGCACGAGGGGUCCAGCUACUUCUACGGCACCUUCAG

SEQ ID NO	Последовательность
	CGAGCUGCAGAACCUGCAGCCCGACUUCAGCUCCAAGCU GAUGGGCUGCGAUAGCUUCGACCAGUUCUCCGCCGAGAG AAGGAACUCCAUUCUGACCGAGACCCUGCACCGAUUCUC CCUGGAGGGAGACGCCCCAGUGAGCUGGACCGAGACCAA GAAGCAGAGCUUCAAGCAGACCGGCGAGUUCGGAGAGA AGCGCAAGAACUCCAUCCUCAACCCCAUCAACAGCAUCC GGAAGUUCAGCAUCGUGCAGAAGACCCCUCUGCAGAUG AACGGGAUCGAGGAGGACAGCGACGAGCCCCUGGAACG GCGACUGUCCCUCGUGCCCGACAGCGAGCAGGGCGAGGC CAUCCUGCCCCGGAUCUCCGUGAUCUCCACUGGGCCCAC CCUGCAAGCCCGACGGCGGCAAAGCGUGCUGAACCUGAU GACCCACAGCGUGAACCAGGGCCAGAAUAUCCACCGCAA GACUACAGCCAGCACCCGCAAGGUGAGCCUGGCUCCCCA GGCCAACCUGACCGAGCUGGACAUCUACAGCAGGAGGCU GAGCCAGGAGACAGGCCUGGAGAUCAGCGAGGAGAUCA ACGAGGAGGACCUGAAGGAGUGCUUCUUCGACGACAUG GAGUCCAUCCCCGCCGUGACCACCUGGAACACCUACCUG AGAUACAUCACCGUGCACAAGAGCCUGAUCUUCGUGCUG AUCUGGUGCCUGGUGAUCUUCUUGGCCGAGGUAGCCGCC UCACUGGUGGUGCUGUGGCUGCUGGGCAAUACCCCACUG CAGGACAAGGGGAACUCCACCCACAGCCGGAACAACAGC UACGCCGUGAUCAUCACCUCCACCAGCAGCUACUACGUG UUCUACAUCUACGUGGGCGUGGCCGACACACUGCUGGCC AUGGGCUUCUUCAGAGGCCUCCCUCUGGUGCACACACUG AUCACCGUGAGCAAGAUCCUGCACCACAAGAUGCUGCAC AGCGUGCUGCAGGCUCCCAUGUCAACCCUGAACACCCUG AAGGCCGGCGGCAUCCUGAACAGGUUCAGCAAGGACAUC GCCAUUCUGGACGAUCUGCUGCCCCUGACCAUCUUCGAC UUCAUCCAGCUGCUGCUGAUCGUGAUCGGGGCCAUCGCC GUGGUGGCCGUGCUGCAGCCCUACAUCUUCGUGGCCACA GUGCCCGUGAUCGUGGCCUUCAUCAUGCUGCGCGCCUAC UUCCUGCAGACCUCCCAGCAGCUGAAGCAGCUGGAGAGC

SEQ ID NO	**Последовательность**
	GAAGGCCGCAGCCCCAUCUUCACCCACCUGGUGACUAGC
	CUGAAGGGGCUGUGGACCCUGCGCGCCUUCGGCAGGCAG
	CCCUACUUCGAGACCCUGUUCCACAAGGCUCUGAACCUG
	CACACCGCCAACUGGUUCCUGUACCUCAGCACCCUGCGC
	UGGUUCCAGAUGCGGAUCGAGAUGAUCUUCGUGAUCUU
	CUUCAUCGCCGUGACCUUCAUCUCCAUCCUGACCACCGG
	GGAAGGCGAGGGACGGGUGGGAAUCAUCCUGACCCUGG
	CCAUGAAUAUCAUGAGCACCCUGCAGUGGGCCGUGAACA
	GCAGCAUCGACGUGGACAGCCUGAUGCGGUCCGUGUCCC
	GGGUGUUCAAGUUCAUCGACAUGCCCACCGAGGGCAAGC
	CCACCAAGAGCACCAAGCCCUACAAGAACGGCCAGCUGA
	GCAAGGUGAUGAUUAUCGAGAACAGCCACGUGAAGAAG
	GACGACAUCUGGCCUUCCGGCGGCCAGAUGACCGUGAAG
	GACCUGACCGCCAAGUACACCGAGGGCGGCAACGCCAUC
	CUGGAGAACAUCAGCUUCUCCAUUAGCCCUGGACAGCGG
	GUGGGCCUGUUGGGACGGACCGGCAGUGGGAAGAGCAC
	CCUGCUGUCCGCCUUCCUGCGGCUGCUGAACACGGAGGG
	CGAGAUCCAGAUCGACGGGGUGAGCUGGGACAGCAUCA
	CCCUGCAGCAGUGGCGAAAGGCCUUCGGCGUGAUCCCAC
	AGAAGGUGUUUAUUUUCUCUGGCACCUUUAGGAAGAAC
	CUGGACCCCUACGAGCAGUGGUCCGACCAGGAGAUCUGG
	AAGGUGGCCGACGAGGUGGGCCUGCGGUCAGUGAUCGA
	GCAGUUCCCCGGCAAGCUGGACUUCGUGCUGGUGGACGG
	CGGCUGCGUGCUGAGCCACGGCCACAAGCAGCUGAUGUG
	CCUGGCACGCAGCGUGCUGAGCAAGGCCAAGAUCCUGCU
	GCUGGACGAGCCCUCCGCGCACCUGGAUCCCGUGACCUA
	CCAGAUCAUCAGGCGGACCCUGAAGCAGGCCUUCGCCGA
	CUGCACCGUGAUCCUGUGCGAGCACAGAAUCGAGGCUAU
	GCUGGAGUGCCAGCAGUUCCUGGUGAUCGAGGAGAACA
	AGGUGCGGCAGUACGACUCCAUCCAGAAGCUGCUGAACG
	AGCGCAGCCUGUUCAGACAGGCUAUCUCUCCCAGCGAUC
	GCGUGAAGCUGUUCCCUCACAGGAACAGCAGCAAGUGCA

SEQ ID NO	**Последовательность**
	AGUCUAAGCCACAGAUCGCCGCCCUGAAGGAGGAGACCG AGGAGGAGGUGCAGGAUACCCGCCUG
143	AUGCAGAGGAGCCCACUUGAGAAGGCCUCCGUCGUGUCC AAGCUGUUCUUCAGCUGGACCCGGCCUAUCCUUCGGAAG GGCUACAGGCAGAGGCUCGAGCUCAGCGACAUCUACCAG AUACCGUCCGUGGAUUCAGCCGAUAACCUCAGCGAGAAG CUGGAGCGGGAGUGGGACAGGGAACUGGCCUCCAAGAA GAACCCUAAGCUGAUUAACGCCCUGCGGCGGUGCUUCUU CUGGAGGUUCAUGUUCUAUGGCAUUUUCCUCUACCUGG GCGAGGUGACCAAGGCUGUCCAGCCACUGCUGCUGGGCA GAAUCAUCGCGAGCUACGAUCCAGAUAACAAGGAGGAG CGGUCGAUCGCCAUUUAUCUGGGCAUCGGCCUGUGCCUG CUGUUCAUCGUCCGGACCCUGCUGCUGCACCCUGCCAUC UUCGGCCUGCACCACAUAGGCAUGCAGAUGAGGAUCGCC AUGUUCAGCCUCAUCUACAAGAAGACCCUCAAGCUGAGC AGCAGAGUGCUCGAUAAGAUCUCCAUCGGCCAGCUGGU GUCCCUGCUCUCCAACAACCUGAACAAGUUCGACGAGGG CCUGGCCCUGGCCCACUUCGUGUGGAUUGCCCCGCUGCA GGUGGCCCUGCUGAUGGGACUCAUCUGGGAACUGCUGC AGGCCAGCGCCUUCUGCGGCCUGGGCUUCCUGAUCGUGC UGGCCCUGUUCCAGGCUGGCCUGGGCCGCAUGAUGAUGA AGUACCGGGACCAGAGAGCCGGCAAGAUCUCCGAGAGGC UGGUCAUCACCAGCGAGAUGAUUGAGAACAUCCAGAGU GUGAAGGCCUACUGCUGGGAGGAGGCCAUGGAGAAGAU GAUCGAGAACCUGAGGCAGACCGAACUGAAGCUGACCCG GAAGGCCGCCUACGUGAGGUACUUCAACAGCUCGGCCUU CUUCUUCAGCGGCUUCUUCGUGGUGUUCCUGAGCGUGCU GCCGUACGCGCUGAUAAAGGGCAUCAUCCUCCGGAAGAU CUUCACCACCAUAAGCUUCUGCAUCGUGCUGAGAAUGGC CGUCACCAGACAAUUCCCAUGGGCCGUGCAGACCUGGUA CGACUCGCUGGGCGCCAUCAAUAAGAUCCAGGACUUCCU GCAGAAGCAGGAGUACAAGACCCUCGAGUACAACCUGAC

SEQ ID NO	**Последовательность**
	CACCACCGAAGUGGUGAUGGAGAACGUUACCGCUUUCU
	GGGAAGAAGGCUUCGGCGAGCUGUUCGAGAAGGCCAAG
	CAGAACAAUAACAACCGGAAGACCAGCAACGGCGACGAC
	AGCCUGUUCUUCUCGAACUUCAGCCUCCUGGGAACCCCA
	GUGCUCAAGGACAUCAACUUCAAGAUCGAGCGCGGCCAA
	CUGCUGGCCGUGGCCGGCAGCACGGGCGCCGGAAAGACC
	UCCUUGCUGAUGAUGAUCAUGGGAGAGCUGGAGCCGAG
	CGAGGGCAAGAUCAAGCAUAGCGGCCGGAUUUCAUUCU
	GCAGCCAGUUCUCCUGGAUCAUGCCUGGCACCAUCAAGG
	AGAAUAUCAUUUUCGGCGUGAGCUAUGAUGAGUACCGG
	UACCGGUCCGUCAUCAAGGCCUGCCAGCUGGAGGAGGAC
	AUCAGCAAGUUCGCCGAGAAGGACAAUAUUGUGCUCGG
	UGAAGGCGGCAUCACCCUGAGCGGCGGCCAGAGGGCCCG
	CAUCAGCCUGGCCCGGGCCGUGUACAAGGAUGCCGAUCU
	UUAUCUGCUGGACAGCCCUUUCGGCUACCUCGACGUGCU
	GACCGAGAAGGAGAUCUUCGAGAGCUGUGUGUGCAAGC
	UCAUGGCCAACAAGACCAGGAUCCUGGUGACCUCCAAGA
	UGGAGCACCUGAAGAAGGCCGACAAGAUCCUCAUCCUGC
	AUGAAGGCUCCAGCUACUUCUACGGCACCUUCAGCGAGC
	UGCAGAACCUCCAGCCAGAUUUCAGCAGCAAGCUGAUGG
	GCUGCGACAGCUUCGACCAGUUCAGCGCCGAGCGGCGGA
	ACAGCAUCCUCACCGAGACACUGCAUCGGUUCUCCCUGG
	AAGGUGACGCCCCAGUGAGCUGGACCGAAACCAAGAAGC
	AGAGCUUCAAGCAGACGGGAGAGUUCGGAGAGAAGAGA
	AAGAACUCCAUCCUGAACCCGAUUAAUAGUAUCCGCAAG
	UUCAGCAUCGUGCAGAAGACCCCUCUGCAAAUGAACGGC
	AUCGAGGAGGACUCCGAUGAGCCGCUCGAAAGGCGCCUC
	AGCCUGGUGCCUGAUUCUGAGCAGGGAGAGGCCAUCCU
	GCCGAGGAUCUCCGUGAUAAGCACCGGCCCAACCCUGCA
	AGCCCGCCGCCGGCAGUCCGUCCUGAAUCUGAUGACCCA
	CAGCGUGAAUCAGGGCCAGAACAUCCACAGAAAGACCAC
	CGCCAGCACGCGGAAGGUGUCCCUCGCCCCACAGGCCAA

SEQ ID NO	**Последовательность**
	CUUAACAGAGCUGGACAUCUACAGCAGGCGGCUGAGCCA GGAAACCGGACUGGAGAUCAGCGAAGAAAUCAAUGAGG AGGAUCUGAAGGAGUGUUUCUUCGACGACAUGGAGUCC AUCCCGGCUGUGACCACAUGGAACACCUACCUCAGAUAC AUCACCGUGCAUAAGAGCCUCAUAUUCGUGCUGAUCUG GUGUCUCGUGAUCUUCCUGGCCGAGGUGGCCGCCUCACU GGUGGUGCUGUGGCUCCUGGGCAACACUCCGCUCCAAGA CAAGGGCAACAGCACCCACAGCAGGAACAACAGCUACGC CGUGAUCAUAACCAGCACAAGCUCCUAUUAUGUGUUCU AUAUCUAUGUUGGAGUUGCCGACACCCUGCUGGCCAUG GGUUUCUUCCGGGGCCUGCCACUGGUCCACACCCUGAUC ACCGUGAGCAAGAUCCUGCACCAUAAGAUGCUGCACAGC GUGCUCCAGGCACCGAUGAGCACCCUGAACACACUCAAG GCCGGCGGUAUCCUGAACAGGUUCUCAAAGGACAUCGCU AUACUGGAUGACCUGUUGCCGCUUACAAUCUUCGACUUC AUCCAGCUGCUGCUGAUCGUCAUCGGCGCCAUCGCCGUG GUGGCGGUCCUGCAACCGUACAUUUUCGUAGCCACGGUG CCUGUGAUUGUCGCCUUCAUCAUGCUGCGUGCCUAUUUC CUCCAAACCUCCCAGCAGCUGAAGCAGCUGGAGUCCGAA GGCAGGAGCCCAAUCUUCACCCACCUGGUCACCUCCCUG AAGGGCCUGUGGACCCUGAGGGCCUUCGGACGGCAGCCG UAUUUCGAGACGCUGUUCCACAAGGCCCUGAACCUUCAC ACCGCCAACUGGUUCCUGUACCUGAGCACGCUGCGCUGG UUCCAGAUGCGCAUCGAGAUGAUCUUCGUCAUCUUCUUC AUCGCGGUGACCUUCAUUUCCAUUCUGACCACCGGCGAG GGAGAGGGCCGGGUCGGCAUUAUCCUGACCCUGGCCAUG AACAUCAUGUCCACACUCCAGUGGGCCGUGAAUAGCAGC AUCGAUGUGGAUAGCCUGAUGCGGAGCGUGUCCCGGGU GUUCAAGUUCAUCGACAUGCCGACCGAAGGCAAGCCGAC CAAGAGCACCAAGCCGUAUAAGAAUGGCCAACUCAGCAA GGUAAUGAUCAUCGAGAACUCACAUGUCAAGAAGGACG ACAUCUGGCCAAGCGGAGGCCAAAUGACCGUGAAGGAC

SEQ ID NO	**Последовательность**
	UUAACCGCCAAGUACACUGAAGGCGGUAACGCCAUCUUA GAGAACAUCUCCUUCUCCAUCAGCCCGGGCCAGCGCGUC GGACUGCUCGGAAGGACCGGCAGCGGCAAGUCGACCCUC CUCAGCGCAUUCCUGCGUCUGCUGAACACAGAAGGUGAG AUCCAGAUCGAUGGCGUGUCGUGGGACAGCAUCACUCU GCAGCAGUGGAGGAAGGCGUUCGGAGUGAUCCCUCAGA AGGUGUUCAUCUUCUCCGGUACCUUCCGGAAGAAUCUG GACCCGUACGAGCAGUGGUCCGACCAGGAGAUUUGGAA GGUGGCAGACGAGGUGGGCCUGAGAAGCGUGAUCGAGC AGUUCCCGGGCAAGCUGGACUUCGUGCUGGUGGAUGGA GGCUGCGUGCUGUCCCACGGCCACAAGCAGCUGAUGUGC UUGGCCCGCAGCGUCCUGUCCAAGGCAAAGAUCCUCCUC CUGGACGAGCCAAGCGCCCACCUGGACCCAGUGACCUAU CAGAUCAUCAGAAGGACCCUGAAGCAGGCCUUCGCCGAC UGCACCGUGAUCCUGUGCGAGCACAGGAUCGAGGCCAUG CUCGAAUGCCAGCAAUUCCUGGUGAUCGAGGAGAACAA GGUCCGGCAAUACGAUUCGAUCCAGAAGCUGCUCAAUG AAAGGAGCCUCUUCCGCCAGGCCAUCUCCCCAAGCGACA GGGUGAAGCUGUUCCCGCACCGGAACAGCUCCAAGUGCA AGAGCAAGCCUCAGAUCGCCGCCCUGAAGGAGGAAACCG AGGAGGAGGUGCAGGACACCAGGCUG
144	AUGCAGCGGUCUCCUCUGGAGAAGGCCAGCGUGGUGAG CAAGCUGUUCUUUAGCUGGACCAGGCCCAUCCUGAGGAA GGGCUACCGGCAGCGCCUGGAGCUGUCCGACAUCUACCA GAUCCCCUCUGUGGACAGCGCCGACAACCUGUCCGAGAA GCUGGAGAGGGAGUGGGACCGGGAGCUGGCCAGCAAGA AGAACCCCAAGCUGAUCAACGCCCUGAGGCGCUGCUUCU UCUGGAGAUUCAUGUUCUACGGCAUCUUCCUGUACCUG GGCGAGGUGACCAAGGCCGUGCAGCCCCUGCUGCUUGGC CGGAUCAUCGCCAGCUACGACCCCGACAACAAGGAGGAG CGGUCCAUCGCCAUCUACCUGGGAAUCGGCCUGUGCCUG CUGUUCAUCGUGCGCACACUGCUGCUGCACCCCGCCAUC

SEQ ID NO	Последовательность
	UUCGGCCUGCACCACAUCGGCAUGCAGAUGCGCAUCGCC AUGUUCUCCCUGAUCUACAAGAAGACACUGAAGCUGUCC UCCCGGGUGCUGGACAAGAUCAGCAUCGGCCAGCUGGUG AGCCUGCUGUCCAACAACCUGAACAAGUUCGACGAGGGC CUGGCCUUGGCCCACUUCGUGUGGAUCGCCCCUCUGCAG GUGGCCCUGCUGAUGGGCCUGAUCUGGGAGCUGCUGCA GGCCAGCGCUUUCUGCGGCCUGGGCUUCCUGAUCGUGCU GGCCCUGUUCCAAGCUGGCCUGGGCCGGAUGAUGAUGA AGUACCGCGAUCAGAGAGCCGGCAAGAUCAGCGAGCGCC UGGUAAUCACCAGCGAGAUGAUCGAGAACAUCCAGAGC GUGAAGGCCUACUGUUGGGAGGAGGCCAUGGAGAAGAU GAUAGAGAAUCUGCGGCAGACCGAGCUGAAGCUGACCA GGAAGGCCGCCUACGUGCGCUACUUCAACUCCAGCGCCU UCUUCUUCUCCGGCUUCUUCGUGGUGUUCCUGAGCGUGC UGCCCUACGCCCUGAUCAAGGGCAUCAUCCUGCGCAAGA UCUUCACCACCAUCAGCUUCUGCAUCGUGCUGCGGAUGG CCGUGACCCGGCAGUUCCCCUGGGCCGUGCAGACCUGGU ACGACAGCCUGGGCGCCAUCAACAAGAUCCAGGACUUCC UGCAGAAGCAGGAGUACAAGACCCUGGAGUACAACCUG ACCACCACCGAGGUGGUGAUGGAGAACGUGACCGCCUUC UGGGAGGAGGGCUUCGGCGAGCUGUUCGAGAAGGCCAA GCAGAACAACAACAACCGCAAGACAUCUAACGGCGACGA CAGCCUGUUCUUCUCAAACUUCAGCCUGCUGGGCACCCC AGUGCUGAAGGACAUCAACUUCAAGAUCGAGCGCGGCC AACUGCUGGCCGUGGCCGGAUCCACCGGUGCCGGAAAGA CCAGCCUGCUGAUGAUGAUCAUGGGCGAGCUGGAGCCCA GCGAGGGGAAGAUCAAGCACAGCGGCAGGAUCUCCUUC UGCAGCCAGUUCUCCUGGAUCAUGCCCGGCACCAUCAAG GAGAACAUCAUCUUCGGCGUGUCCUACGACGAGUACAG AUACCGGUCCGUGAUCAAGGCCUGCCAGCUGGAGGAGG ACAUCAGCAAGUUCGCCGAGAAGGACAACAUCGUGCUG GGCGAAGGCGGAAUCACCCUGUCCGGCGGCCAGAGAGCU

SEQ ID NO	Последовательность
	AGGAUUAGCCUGGCCAGGGCCGUGUACAAGGACGCCGAC CUGUACCUGCUGGACAGCCCCUUCGGCUACCUGGACGUG CUGACCGAGAAGGAGAUCUUCGAGAGCUGCGUGUGCAA GCUGAUGGCCAACAAGACCAGGAUUCUGGUUACCAGCA AGAUGGAGCACCUGAAGAAGGCCGACAAGAUCCUGAUC CUGCACGAGGGAAGCAGCUACUUCUACGGCACCUUCAGC GAGCUGCAGAACCUGCAGCCCGACUUCAGCUCCAAGCUG AUGGGCUGCGACAGCUUCGACCAGUUCAGCGCCGAGAGG CGGAACAGCAUCCUGACUGAGACCCUGCACCGGUUUAGC CUCGAGGGCGACGCUCCAGUGAGCUGGACCGAGACCAAG AAGCAGAGCUUCAAGCAGACCGGCGAGUUCGGCGAGAA GCGGAAGAAUAGCAUCCUCAACCCCAUCAACUCCAUCCG CAAGUUCAGCAUCGUGCAGAAGACCCCUCUGCAGAUGAA CGGCAUCGAGGAGGACAGCGACGAGCCACUGGAGCGCCG GCUGUCCCUGGUGCCCGACAGCGAGCAGGGCGAGGCCAU CCUGCCUAGAAUCAGCGUGAUCUCUACUGGCCCCACCCU UCAGGCCAGACGGCGGCAGAGCGUGCUGAACCUGAUGAC UCACUCUGUGAACCAGGGACAGAACAUCCACCGGAAGAC CACCGCCAGCACCCGGAAGGUGAGCCUGGCACCCCAGGC CAACCUGACCGAGCUGGACAUCUACAGCAGGAGGCUGAG CCAGGAGACCGGCCUGGAGAUCUCCGAGGAGAUCAACGA GGAAGACCUGAAGGAGUGCUUCUUCGACGACAUGGAGA GCAUCCCCGCCGUGACCACUUGGAACACCUACCUGCGCU ACAUCACCGUGCACAAGAGCCUGAUCUUCGUGCUGAUCU GGUGCCUGGUGAUCUUCCUGGCAGAGGUGGCCGCCAGCC UGGUGGUGCUGUGGCUGCUGGGCAAUACCCCUCUUCAG GACAAGGGCAACAGCACCCACAGCCGGAACAACAGCUAC GCCGUGAUCAUCACCAGCACCUCAUCCUACUACGUGUUC UACAUCUACGUGGGCGUGGCCGAUACCCUGCUGGCUAUG GGCUUCUUCCGCGGCCUGCCUCUGGUGCACACCCUGAUC ACCGUGAGCAAGAUCCUGCACCACAAGAUGCUGCACUCC GUGCUGCAGGCCCCUAUGUCCACCCUGAACACCCUGAAG

SEQ ID NO	**Последовательность**
	GCCGGCGGCAUCCUGAACCGCUUCAGCAAGGACAUCGCU AUCCUGGACGACCUGCUGCCUCUGACCAUCUUCGACUUC AUCCAGCUGCUGCUGAUCGUGAUCGGCGCCAUCGCCGUG GUGGCCGUGCUGCAGCCUUACAUCUUCGUGGCCACCGUG CCAGUGAUCGUGGCCUUCAUCAUGCUGCGGGCCUACUUC CUCCAGACCUCUCAGCAGCUGAAGCAGCUGGAGUCCGAG GGCAGGAGCCCCAUCUUCACCCACCUGGUGACCAGCCUG AAGGGGCUGUGGACCCUGCGGGCCUUCGGCAGGCAGCCA UACUUCGAGACCCUGUUCCACAAGGCCCUGAACCUGCAC ACCGCCAACUGGUUCCUGUACCUCAGCACCCUGAGGUGG UUCCAGAUGAGGAUCGAGAUGAUCUUCGUCAUCUUCUU CAUCGCCGUGACCUUCAUCUCCAUCCUGACCACCGGAGA AGGCGAGGGCCGCGUUGGAAUCAUCCUGACCCUGGCCAU GAACAUCAUGAGCACCCUGCAGUGGGCCGUGAACUCCAG CAUCGACGUGGACUCCCUGAUGCGGUCCGUGUCCAGGGU GUUCAAGUUCAUCGACAUGCCCACCGAGGGCAAGCCCAC CAAGUCCACCAAGCCCUACAAGAACGGCCAGCUGAGCAA GGUGAUGAUCAUCGAGAACUCCCACGUGAAGAAGGACG ACAUCUGGCCCUCAGGCGGCCAGAUGACCGUGAAGGACC UGACCGCCAAGUACACAGAGGGCGGCAACGCCAUCCUGG AGAACAUCAGCUUCAGCAUCAGCCCUGGCCAGCGGGUAG GCCUGUUGGGCCGCACUGGUUCCGGCAAGUCCACCCUGC UGAGCGCCUUCCUGCGCCUGCUGAACACCGAGGGCGAGA UCCAGAUCGACGGCGUGAGCUGGGAUAGCAUCACCCUGC AGCAGUGGCGGAAGGCCUUCGGCGUGAUUCCCCAGAAG GUGUUUAUCUUCAGCGGCACCUUCCGGAAGAACCUGGAC CCCUACGAGCAGUGGAGCGAUCAGGAGAUCUGGAAGGU GGCCGACGAGGUGGGCCUGAGAUCCGUGAUCGAGCAGU UCCCCGGCAAGCUGGACUUCGUGCUGGUGGACGGCGGCU GCGUGCUGAGCCACGGCCACAAGCAGCUGAUGUGCCUGG CCAGGAGCGUGCUGUCCAAGGCCAAGAUCCUGCUGCUGG ACGAGCCCAGCGCCCACCUGGAUCCCGUGACCUACCAGA

SEQ ID NO	**Последовательность**
	UCAUCAGGCGGACCCUGAAGCAGGCCUUUGCCGACUGCA CCGUGAUCCUGUGCGAGCACAGGAUCGAGGCCAUGCUGG AGUGCCAGCAGUUCCUGGUGAUCGAGGAGAAUAAGGUG CGCCAGUACGACAGCAUCCAGAAGCUGCUGAACGAGCGG UCUCUGUUCCGCCAGGCCAUCUCACCCAGCGACCGGGUG AAGCUGUUCCCGCACCGGAACAGCAGCAAGUGCAAGAGC AAGCCCCAGAUCGCCGCCCUGAAGGAGGAGACCGAGGAG GAGGUGCAGGACACCCGCCUG
37	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGC CCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCAC CCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGC GGC
45	UAAGUCUAAGCUGGAGCCUCCUGAGAGACCUGUGUGAA CUAUUGAGAAGAUCGGAACAGCUCCUUACUCUGAGGAA GUUGGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGG GCGGC
71	UAAAGCUAAGCUGGAGCCUCUACACAUUGCUUCUAGUU GGCAGAAAUAAUUGAUUAAAAGACCAGAAACUGUGAUA ACUGGUACCCCCGUGGUCUUUAAAUAAAGUCUAAGUGG GCGGC

Пример 13

Обнаружение экспрессии эндогенного CFTR *in vitro*

[1192] Экспрессия CFTR характерна для различных клеточных линий, полученных как от мышей, так и от человека. Клетки культивируют в стандартных условиях и получают клеточные экстракты, помещая клетки в лизирующий буфер. Для целей сравнения также готовят соответствующие контроли. Для анализа экспрессии CFTR из тестируемых клеток готовят образцы лизата, смешивают с буфером для загрузки образцов с додецилсульфатом лития и подвергают стандартному вестерн-блоттингу. Для обнаружения CFTR используемое антитело представляет собой коммерческое антитело против CFTR. Для обнаружения контроля нагрузки используемое антитело

представляет собой антитело против глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH).

[1193] Эндогенную экспрессию CFTR можно использовать в качестве исходной линии для определения изменений экспрессии CFTR в результате трансфекции мРНК, содержащей нуклеиновые кислоты, кодирующие CFTR.

Пример 14:

Мутант CFTR человека и химерные конструкции

[1194] Полинуклеотид по данному изобретению может содержать по меньшей мере первую область связанных нуклеозидов, кодирующую CFTR человека, которая может быть сконструирована, экспрессирована и охарактеризована в соответствии с приведенными выше примерами. Аналогично, полинуклеотидная последовательность может содержать одну или несколько мутаций, которые приводят к экспрессии CFTR человека с повышенной или пониженной активностью. Кроме того, полинуклеотидная последовательность, кодирующая CFTR, может быть частью конструкции, кодирующей химерный слитый белок.

Пример 15:

Производство композиций наночастиц

A. Производство композиций ядра наночастиц

[1195] Наночастицы могут быть получены с помощью процессов смешивания, таких как микрофлюидика и Т-образное смешивание двух потоков жидкости, один из которых содержит полинуклеотид, а другой - липидные компоненты.

[1196] Композиции липидного ядра получают путем объединения ионизируемого аминолипида, описанного в данном документе, например, липида формулы (I), такого как Соединение II, или липида формулы (III), такого как Соединение VI, фосфолипида (такого как DOPE или DSPC, поставляемых Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), ПЭГ-липидов (например, 1,2-димиристоил-sn-глицеринметоксиполиэтиленгликоля, также известного как ПЭГ-ДМГ, поставляемого Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) и структурных липидов (таких как холестерин, поставляемый Sigma Aldrich, Тауфкирхен, Германия, или кортикостероид (такой как преднизолон, дексаметазон, преднизон и гидрокортизон) или их комбинации) в концентрациях около 50 мМ в этаноле. Растворы следует

хранить в холодильнике при температуре, например, -20°C. Липиды объединяют для получения желаемых молярных соотношений и разбавляют водой и этанолом до конечной концентрации липидов от около 5,5 мМ до около 25 мМ.

[1197] Композиции наночастиц, включающие полинуклеотид и липидную композицию, получают путем объединения липидного раствора с раствором, включающим полинуклеотид, при соотношении масс.:масс. липидной композиции к полинуклеотиду от около 5:1 до около 50:1. Липидный раствор быстро вводят с помощью системы на основе микрожидкости NanoAssemblr со скоростью потока от около 10 мл/мин до около 18 мл/мин в раствор полинуклеотида для получения суспензии с соотношением воды к этанолу от около 1:1 до около 4:1.

[1198] Для композиций наночастиц, включающих РНК, растворы РНК в концентрации 0,1 мг/мл в деионизированной воде разбавляют в 50 мМ буфере цитрата натрия при pH от 3 до 4 с получением исходного раствора.

[1199] Композиции наночастиц могут быть обработаны диализом для удаления этанола и замены буфера. Препараты дважды подвергают диализу фосфатно-солевого буфера (ФСБ), pH 7,4, в объемах, в 200 раз превышающих объемы первичного продукта, с использованием кассет Slide-A-Lyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., Рокфорд, Иллинойс) с порогом молекулярной массы 10 кДа. Первый диализ проводят при комнатной температуре в течение 3 часов. Затем составы подвергают диализу в течение ночи при 4°C. Полученную суспензию наночастиц фильтруют через стерильные фильтры 0,2 мкм (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) в стеклянные флаконы и закупоривают обжимными крышками. Обычно получают растворы композиции наночастиц от 0,01 мг/мл до 0,10 мг/мл.

[1200] Описанный выше метод вызывает наноосаждение и образование частиц. Альтернативные процессы, включая, помимо прочего, использование смесителей с Т-образным соединением и прямую инъекцию, можно использовать для достижения аналогичной нанопреципитации.

B. Характеристика композиций наночастиц

[1201] Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Малверн, Вустершир, Великобритания) можно использовать для определения размера частиц, индекса полидисперсности (PDI) и дзета-потенциала композиций наночастиц в 1×ФСБ при определении размера частиц и 15 мМ ФСБ при определении дзета-потенциала.

[1202] Ультрафиолетовая видимая спектроскопия может использоваться для определения концентрации полинуклеотида (например, РНК) в композициях наночастиц. 100 мкл разведенного состава в 1×ФСБ добавляют к 900 мкл смеси

метанола и хлороформа 4:1 (об./об.). После смешивания регистрируют спектр поглощения раствора, например, между 230 нм и 330 нм на спектрофотометре DU 800 (Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA). Концентрация полинуклеотида в композиции наночастиц может быть рассчитана на основании коэффициента экстинкции полинуклеотида, используемого в композиции, и разницы между коэффициентом поглощения при длине волны, например, 260 нм, и исходным значением при длине волны, для например, 330 нм.

[1203] Для композиций наночастиц, содержащих РНК, можно использовать анализ РНК QUANT-IT™ RIBOGREEN® (Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния) для оценки инкапсуляции РНК композицией наночастиц. Образцы разводят до концентрации около 5 мкг/мл в буферном растворе ТЕ (10 мМ Трис-HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 7,5). 50 мкл разведенных образцов переносят в полистироловый 96-луночный планшет и в лунки добавляют либо 50 мкл буфера ТЕ, либо 50 мкл 2%-ного раствора Тритона X-100. Планшет инкубируют при температуре 37°C в течение 15 минут. Реактив RIBOGREEN® разбавляют 1:100 в буфере ТЕ и в каждую лунку добавляют по 100 мкл этого раствора. Интенсивность флуоресценции можно измерить с помощью флуоресцентного планшет-ридера (Wallac Victor 1420 Multilablel Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA) при длине волны возбуждения, например, около 480 нм, и при длине волны излучения, например, около 520 нм. Значения флуоресценции пустого реагента вычитают из значений каждого из образцов и определяют процент свободной РНК путем деления интенсивности флуоресценции интактного образца (без добавления Тритона X-100) на значение флуоресценции разрушенного образца (вызваного добавлением Тритона X-100).

[1204] Примеры составов композиций ядра наночастиц представлены в Таблице 6 ниже. Термин «Соединение» относится к ионизируемому липиду, такому как MC3, Соединение II или Соединение VI. «Фосфолипид» может представлять собой DSPC или DOPE. «ПЭГ-липид» может представлять собой ПЭГ-ДМГ или Соединение I.

Таблица 6. Примеры составов наночастиц

Композиция ядра (мол. %)	**Компоненты ядра**
40:20:38,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
45:15:38,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
50:10:38,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
55:5:38,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид

Композиция ядра (мол. %)	**Компоненты ядра**
60:5:33,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
45:20:33,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
50:20:28,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
55:20:23,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
60:20:18,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
40:15:43,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
50:15:33,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
55:15:28,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
60:15:23,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
40:10:48,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
45:10:43,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
55:10:33,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
60:10:28,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
40:5:53,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
45:5:48,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
50:5:43,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
40:20:40:0	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
45:20:35:0	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
50:20:30:0	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
55:20:25:0	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
60:20:20:0	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
40:15:45:0	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
45:15:40:0	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
50:15:35:0	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
55:15:30:0	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
60:15:25:0	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
40:10:50:0	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
45:10:45:0	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
50:10:40:0	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
55:10:35:0	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
60:10:30:0	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
47,5:10,5:39:3	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид

Композиция ядра (мол. %)	**Компоненты ядра**
50,5:10,1:38,9:0,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид
49,0:11,2:39,3:0,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид

Пример 16:

Производство композиций катионных наночастиц

[1205] Ядра липидных наночастиц получали с помощью нанопреципитации капель этанола с последующей заменой растворителя на водный буфер с использованием обессоливающей хроматографической колонки. Типичная липидная наночастица может быть получена способом, в котором липиды растворяют в этаноле при концентрации 15,4 мМ и молярных соотношениях менее 50:10:38,5:1,5 (ионизируемый липид: DSPC: холестерин: липид DMG-PEG2K) и смешивают с мРНК в концентрации 0,1515 мг/мл, разведенной в 25 мМ ацетата натрия, pH 5,0. Соотношение N:P было установлено равным 5,8 в каждой композиции. Липидный раствор и мРНК смешивали с помощью микротройникового смесителя при объемном соотношении липид:мРНК 1:3. Как только наночастицы образовались, они подверглись замене растворителя на обессоливающей хроматографической колонке, предварительно кондиционированной 1х ФСБ буфером при pH 7,0. Профиль элюирования наночастицы регистрировали детекторами УФ, pH и электропроводности. УФ-профиль использовали для сбора наночастиц после замены растворителя. Полученную суспензию наночастиц концентрировали с использованием ультрацентрифужных фильтров Amicon и пропускали через шприцевой фильтр 0,22 мкм. Наночастицы были приготовлены до определенной концентрации.

[1206] GL-67 добавляли к ядру наночастицы путем растворения GL-67 в HS15 и затем добавляли к ЛНЧ в массовом соотношении 1,25 (GL-67 к мРНК). В частности, 3HCl-GL-67 растворяли непосредственно в HS15 (1 мг/мл, ~70 мкМ, вода) для получения начального исходного раствора с концентрацией 5 мг/мл (6,92 мМ), который мог находиться в мицеллярной форме в растворе. GL-67 разбавляют до 0,5 мг/мл ([GL-67] требуется для последующего добавления при определенном масс. соотношении GL-67:мРНК) с HS15 (1 мг/мл) и добавляют к ЛНЧ (1:1 по объему) при температуре окружающей среды путем простого смешивания:

[мРНК] 0,2 мг/мл, [3HCl-GL-67] 0,25 мг/мл, [HS15] 0,5 мг/мл, [ФСБ] 0,5х.

РА-ЛНЧ дополнительно разбавлены 1хФСБ (1:1 по объему):

[мРНК] 0,1 мг/мл, [3HCl-GL-67] 0,125 мг/мл, [HS15] 0,5 мг/мл, [ФСБ] 0,75х.

[1207] Пример (ЛНЧ-01) выглядит следующим образом:

Таблица 7. ЛНЧ-01

Компоненты	масса (мг)	Молекулярная масса (г/моль)	Ядро ЛНЧ мол.%	РА-ЛНЧ мол.%	РА-ЛНЧ масс.%
II соединения	11,99	710,18	50,0%	47,6%	51,7%
DSPC	2,67	790,15	10,0%	9,5%	11,5%
Холестерин	5,02	386,65	38,5%	36,6%	21,6%
DMG-ПЭГ 2k	1,27	2500	1,5%	1,4%	5,5%
GL-67•3HCl	1,25	724	--	4,9%	5,4%
HS 15 (эксцип.)	0,25	--	--	--	--
мРНК	1	--	--	--	4,3%

HS 15 представляет собой гидроистерарат макрогола 15 (Solutol, Kolliphor), имеющий молекулярную массу 960-1900, при средней молекулярной массе 1430.

[1208] **На Фиг. 12** показана схема добавления GL-67.

[1209] Типовую ЛНЧ (без GL-67) можно приготовить в соответствии со схемой на **Фиг. 8-10**. **Фиг. 8** относится к процессу апостериорной загрузки (PHL) для создания пустой липидной наночастицы, после чего раствор, содержащий нуклеиновую кислоту, добавляют к пустой ЛНЧ. **Фиг. 9** относится к процессу после-вставки/после-добавления (PHL-PIPA), который относится к добавлению ПЭГ-липида к липидной наночастице. **Фиг. 10** относится к процессу апостериорной загрузки второго поколения, который включает этапы после-вставки/после-добавления ПЭГ. **Фиг. 11** относится к прототипу пустой липидной наночастицы («нейтральная сборка»), где пустую ЛНЧ смешивают при pH 8,0, а конечный состав имеет pH 5,0.

[1210] Другой пример ЛНЧ, приготовленной аналогичным образом, выглядит следующим образом:

Таблица 8. ЛНЧ-02

Компоненты	масса (мг)	Молекулярная	Ядро ЛНЧ	РА-ЛНЧ	РА-ЛНЧ

		масса (г/моль)	мол.%	мол.%	масс.%
II соединения	10,50	710,18	50,5%	47,3%	51,1%
DSPC	2,34	790,15	10,1%	9,5%	11,4%
Холестерин	4,40	386,65	38,9%	36,4%	21,4%
DMG-ПЭГ 2k	1,06	2440	0,5%	1,4%	5,2%
GL-67•3HCl	1,25	724	--	5,5%	6,1%
мРНК	1	--	--	--	4,9%

[1211] Еще один пример ЛНЧ, приготовленной аналогичным образом, выглядит следующим образом:

Таблица 9. ЛНЧ-03, ЛНЧ-04, ЛНЧ-05, ЛНЧ-06

Компоненты	масса (мг)	Молекулярная масса (г/моль)	Ядро ЛНЧ мол.%	РА-ЛНЧ мол.%	РА-ЛНЧ масс.%
II соединения	10,18	710,18	49,0%	45,8%	49,6%
DSPC	2,58	790,15	11,2%	10,5%	12,6%
Холестерин	4,45	386,65	39,3%	36,8%	21,7%
DMG-ПЭГ 2k	1,08	2500	0,5%	1,4%	5,3%
GL-67•3HCl	1,25	724	--	5,5%	6,1%
HS 15 (эксцип.)	--	--	--	--	--
мРНК	1,00	--	--	--	4,7%

[1212] Примеры составов композиций катионных наночастиц представлены в таблице ниже. Термин «Соединение» относится к ионизируемому липиду, такому как MC3, Соединение II или Соединение VI. «Фосфолипид» может представлять собой DSPC или DOPE. «ПЭГ-липид» может представлять собой ПЭГ-DMG или Соединение I. «GL67» относится к GL67 или его соли.

Таблица 10. Примеры составов катионных наночастиц

Композиция (мол. %)	**Компоненты**
48:9,5:35,5:1,5:5,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид:GL-67

Композиция (мол. %)	Компоненты
47:10:36:1,5:5,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид:GL-67
46:10,5:36,5:1,5:5,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид:GL-67
45:10,5:37,5:1,5:5,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид:GL-67
48:9,5:36:1,5:5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид:GL-67
47:10:36,5:1,5:5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид:GL-67
46:10,5:37:1,5:5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид:GL-67
45:10,5:38:1,5:5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид:GL-67
47,6:9,5:36,6:1,4:4,9	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид:GL-67
45,8:10,5:36,8:1,4:5,5	Соединение:Фосфолипид:Хол:ПЭГ-липид:GL-67

Пример 17:

Производство композиций наночастиц с использованием апостериорного подхода

[1213] Типичные пустые липидные наночастицы (пустая ЛНЧ) могут быть получены с помощью процесса, в котором липиды растворяют в этаноле при концентрации 40 мМ и молярных соотношениях 50,5:10,1:38,9:0,5 (ионизируемый липид: DSPC: холестерин: липид DMG-PEG2K) и смешивают с 7,15 мМ ацетата натрия, pH 5,0. Липидный раствор и буфер смешивали с использованием вихревого смесителя с несколькими входами при объемном соотношении липид:буфер 3:7. После 5-секундного пребывания пустые ЛНЧ смешивали с 5 мМ ацетатом натрия, pH 5,0, при объемном соотношении 5:7 пустые ЛНЧ:буфер. Затем в разбавленных пустых ЛНЧ заменяли буфер и концентрировали с использованием тангенциальной проточной фильтрации в конечном буфере, содержащем 5

мМ ацетата натрия, pH 5,0, а затем добавляли раствор сахарозы для завершения хранения матрицы. Загрузка мРНК в пустую ЛНЧ происходила с использованием процесса PHL. Типичная наночастица, нагруженная мРНК, может быть получена путем смешивания пустой ЛНЧ с концентрацией липидов 2,85 мг/мл с мРНК с концентрацией 0,25 мг/мл в 42,5 мМ ацетата натрия, pH 5,0. Соотношение N:P было установлено равным 4,93 в каждой композиции. Раствор пустых ЛНЧ и мРНК смешивали с помощью вихревого смесителя с несколькими входами при объемном соотношении 3:2 пустой ЛНЧ:мРНК. После того, как пустые ЛНЧ были загружены мРНК, они подвергались выдержке в течение 30 с –60 с перед смешиванием в потоке с буфером, содержащим 120 мМ ТРИС, pH 8,12, при объемном соотношении наночастиц:буфер 5:1. После этого этапа добавления состав наночастиц смешивали с буфером, содержащим 20 мМ ТРИС, 0,352 мг/мл DMG-PEG2K, 0,625 мг/мл GL-67, pH 7,5, при объемном соотношении наночастиц 6:1: буфер. Полученную суспензию наночастиц концентрировали с помощью тангенциальной проточной фильтрации и разбавляли солевым раствором до конечной буферной матрицы, содержащей 70 мМ NaCl. Полученную суспензию наночастиц фильтровали через капсульный фильтр 0,8/0,2 мкм и разливали в стеклянные флаконы с концентрацией мРНК 0,5 – 2 мг/мл.

Пример 18:

Активность мРНК CFTR

[1214] мРНК были получены с использованием кодон-оптимизированных открытых рамок считывания (ОРС) CFTR и оптимизированных элементов управления мРНК, включая варианты 5'-НТО, варианты 3'-НТО и стабилизированные хвосты.

[1215] **5′-НТО**

[1216] Были сконструированы варианты 5'-НТО и протестирована экспрессия мРНК.

[1217] **Фиг. 1А** представляет собой график, показывающий флуоресценцию GFP во времени для клеток HeLa, трансфицированных мРНК, кодирующей зеленый флуоресцентный белок (GFP) и имеющей 5'-НТО, содержащую нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 25. мРНК, содержащая 5'-НТО, имеющая нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25, демонстрировала примерно 1,5-3-кратное увеличение общей экспрессии,

обусловленное увеличением периода полужизни мРНК (**Фиг. 1А**).

[1218] Увеличение общей экспрессии, наблюдаемое с 5'-НТО SEQ ID NO: 25, исследовали с несколькими репортерами и типами клеток/тканей. **Фиг. 1В** представляет собой график, показывающий люминесценцию люциферазы светлячка в образцах печени мышей, которым вводили мРНК, кодирующую люциферазу светлячка (ffLuc), и имеющую 5'-НТО, содержащую нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 25.

[1219] мРНК составили в ЛНЧ-01 (Пример 16) и затем вводили на апикальную поверхность культивируемых клеток бронхиального эпителия человека (HBE), несущих мутацию F508del (обозначаемых в данном документе как «CF-HBE»). Затем активность CFTR измеряли путем оценки потока хлоридов через поверхность клетки с использованием камеры Ussing. Если не указано иное, поток измеряли через 18 часов после введения. Апикальное добавление фосфатно-солевого буфера (ФСБ) служило контролем.

[1220] **Фиг. 1С** представляет собой график, показывающий активность CFTR клеток CF-HBE, трансфицированных мРНК CFTR-01 или CFTR-06, составленных в ЛНЧ-01. ФСБ использовали в качестве отрицательного контроля. Контроль 1, комбинация тезакафтора и ивакафтора (Davies et al., N Engl J Med. 2018; 379(17):1599-1611) и Контроль 2, комбинация элексакафтора, тезакафтора и ивакафтора (Middleton et al., N Engl J Med 2019; 381:1809-1819), служили положительными контролями. Замена 5'-НТО SEQ ID NO: 2 на 5'-НТО SEQ ID NO: 25 приводила к повышенному уровню активности CFTR (**Фиг. 1С**; сравните CFTR-01 с CFTR-06).

[1221] **Кодирующая последовательность**

[1222] Были сконструированы варианты ОРС, кодирующие CFTR, и протестирована экспрессия мРНК. ОРС были разработаны для максимизации частоты и структуры кодонов.

[1223] **Фиг. 2** представляет собой график, показывающий активность CFTR (измеренную по потоку) клеток CF-HBE, трансфицированных мРНК CFTR-01, CFTR-07 или CFTR-08, составленных в ЛНЧ-01 (Пример 16). ФСБ использовали в качестве отрицательного контроля. Контроль 1 и Контроль 2 (описанные выше) служили в качестве положительных контролей. Оптимизированные ОРС в CFTR-07 и CFTR-08 имеют тенденцию к увеличению общей экспрессии CFTR, что определяется активностью CFTR (**Фиг. 2**).

[1224] **Хвост поли-А**

[1225] Были сконструированы варианты хвостов поли-А и протестирована экспрессия мРНК. Вкратце, мРНК содержали либо хвост полиА А100 (SEQ ID NO: 127) (незащищенная мРНК), либо хвост полиА А100-UCUAG-A20 с 3'-3'-связью с инвертированным дезокситимидином (idT-защищенная мРНК) (SEQ ID NO: 211).

[1226] **Фиг. 3А** представляет собой график, показывающий изменение зеленой флуоресценции во времени в клетках HeLa, трансфицированных мРНК, кодирующей GFP и имеющих хвост полиА А100 (SEQ ID NO: 127) или idT-защищенный хвост полиА А100-UCUAG-A20 (SEQ ID NO: 211). idT-защищенная мРНК имела более длительную продолжительность экспрессии белка, чем незащищенная мРНК, что отражает увеличенный период полужизни мРНК (**Фиг. 3А**).

[0006] **Фиг. 3В** представляет собой график, показывающий общий поток в образцах от мышей, которым вводили ФСБ или мРНК, кодирующую люциферазу светлячка и имеющую хвост полиА А100 (А100) (SEQ ID NO: 127) или idT-защищенный хвост полиА А100-UCUAG-A20 (idT) (SEQ ID NO: 211). Образцы от мышей, которым вводили idT-защищенную мРНК, показали более высокий поток, чем образцы от мышей, которым вводили незащищенную мРНК (**Фиг. 3В**).

[1227] **Фиг. 3С** представляет собой график, показывающий активность CFTR (измеренную по потоку) клеток CF-HBE, трансфицированных мРНК CFTR-01 или CFTR-09, составленных в ЛНЧ-01. ФСБ использовали в качестве контроля. Трансфекция мРНК CFTR, содержащей idT-защищенный хвост поли-А, давала более высокий поток, чем та же самая последовательность мРНК без защищенного хвоста (**Фиг. 3С**). Форма графика на **Фиг. 3С** предполагает длительную продолжительность экспрессии мРНК для мРНК, содержащей idT.

Пример 19:

Активность и экспрессия мРНК CFTR

[1228] ОРС, содержащая нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 142, и 5'-НТО, содержащая нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24, были выбраны для дальнейшего исследования. В частности, были созданы мРНК CFTR-02-CFTR-05, каждая из которых имеет 5'-НТО SEQ ID NO: 24 и ОРС SEQ ID NO: 142, но различается в отношении 3'-НТО и хвоста полиА (см. таблицу в Примере 12 выше).

[1229] Активность CFTR оценивали, как описано в Примере 18.

[1230] **На Фиг. 4A** показан перенос хлорида для CFTR-01, CFTR-02 и CFTR-03 при 2 мкг, 4 мкг, 6 мкг и 8 мкг. Каждый из CFTR-01, CFTR-02 и CFTR-03 проявлял активность CFTR при 2 мкг, 4 мкг, 6 мкг и 8 мкг (**Фиг. 4A**). CFTR-02 показал более высокую активность CFTR, чем CFTR-01, при 6 мкг (**Фиг. 4A**). CFTR-03 показал более высокую активность CFTR, чем CFTR-01, при 6 мкг и 8 мкг (**Фиг. 4A**).

[1231] **Фиг. 4B** показана активность CFTR через 18, 48, 72 и 96 часов после введения 8 мкг CFTR-01, CFTR-02 или CFTR-03. Активность CFTR сохранялась для каждого из CFTR-01, CFTR-02 и CFTR-03 через 96 часов (**Фиг. 4B**). Активность CFTR больше всего поддерживалась при введении CFTR-03 (**Фиг. 4B**).

[1232] Экспрессию белка CFTR оценивали вестерн-блоттингом, как описано в Примере 13.

[1233] **Фиг. 5A** представляет собой график, показывающий кратность изменения активности CFTR в клетках CF-HBE через 18 часов после введения CFTR-01, CFTR-02 или CFTR-03 по сравнению с активностью CFTR в клетках CF-HBE через 18 часов после введения CFTR- 01. мРНК были составлены в ЛНЧ-01. **Фиг. 5B** представляет собой график, показывающий кратность изменения площади под кривой активности CFTR в клетках CF-HBE между 18 и 96 часами после введения для того же эксперимента, что и на **Фиг. 5A**. CFTR-03 проявлял повышенную активность CFTR по сравнению с CFTR-01 через 18 часов после введения (**Фиг. 5A**) и между 18 и 96 часами после введения (**Фиг. 5B**).

[1234] **Фиг. 5C** представляет собой график, показывающий кратность изменения экспрессии белка CFTR в клетках CF-HBE через 18 часов после введения CFTR-01, CFTR-02 или CFTR-03 по сравнению с экспрессией белка CFTR в клетках CF-HBE через 18 часов после введения CFTR-01. мРНК были составлены в ЛНЧ-01 (Пример 16). **Фиг. 5D** представляет собой график, показывающий кратность изменения площади под кривой экспрессии белка CFTR в клетках CF-HBE между 18 и 96 часами после введения для того же эксперимента, что и на **Фиг. 5C** Каждый из CFTR-02 и CFTR-03 показал повышенную экспрессию CFTR по сравнению с CFTR-01 через 18 часов после введения (**Фиг. 5C**) и между 18 и 96 часами после введения (**Фиг. 5D**).

[1235] Аналогичные эксперименты были проведены с расширенным набором мРНК.

[1236] **Фиг. 6A** представляет собой график, показывающий кратность разницы в активности CFTR в клетках CF-HBE через 18 часов после введения одного из CFTR-01-CFTR-05 по сравнению с активностью CFTR в клетках CF-HBE через 18 часов

после введения CFTR-01. мРНК составили в ЛНЧ-01 (Пример 16). Дозы исследуемых мРНК варьировались от 2 до 8 мкг. **Фиг. 6B** представляет собой график, показывающий кратность изменения площади под кривой активности CFTR в клетках CF-HBE между 48 и 96 часами после введения для того же эксперимента, что и на **Фиг. 6A**. CFTR-02, -03, -04 и -05 показали повышенную активность CFTR по сравнению с CFTR-01 через 18 часов после введения (**Фиг. 6A**). CFTR-02, -03 и -05 показали повышенную активность CFTR между 48 и 96 часами после введения (**Фиг. 6B**).

[1237] **Фиг. 6C** представляет собой график, показывающий кратность разницы площади под кривой экспрессии белка CFTR в клетках CF-HBE между 18 и 96 часами после введения одного из CFTR-01-CFTR-05 по сравнению с экспрессией CFTR в клетках CF-HBE. Клетки CF-HBE между 18 и 96 часами после введения CFTR-01. мРНК составляли в ЛНЧ-01 (Пример 16). Дозы исследуемых мРНК варьировались от 2 до 8 мкг. CFTR-02, -03 и -05 показали повышенную экспрессию CFTR по сравнению с CFTR-01 между 18 и 96 часами после введения (**Фиг. 6C**).

Пример 20:

Размер частиц, целостность мРНК и эффективность инкапсуляции наночастиц CFTR-липид

[1238] Качество и постоянство липидных наночастиц (ЛНЧ) ЛНЧ-01 (Пример 16) при инкапсулировании мРНК CFTR оценивали путем оценки размера частиц, целостности инкапсулированной мРНК и эффективности инкапсуляции в течение нескольких раундов генерации ЛНЧ.

[1239] Целостность мРНК определяли с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии со спариванием ионов (RPIP-ВЭЖХ). Вкратце, мРНК анализируют на колонке с обращенной фазой, используя основные пики, содержащие пары ионов (например, ацетат триэтиламмония, ацетат дибутиламмония). В градиенте органического растворителя (например, ацетонитрила, гексиленгликоля) мРНК может элюироваться из колонки в зависимости от размера.

[1240] **Фиг. 7A** представляет собой график, показывающий целостность мРНК (определяемую с помощью RPIP-ВЭЖХ, представленную в процентах от основного пика (ОП)) для указанных CFTR-ЛНЧ. Каждый раунд представляет собой отдельный повторяющийся состав. Ось Y включает только допустимый диапазон

целостности мРНК. Целостность мРНК для каждой исследуемой ЛНЧ находилась в пределах допустимого диапазона во всех раундах и идентичностях мРНК (**Фиг. 7A**). Вариабельность анализа составила 5%.

[1241] Размер частиц определяли с помощью динамического светорассеяния (DLS) на DynaPro Plate Reader II (Wyatt Instruments, США) при 25 °C с 10 измерениями на образец.

[1242] **Фиг. 7B** представляет собой график, показывающий размер частиц ЛНЧ для указанных CFTR-ЛНЧ. Каждый раунд представляет собой отдельный повторяющийся состав. Ось Y включает только допустимый диапазон размера частиц ЛНЧ. Размер частиц для каждой исследуемой ЛНЧ находилась в пределах допустимого диапазона во всех раундах и идентичностях мРНК (**Фиг. 7B**). Вариабельность анализа составила 5 нм.

[1243] Эффективность инкапсуляции (ЭИ) измеряли с использованием модифицированного анализа Quant-iT RiboGreen. Для определения ЭИ% наночастицы (или ФСБ, контроль) разводили в 1X TE до достижения концентрации мРНК 2–4 мкг/мл на лунку. Эти образцы разделяли на аликвоты и разбавляли 1:1 в 1X TE или 1X TE с 2,5 мг/мл гепаринового буфера (измерение свободной мРНК) или буфером TE с 2% Тритон X-100 или 2% Тритон с 2,5 мг/мл гепарина (измерение общей мРНК). Добавляли реагент Quant-iT RiBogreen и количественно определяли флуоресцентный сигнал с помощью планшет-ридера. Эффективность инкапсуляции рассчитывали следующим образом:

$$\text{ЭИ\%} = 1 - \frac{\text{свободная мРНК}}{\text{общая мРНК}} \text{ x } 100$$

[1244] **Фиг. 7C** представляет собой график, показывающий эффективность инкапсуляции для указанных CFTR-ЛНЧ. Каждый раунд представляет собой отдельный повторяющийся состав. Ось Y включает только допустимый диапазон эффективности инкапсуляции. Эффективность инкапсуляции для каждой исследуемой ЛНЧ находилась в пределах допустимого диапазона во всех раундах и идентичностях мРНК (**Фиг. 7C**). Вариабельность анализа составила 5%.

Пример 21:

Активность и экспрессия мРНК CFTR-03

[1245] **ЛНЧ**

[1246] Были созданы ЛНЧ, содержащие мРНК CFTR-03, содержащие Соединение II, DSPC, холестерин, DMG-PEG 2000 и GL-67.•3HCl. Композиции от ЛНЧ-02 до ЛНЧ-06 представлены в Примере 16 выше.

[1247] **Поток CF-HBE (жидкий апикальный и аэрозольный)**

[1248] мРНК CFTR составляли в ЛНЧ, а затем вводили непосредственно на апикальную поверхность культивируемых клеток бронхиального эпителия человека (HBE), несущих мутацию F508del (обозначаемых в данном документе как «CF-HBE»), путем добавления жидкости. В качестве альтернативы ЛНЧ вводили с помощью аэрозоля с использованием камеры осаждения Vitrocell Cloud Max, соединенной с коммерчески доступным распылителем с вибрирующей сеткой. Затем активность CFTR измеряли путем оценки потока хлоридов через поверхность клетки с использованием камеры Ussing. Если не указано иное, поток измеряли через 18 часов после введения. Апикальное добавление фосфатно-солевого буфера (ФСБ) или буфера на основе Трис служило контролем. Ссылка обозначена пунктирной линией.

[1249] **Клетки, экспрессирующие CFTR, с помощью иммуногистохимии (ИГХ)**

[1250] После измерения активности CFTR в камере Ussing вставки CF-HBE фиксировали в 10% PFA при комнатной температуре в течение не менее 24 часов, максимум 48 часов, а затем удаляли из фиксатора и помещали в ФСБ. Образцы немедленно отправляются для заливки парафином, изготовления 5-микронных срезов и окрашивания H&E для ИГХ или для окрашивания всего препарата и IF.

[1251] **ИГХ** выполняли на срезах FFPE с использованием автоматизированной платформы Ventana Discovery ULTRA. Экспрессию белка CFTR определяли с помощью моноклонального антитела против CFTR с последующим контрастным окрашиванием гематоксилином и синеющим реагентом. Изображения были получены с 40-кратным увеличением с помощью 3D-сканера целых слайдов HISTECH. Анализ изображений был выполнен с помощью программного обеспечения для анализа изображений Indica Labs HALO AI. Изображения были проанализированы для захвата общего количества эпителиальных клеток, и данные, при необходимости, были выражены в виде % CFTR-положительных эпителиальных клеток на общее количество эпителиальных клеток на срез.

[1252] **Статистический анализ сопоставимости ЛНЧ:** Для оценки сопоставимости переноса хлоридов линейные модели были приспособлены к ЛНЧ при дозах 2 мкг и 6 мкг на log2 трансформированного переноса хлорида (включая основные эффекты ЛНЧ, Эксперимент и Доза, их двустороннее и трехстороннее

взаимодействие) в сравнительных экспериментах.

[1253] **На Фиг. 13A и 13B** показан перенос хлорида для различных (ЛНЧ-02 и ЛНЧ-03) при 2 мкг, 4 мкг, 6 мкг и 8 мкг. Каждый из ЛНЧ-02 и ЛНЧ-03 проявлял активность CFTR при 2 мкг, 4 мкг, 6 мкг и 8 мкг. Статистические сравнения (**Фиг. 13B**) подтверждают сравнимую экспрессию при 2 мкг и 6 мкг в пределах 1,5-кратного отклонения. Горизонтальные полосы на **Фиг. 13B** указывают 95% доверительный интервал статистического сравнения.

[1254] **Фиг. 13C и 13D** показывают перенос хлоридов для различных ЛНЧ (ЛНЧ-03 и ЛНЧ-04) при 2 мкг, 4 мкг, 6 мкг и 8 мкг. Каждый из ЛНЧ-03 и ЛНЧ-04 проявлял активность CFTR при 2 мкг, 4 мкг, 6 мкг и 8 мкг. Статистические сравнения (**Фиг. 13D**) подтверждают сравнимую экспрессию при 2 мкг и 6 мкг в пределах 1,5-кратного отклонения.

[1255] **Фиг. 13E и 13F** показывают перенос хлоридов для различных ЛНЧ (ЛНЧ-03, ЛНЧ-05 и ЛНЧ-06) при 2 мкг, 4 мкг, 6 мкг и 8 мкг. Каждый из ЛНЧ-03, ЛНЧ-05 и ЛНЧ-06 проявлял активность CFTR при 2 мкг, 4 мкг, 6 мкг и 8 мкг. Статистические сравнения (**Фиг. 13F**) подтверждают сравнимую экспрессию при 2 мкг и 6 мкг в пределах 1,5-кратного отклонения.

[1256] **На Фиг. 13G и 13H** показан перенос хлоридов для различных ЛНЧ (ЛНЧ-02, ЛНЧ-04, ЛНЧ-05 и ЛНЧ-06) при 2 мкг (**Фиг. 13G**) и 6 мкг (**Фиг. 13H**) относительно ЛНЧ-03 в сравнительных экспериментах. Кружки соответствуют специфическому для эксперимента кратному увеличению относительно ЛНЧ-03. Планки погрешностей соответствуют 95% доверительному интервалу кратного увеличения для конкретного эксперимента. Различные ЛНЧ были сопоставимы, в частности, на этой фигуре, ЛНЧ-02, ЛНЧ-04, ЛНЧ-05 и ЛНЧ-06 сравнимы с ЛНЧ-03 в пределах 1,5-кратного разрыва в сопоставлении экспериментов.

[1257] Кроме того, эффективность ЛНЧ оценивали при доставке аэрозолем. **Фиг. 14** показывает перенос хлоридов для одной ЛНЧ (ЛНЧ-03) в зависимости от дозы при доставке аэрозолем на апикальную поверхность CF-HBE. Высокие уровни транспорта хлоридов были достигнуты после введения CFTR-ЛНЧ. Анализ ИГХ показал, что 4% клеток положительны по экспрессии CFTR по сравнению с контролем.

Пример 22:

Исследования in vivo мРНК-липидных наночастиц

[1258] Липидные наночастицы (ЛНЧ), инкапсулирующие репортер или мРНК CFTR, оценивали на крысах и отличных от человека приматах (NHP; англ.: non-human primate, яванских макаках) с помощью аэрозольной доставки.

[1259] **Процедура дозирования A: Воздействие аэрозоля только через нос грызунов**

[1260] Аэрозоль генерировали с помощью распылителя с вибрирующей сеткой и определенной скоростью потока воздуха на входе. Аэрозоль вводили в проточную камеру воздействия только через нос грызунов, сначала проходя через камеру смешивания, прежде чем попасть в слой воздействия. Животные подвергались воздействию аэрозоля через каждый носовой порт, который затем удалялся из системы.

[1261] До начала введения исследуемой дозы животных приучали к удерживающему оборудованию, системе воздействия и лабораторным условиям в соответствии с условиями исследования. В каждый день дозирования животных помещали в камеру для воздействия в фиксирующих конусах и подвергали воздействию аэрозоля в течение определенного времени воздействия для достижения целевых доз в легких. За животными непрерывно наблюдали на протяжении всего воздействия, а затем на наличие любых наблюдаемых побочных реакций. Концентрацию аэрозоля (мРНК) и аэродинамическое распределение частиц по размерам контролировали в дозировочном отверстии до, после и во время каждого дозирования для оценки достигнутых уровней дозы и целевого размера вдыхаемых аэрозольных частиц (1-3 мкм для крыс), соответственно.

[1262] **Процедура дозирования B: Воздействие аэрозоля на NHP**

[1263] Аэрозоль генерировали с помощью распылителя с вибрирующей сеткой и определенной скоростью потока воздуха на входе. Аэрозоль вводили в систему доставки с положительным потоком (PFDS), сначала проходя через смесительную камеру, а затем распределяя положительным потоком в 9 рукавов, которые подвергают аэрозоль воздействию группы NHP посредством ороназальной доставки с использованием лицевой маски. Животные подвергались воздействию свежего аэрозоля в маске, который затем удаляли.

[1264] До начала введения исследуемой дозы животных приучали к удерживающему оборудованию, системе воздействия и лабораторным условиям в соответствии с условиями исследования. В каждый день дозирования животных помещали в дозирующую систему с использованием средств фиксации и лицевой маски, а затем животных подвергали воздействию аэрозоля в течение установленного времени воздействия для достижения целевых доз в легких. За животными непрерывно наблюдали на протяжении всего воздействия, а затем на наличие любых наблюдаемых побочных

реакций. Концентрацию аэрозоля (мРНК) и аэродинамическое распределение частиц по размерам контролировали в дозировочном порте (маске) до, после и во время каждого случая дозирования с использованием рычага для отбора проб для оценки достигнутых уровней дозы и целевых размеров вдыхаемых аэрозольных частиц (1–4 мкм для NHP), соответственно.

[1265] Процедура сбора и анализов образцов A: Сбор тканей для гистологии

[1266] Трахею, легкие и для исследования аэрозолей носовые полости, носоглотку и гортань собирали для анализа. Легкие надували 10% фиксатором NBF и перевязывали трахею для поддержания надувания. Легкие удаляли единым блоком с присоединенными трахеями, бронхами и долями. Целые легкие единым блоком фиксировали в 10% NBF при комнатной температуре в течение как минимум 24 часов, максимум 48 часов, а затем удаляли из фиксатора и помещали в ФСБ. Образцы были немедленно отправлены на обработку для изготовления парафиновых 5-микронных срезов и окрашивания H&E.

[1267] Для исследования аэрозолей помимо трахеи и легких также собирали носовые полости, носоглотку и гортань.

[1268] Процедура сбора и анализов образцов B: Иммуногистохимия (ИГХ) для V5

[1269] ИГХ выполняли на срезах FFPE с использованием автоматизированной системы окрашивания Leica Bond RX. Экспрессию белка NPI-Luc определяли с помощью антитела к метке V5 в разведении 1:100. Антитело к V5 было обнаружено с помощью набора полимеров для обнаружения и очистки BORD с последующим контрастным окрашиванием гематоксилином и синеющим реагентом. Изображения были получены с 20-кратным увеличением с помощью сканера целых слайдов Panoramic 250 Flash III. Анализ изображений был выполнен с помощью программного обеспечения для анализа изображений Indica Labs HALO. Изображения трахеи, легких и/или полости носа анализировали, чтобы получить общее количество эпителиальных клеток трахеи, бронхов или носа, и данные, при необходимости, выражали в виде % V5-положительных эпителиальных клеток на общее количество эпителиальных клеток на животное.

[1270] Процедура сбора и анализов образцов C: Иммуногистохимия (ИГХ) для CFTR

[1271] ИГХ выполняли на срезах FFPE с использованием прибора для автоматического окрашивания Ventana Discovery Ultra. Экспрессию белка CFTR определяли с помощью антитела к CFTR в разведении 1:100. Антитела к CFTR выявляли с помощью мультимерного ферментного конъюгата HRP и набора для обнаружения фиолетового хромогена Discovery с последующим контрастным окрашиванием

гематоксилином и синеющим реагентом. Изображения были получены с 20-кратным увеличением с помощью сканера целых слайдов. Анализ изображений был выполнен с помощью программного обеспечения для анализа изображений Indica Labs HALO. Изображения трахеи, легких и/или полости носа анализировали для захвата всех эпителиальных клеток трахеи, бронхов или носа, и данные выражали, когда это уместно, в виде % CFTR-положительных эпителиальных клеток на общее количество эпителиальных клеток на срез ткани отдельного животного (обратите внимание, что ИГХ окрашивание CFTR выявляет фоновый CFTR обезьяны, и поэтому сигналы экзогенного белка оцениваются выше фоновой экспрессии).

[1272] Данные экспрессии белка ЛНЧ у крыс после однократной дозы репортерной мРНК-ЛНЧ с помощью аэрозольной доставки

[1273] ЛНЧ-02 получали с использованием NPI-Luc в качестве конструкции мРНК. ЛНЧ доставляли крысам с помощью аэрозольной доставки с использованием системы дозирования аэрозолей только через нос. Экспрессию белка ЛНЧ в респираторном эпителии оценивали в соответствии с процедурами сбора и анализа образцов A и B. Результаты показаны в Таблице 11 и на **Фиг. 15**. Респираторный эпителий в носовой полости, трахее и бронхах был положительным в отношении экспрессии белка в дыхательных путях после аэрозольной доставки репортерных ЛНЧ.

Таблица 11

Ткань	**Доза мг/кг**	**Средний % V5-положительных клеток/общее количество клеток**	**Стандартное отклонение %V5 положительных клеток/общее количество клеток**
Крысиная трахея		0,20*	0,19*
	0,4	0,29	0,16
	0,6	0,16	0,15
	1,1	0,65	0,39
Крысиные бронхи (левое и правое легкое)		0,03*	0,02*
	0,4	0,13	0,07
	0,6	0,13	0,03
	1,1	0,46	0,17
Носовая полость крысы		0,18*	0,16*
	0,4	0,64	0,76

	0,6	1,20	1,08
	1,1	2,84	3,05

* Данные получены в буферном растворе на основе Трис.

[1274] Данные экспрессии белка ЛНЧ у NHP после однократной дозы репортерной мРНК-ЛНЧ с помощью аэрозольной доставки

[1275] ЛНЧ-05 получали с использованием NPI-Luc в качестве конструкции мРНК. ЛНЧ доставляли NHP аэрозольной доставкой с использованием системы дозирования аэрозолей PFDS с лицевой маской. Экспрессию белка ЛНЧ в респираторном эпителии оценивали в соответствии с процедурами сбора и анализа образцов A и B. Результаты показаны в Таблице 12 и на **Фиг. 16A и 16B**. Респираторный эпителий в легких был положительным на экспрессию белка в дыхательных путях после аэрозольной доставки ЛНЧ. Данные крыс и NHP, контактировавших с аэрозолем, полученные с использованием репортера, подтверждают, что функциональные мРНК-ЛНЧ доставлялись в дыхательные пути после распыления.

Таблица 12

Ткань	**Доза мг/кг**	**Средний % V5-положительных клеток/общее количество клеток**	**Стандартное отклонение %V5 положительных клеток/общее количество клеток**
Бронхи NHP (левое и правое легкое)		0,069*	0,058*
	0,42	8	3,1

* Данные получены в буферном растворе на основе Трис. Значения являются средними для 1 мужчины и 1 женщины на группу.

[1276] Данные экспрессии белка ЛНЧ у крыс после однократной дозы мРНК CFTR-ЛНЧ с помощью аэрозольной доставки

[1277] Кроме того, ЛНЧ-02 получали с использованием CFTR-02 в качестве конструкции мРНК. ЛНЧ доставляли крысам с помощью аэрозольной доставки с использованием системы дозирования аэрозоля только через нос. Экспрессию белка ЛНЧ в респираторном эпителии оценивали в соответствии с процедурами сбора и анализа образцов A и C. Результаты показаны в Таблице 13 и на **Фиг. 17**. Респираторный эпителий

в бронхах был положительным на экспрессию белка после аэрозольной доставки ЛНЧ.

Таблица 13

Ткань	**Достигнутая доза, депонированная в легких (мг/кг)**	**Средний % CFTR-положительных клеток/общее количество клеток**	**Стандартное отклонение % CFTR положительных клеток/общее количество клеток**
Крысиные бронхи (левое и правое легкое)		0*	0*
	0,145	1	1,5
	0,188	0,5	0,4

* Данные получены в буферном растворе на основе Трис.

[1278] Данные экспрессии белка ЛНЧ у NHP после однократной дозы мРНК CFTR-ЛНЧ с помощью аэрозольной доставки

[1279] ЛНЧ-03 и ЛНЧ0-04 получали с использованием CFTR-03 в качестве конструкции мРНК. ЛНЧ доставляли крысам с помощью аэрозольной доставки с использованием системы дозирования аэрозолей только через нос. Экспрессию белка ЛНЧ в респираторном эпителии оценивали в соответствии с процедурами сбора и анализа образцов A и C. Результаты показаны в Таблице 14. Респираторный эпителий в легких был положительным на экспрессию белка после аэрозольной доставки ЛНЧ.

Таблица 14

ЛНЧ	**Ткань**	**Достигнутая доза, депонированная в легких (мг/кг)**	**Момент времени**	**Средний % CFTR-положительных клеток/общее количество клеток по сравнению с исходным уровнем**	**Стандартное отклонение % CFTR положительных клеток/общее**

				(сильный сигнал + сигнал экспрессии)	**количество клеток**
Буфер	Легкое NHP	Согласованное время воздействия высокой дозы	24 ч	4,32*	1,04*
ЛНЧ-03		0,11	8 ч	14,73	4,06
		0,11	24 ч	7,14	1,20
		0,54	8 ч	11,46	4,32
		0,54	24 ч	4,69	0,32
		0,54	48 ч	14,00	5,11
ЛНЧ-04		0,12	24 ч	6,08	1,54
		0,50	24 ч	8,57	4,56

* Данные получены в буферном растворе на основе Трис.

[1280] Данные об экспрессии белка ЛНЧ у крыс после многократного введения мРНК CFTR-ЛНЧ с помощью аэрозольной доставки

[1281] ЛНЧ-04 получали с использованием CFTR-03 в качестве конструкции мРНК. ЛНЧ доставляли крысам с помощью аэрозольной доставки с использованием системы дозирования аэрозолей только через нос. Экспрессию белка ЛНЧ в респираторном эпителии оценивали в соответствии с процедурами сбора и анализа образцов A и C. Результаты показаны в Таблице 15. Респираторный эпителий в бронхах был положительным на экспрессию белка после аэрозольной доставки ЛНЧ.

Таблица 15

ЛНЧ	**Дни дозирования**	**Ткань**	**Доза мг/кг**	**Средний % CFTR-положительных клеток/общее количество клеток**	**Стандартное отклонение % CFTR положительных клеток/общее количество клеток**
	1	Крысины	Согласованно		

		е бронхи (левое и правое легкое)	е время воздействия высокой дозы		
ЛНЧ-04			0,17	7,8	3,4
Буфер	4	Крысиные бронхи (левое и правое легкое)	Согласованное время воздействия высокой дозы	0,07	0,04
ЛНЧ-04			0,04	3,5	1,8
			0,09	6,0	1,5
			0,17	8,1	2,7

* Данные получены в буферном растворе на основе Трис.

[1282] Данные экспрессии белка ЛНЧ у NHP после многократной дозы мРНК CFTR-ЛНЧ с помощью аэрозольной доставки

[1283] ЛНЧ-05 получали с использованием CFTR-03 в качестве конструкции мРНК. ЛНЧ доставляли крысам с помощью аэрозольной доставки с использованием системы дозирования аэрозолей только через нос. Экспрессию белка ЛНЧ в респираторном эпителии оценивали в соответствии с процедурами сбора и анализа образцов A и C. Результаты показаны в Таблице 16. Респираторный эпителий в носовой полости, трахее и бронхах был положительным на экспрессию белка после аэрозольной доставки ЛНЧ. ИГХ-изображения, показанные на **Фиг. 17** демонстрируют экспрессию белка CFTR выше исходного уровня в местах присутствия мРНК CFTR.

Таблица 16

ЛНЧ	**Ткань**	**Достигнутая доза, депонированная в легких (мг/кг)**	**Средний % CFTR-положительных клеток/общее количество клеток увеличилось по сравнению с исходным**	**Стандартное отклонение % CFTR положительных клеток/общее количество клеток**

			уровнем	
ЛНЧ-05		0,010	6,6	5,1
		0,036	9,4	3,9
		0,097	19,7	3,7

* Исходный уровень для животных, получавших буферный раствор на основе Трис: 3,2% CFTR-положительных клеток/общее количество клеток

Пример 23

Аэрозольные характеристики наночастиц CFTR-липид

[1284] Характеристики аэрозоля и физико-химические характеристики липидных наночастиц ЛНЧ-05 и ЛНЧ-06, инкапсулирующих мРНК CFTR-03 после распыления, оценивали путем оценки размера частиц ЛНЧ и эффективности инкапсуляции, а также распределения аэрозольных капель по размерам. Для распыления мРНК-ЛНЧ использовали коммерчески доступные распылители с вибрирующей сеткой от нескольких производителей.

[1285] От 4 до 8 мл мРНК-ЛНЧ распыляли и собирали для дальнейшего анализа. Определение размера частиц ЛНЧ и эффективности инкапсуляции проводили, как подробно описано в Примере 20. Размер и полидисперсность ЛНЧ увеличивались после распыления при сохранении эффективности инкапсуляции. Экспрессия белка CFTR была обнаружена с использованием ЛНЧ после распыления, что подтверждает результаты других исследований о том, что мРНК-ЛНЧ CFTR остаются интактными и функциональными при доставке с помощью распыления.

[1286] Размер капель аэрозоля определяли в трех повторностях с использованием импактора нового поколения (NGI) с тремя блоками устройства в каждой. NGI охлаждали до 5 °C и запускали при скорости потока экстракции 15 л/мин. 1 мл мРНК-ЛНЧ распыляли и измеряли массовый медианный аэродинамический диаметр (MMAD) и геометрическое стандартное отклонение (GSD). Среднее значение MMAD для всех устройств находилось в пределах вдыхаемого диапазона от 4 до 5 мкм, а GSD от 1,6 до 1,8.

[1287] Следует принять во внимание, что раздел «Подробное описание сущности изобретения», а не разделы «Краткое описание сущности изобретения» и «Реферат», предназначен для интерпретации формулы изобретения. В разделах «Краткое описание» и «Реферат» могут быть указаны один или более но не все иллюстративные варианты осуществления данного изобретения, как это предусмотрено изобретателем(ями), и, таким образом, не предназначены для ограничения данного изобретения и прилагаемой формулы изобретения любым способом.

[1288] Данное изобретение было описано выше с помощью функциональных структурных блоков, иллюстрирующих осуществление указанных функций и их взаимосвязей. Границы этих функциональных структурных элементов были произвольно определены в настоящем документе для удобства описания. Альтернативные границы могут быть определены до тех пор, пока указанные функции и их отношения будут надлежащим образом выполняться.

[1289] Вышеизложенное описание конкретных вариантов осуществления полностью отражает общий характер изобретения, который другие могут, применяя знания в пределах уровня техники, легко модифицировать и/или адаптировать для различных применений подобных конкретных вариантов осуществления, без излишнего экспериментирования, не отступая от общей концепции данного изобретения. Следовательно, такие адаптации и модификации предназначены для того, чтобы быть в пределах значения и диапазона эквивалентов раскрытых вариантов осуществления на основе представленных в данном документе инструкций и указаний. Следует понимать, что формулировки или терминология в настоящем документе предназначены для описания, а не ограничения, так что терминология или формулировки настоящего описания должны интерпретироваться специалистом в данной области техники в свете инструкций и указаний.

[1290] Объем притязаний и объем данного изобретения не должны ограничиваться каким-либо из вышеописанных иллюстративных вариантов осуществления, но должны определяться только в соответствии со следующей формулой изобретения и их эквивалентами.

[1291] Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые в данном документе, полностью включены в данный документ посредством ссылки. В случае конфликта данное описание, включая определения, является превалирующим.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Матричная РНК (мРНК), содержащая открытую рамку считывания (ОРС), кодирующую полипептид регулятора трансмембранной проводимости при муковисцидозе (CFTR) SEQ ID NO: 1, при этом ОРС по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99 % или на 100% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 142.

2. мРНК по п. 1, отличающаяся тем, что мРНК содержит 5'-нетранслируемую область (НТО), содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 25.

3. мРНК по п. 1, отличающаяся тем, что мРНК содержит 5'-НТО, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24.

4. Матричная РНК (мРНК), содержащая 5'-нетранслируемую область (НТО), содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 28, и открытую рамку считывания (ОРС), кодирующую полипептид регулятора трансмембранной проводимости при муковисцидозе (CFTR) SEQ ID NO: 1.

5. мРНК по п. 4, отличающаяся тем, что 5'-НТО содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 25.

6. мРНК по п. 4, отличающаяся тем, что 5'-НТО содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24.

7. мРНК по любому из пп. 1-6, отличающаяся тем, что мРНК содержит 3'-НТО, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 45.

8. Матричная РНК (мРНК), содержащая 3'-нетранслируемую область (НТО), содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 45, и открытую рамку считывания (ОРС), кодирующую полипептид регулятора трансмембранной проводимости при муковисцидозе (CFTR) SEQ ID NO: 1.

9. мРНК по п. 8, причем мРНК содержит 5'-НТО, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 28.

10. мРНК по п. 8, причем мРНК содержит 5'-НТО, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24 или 25.

11. мРНК по любому из пп. 1-10, причем мРНК содержит 5'-концевой кэп, содержащий m^7G-ppp-Gm-AG.

12. мРНК по любому из пп. 1-11, причем мРНК содержит область поли-А, содержащую A100-UCUAG-A20-инвертированный дезокситимидин (SEQ ID NO: 211).

13. мРНК по любому из пп. 1-12, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 153.

14. Матричная РНК (мРНК), содержащая:
(i) 5'-концевой кэп, содержащий m^7G-ppp-Gm-AG;
(ii) 5'-нетранслируемую область (НТО), содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 25;
(iii) открытую рамку считывания (ОРС), кодирующую полипептид регулятора трансмембранной проводимости при муковисцидозе (CFTR) SEQ ID NO: 1, при этом ОРС содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 142;
(iv) 3'-НТО, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты 45; и
(v) область поли-А, содержащую A100-UCUAG-A20-инвертированный дезокситимидин (SEQ ID NO: 211).

15. мРНК по любому из пп. 1-14, причем мРНК содержит по меньшей мере одно химически модифицированное азотистое основание, сахар, остов или любую их комбинацию.

16. мРНК по любому из пп. 1-14, отличающаяся тем, что все урацилы мРНК представляют собой N1-метилпсевдоурацилы.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая мРНК по любому из пп. 1-16.

18. Липидная наночастица, содержащая мРНК по любому из пп. 1-16.

19. Липидная наночастица по п. 18, причем липидная наночастица содержит:

ядро липидной наночастицы, содержащее:

(i) ионизируемый липид,

(ii) фосфолипид,

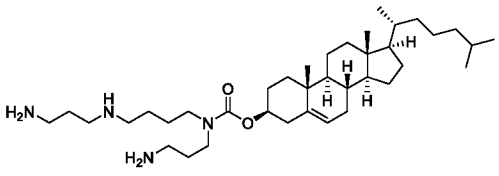
(iii) структурный липид и

(iv) ПЭГ-липид и

при этом мРНК инкапсулирована внутри ядра и

при этом ядро липидной наночастицы было приведено в контакт с катионным агентом.

20. Липидная наночастица по п. 19, отличающаяся тем, что катионный агент представляет собой GL-67:



(GL-67) или его соль.

21. Липидная наночастица по п. 18, причем липидная наночастица содержит:

(i) ионизируемый липид,

(ii) фосфолипид;

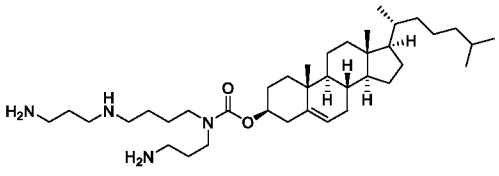
(iii) структурный липид;

(iv) ПЭГ-липид; и

(v) катионный агент.

22. Липидная наночастица по п. 21, отличающаяся тем, что катионный агент представляет собой стеринамин.

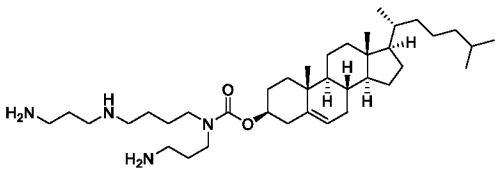
23. Липидная наночастица по п. 21, отличающаяся тем, что катионный агент представляет собой GL-67:



(GL-67) или его соль.

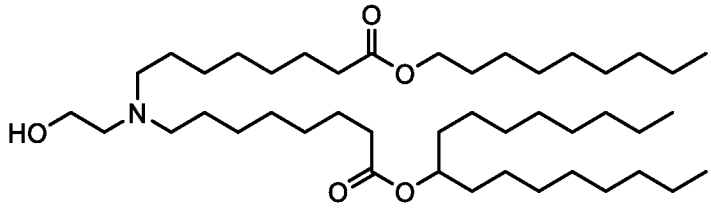
24. Липидная наночастица, содержащая:

(i)



(GL-67) или его соль,

(ii)



(Соединение II) или его соль; и

(iii) матричную РНК (мРНК), кодирующую полипептид регулятора трансмембранной проводимости при муковисцидозе (CFTR).

25. Липидная наночастица по п. 24, отличающаяся тем, что полипептид CFTR содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1.

26. Способ получения наночастицы, включающий приведение ядра липидной наночастицы в контакт с катионным агентом, при этом липидная наночастица содержит:

(a) ядро липидной наночастицы, содержащее:

(i) ионизируемый липид,

(ii) фосфолипид,

(iii) структурный липид и

(iv) ПЭГ-липид и

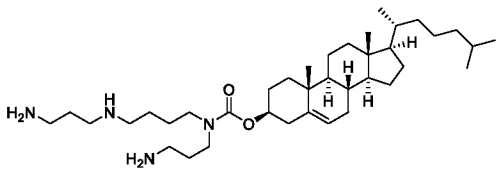
(b) мРНК по любому из пп. 1-16.

27. Способ по п. 26, отличающийся тем, что приведение ядра липидной наночастицы в контакт с катионным агентом включает растворение катионного агента в неионном эксципиенте.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что неионный эксципиент представляет собой макрогол 15 гидроксистеарат (HS 15).

29. Способ по любому из пп. 25-28, отличающийся тем, что катионный агент представляет собой стеринамин.

30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что стеринамин представляет собой GL-67:



(GL-67) или его соль.

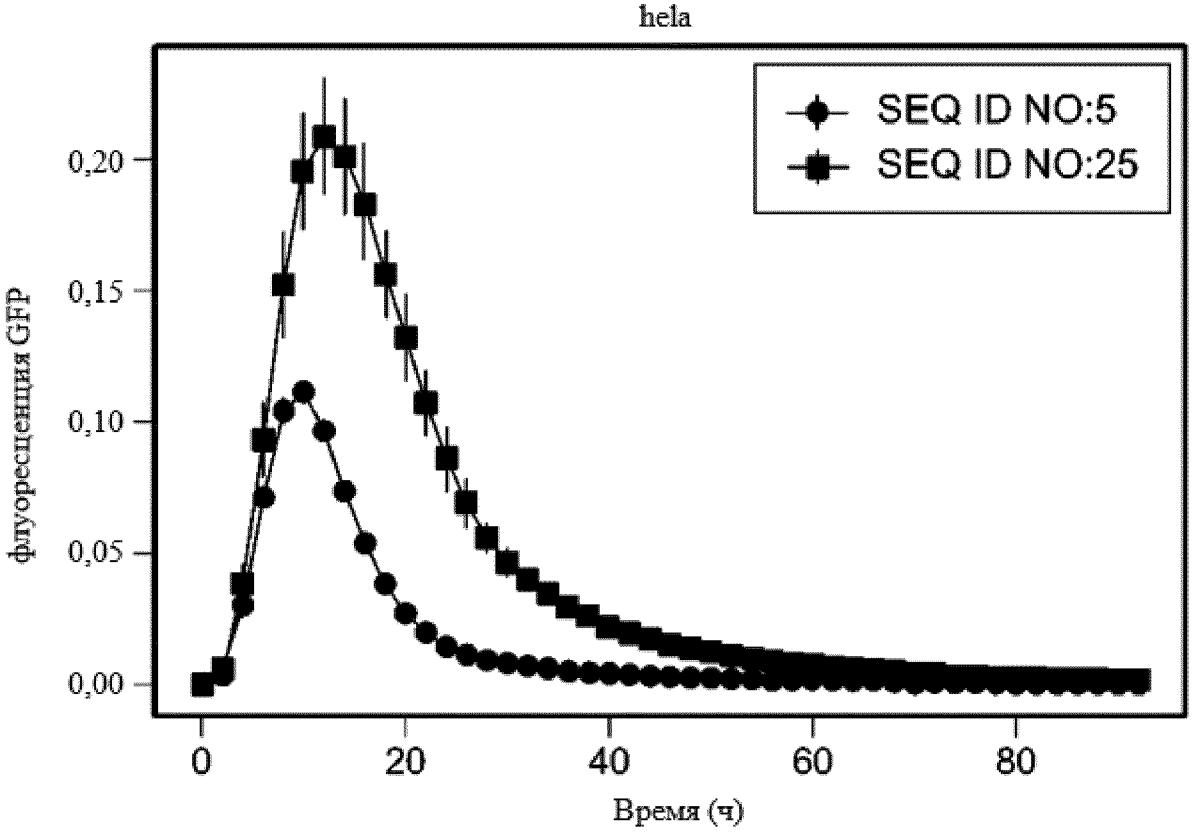
31. Наночастица, полученная способом по любому из пп. 26-30.

32. Способ лечения или профилактики муковисцидоза у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающий введение субъекту мРНК по любому из пп. 1-16, фармацевтической композиции по п. 17, липидной наночастицы по любому из пп. 18-25 или наночастицы по п. 31.

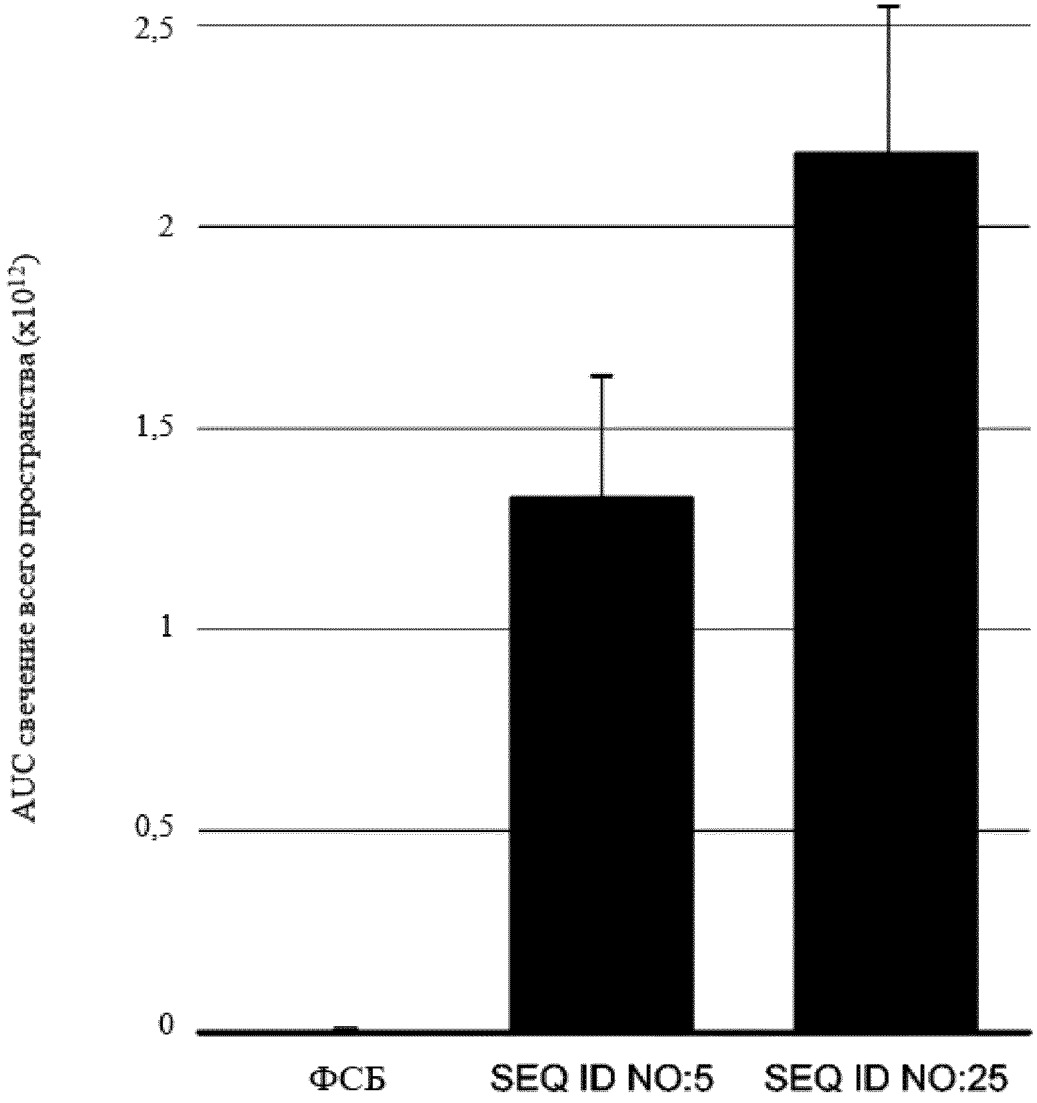
33. Способ профилактики муковисцидоза у субъекта-человека, имеющего вызывающие муковисцидоз мутации в обеих копиях гена CFTR, включающий введение субъекту мРНК по любому из пп. 1-16, фармацевтической композиции по п. 17, липидной наночастицы по любому из пп. 18-25 или наночастицы по п. 31.

34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что мутации, вызывающие муковисцидоз, выбраны из группы, состоящей из G542X, W1282X, R553X, F508del, N1303K, I507del, G551D, S549N, D1152H, R347P, и R117H.

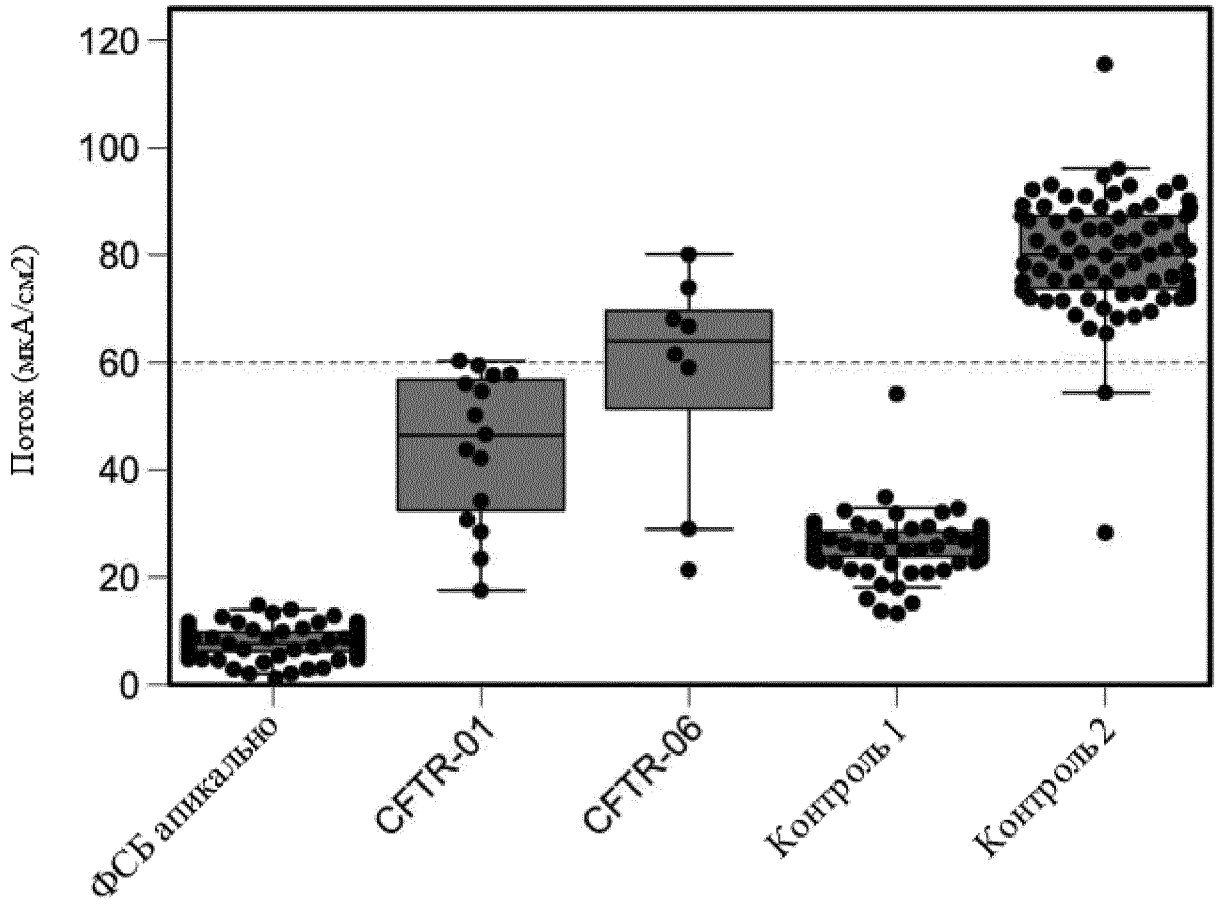
35. Способ по любому из пп. 32-34, отличающийся тем, что введение осуществляют в дыхательные пути или легкие субъекта.


hela
SEQ ID NO:5
SEQ ID NO:25
флуоресценция GFP
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0
20
40
60
80
Время (ч)

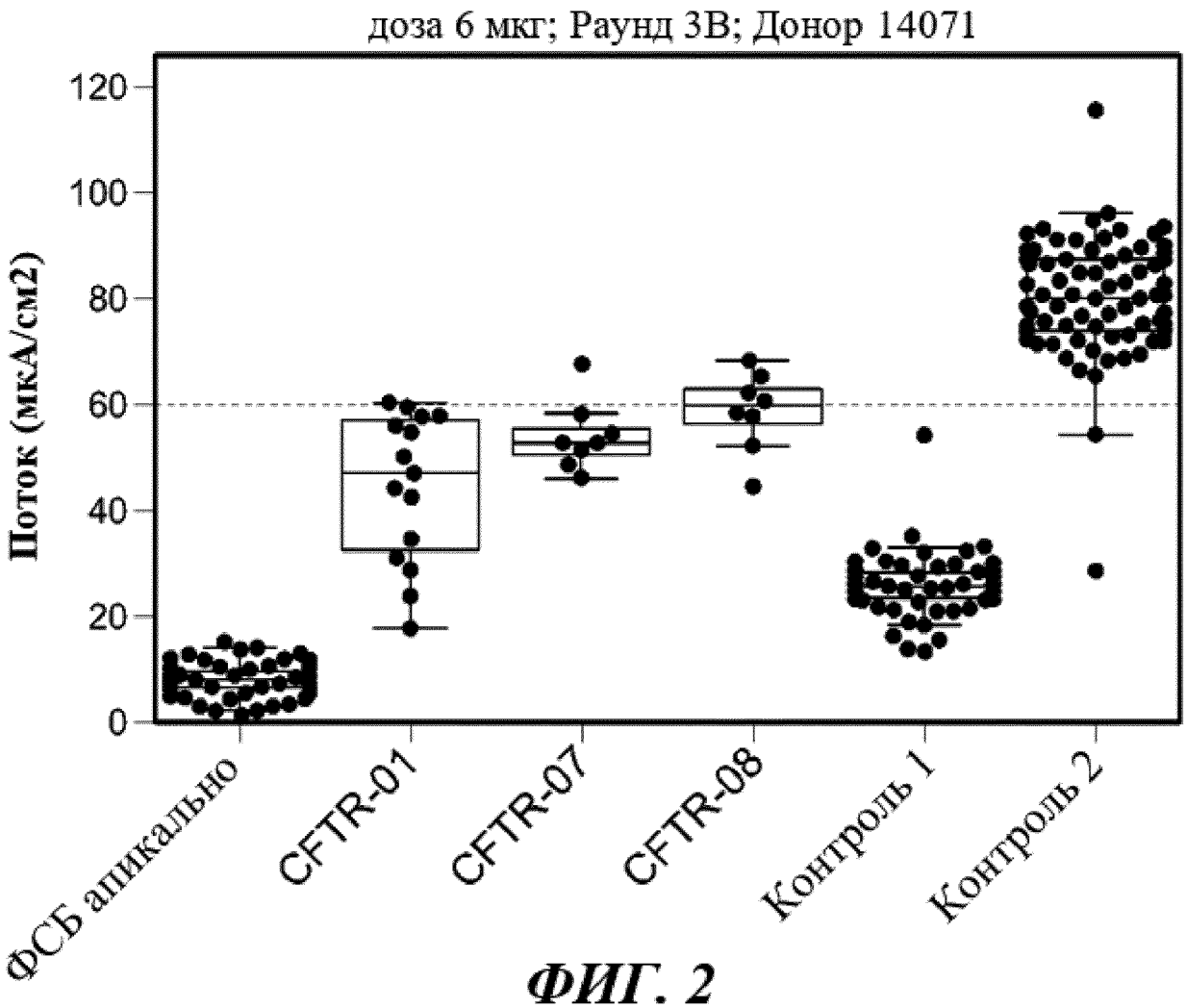
ФИГ. 1А


AUC свечение всего пространства (x10^12)
2,5
2
1,5
1
0,5
0
ФСБ
SEQ ID NO:5
SEQ ID NO:25

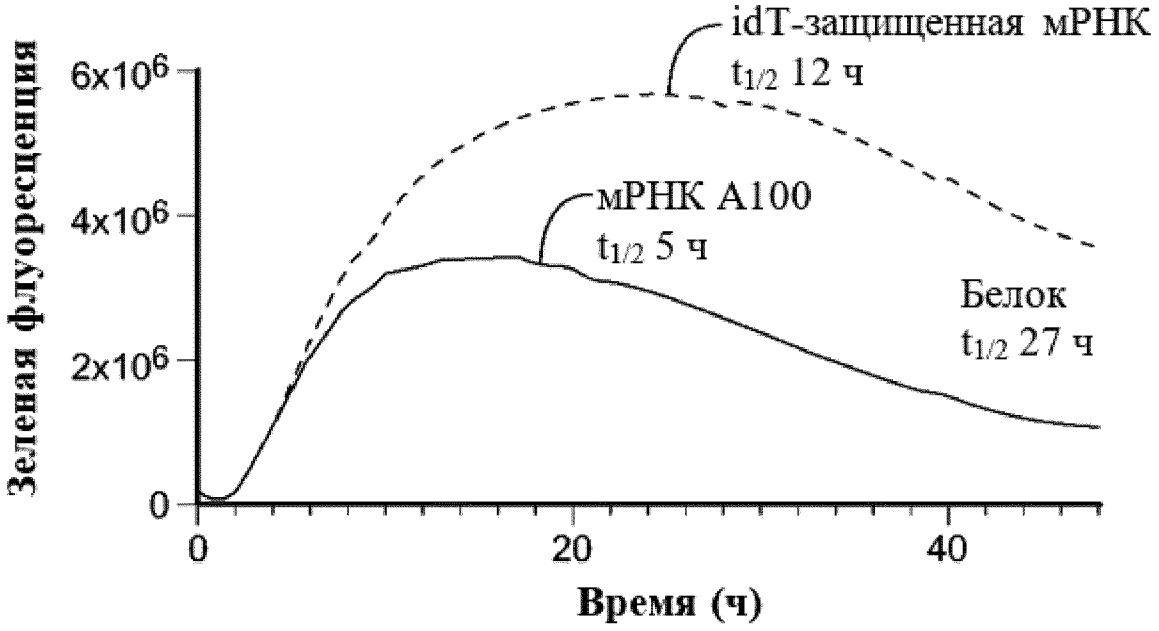
ФИГ. 1В


Поток (мкА/см2)
120
100
80
60
40
20
0
ФСБ апикально
CFTR-01
CFTR-06
Контроль 1
Контроль 2

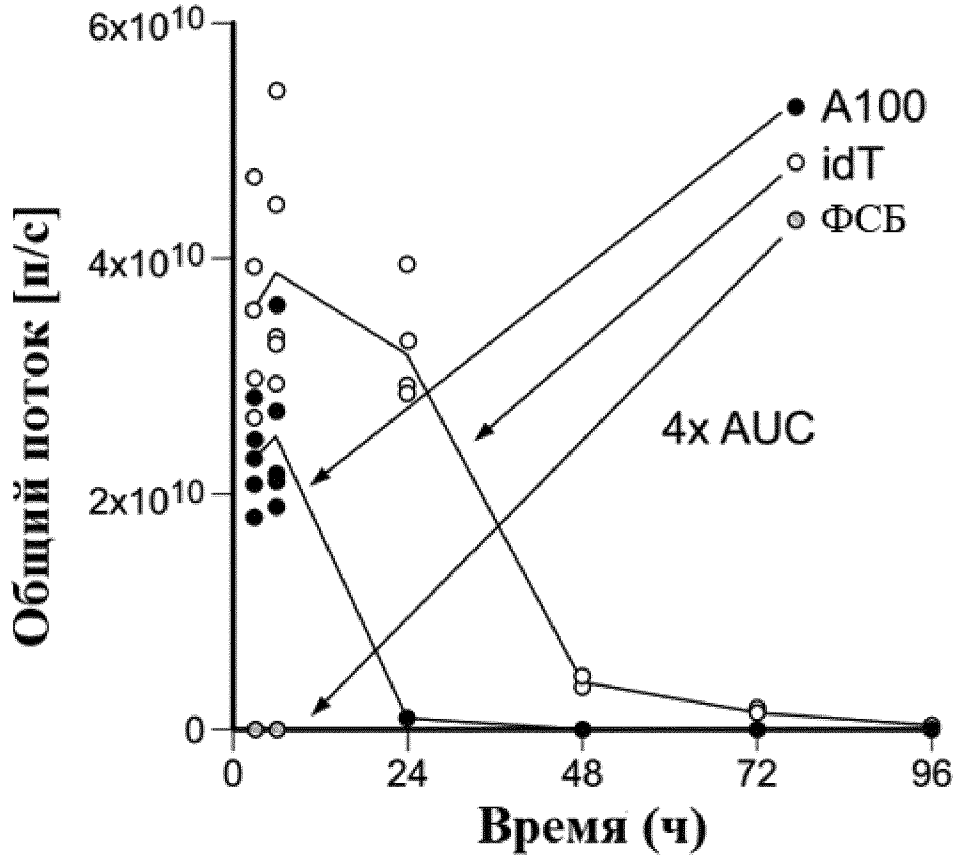
ФИГ. 1С


доза 6 мкг; Раунд 3B; Донор 14071
Поток (мкА/см2)
120
100
80
60
40
20
0
ФСБ апикально
CFTR-01
CFTR-07
CFTR-08
Контроль 1
Контроль 2

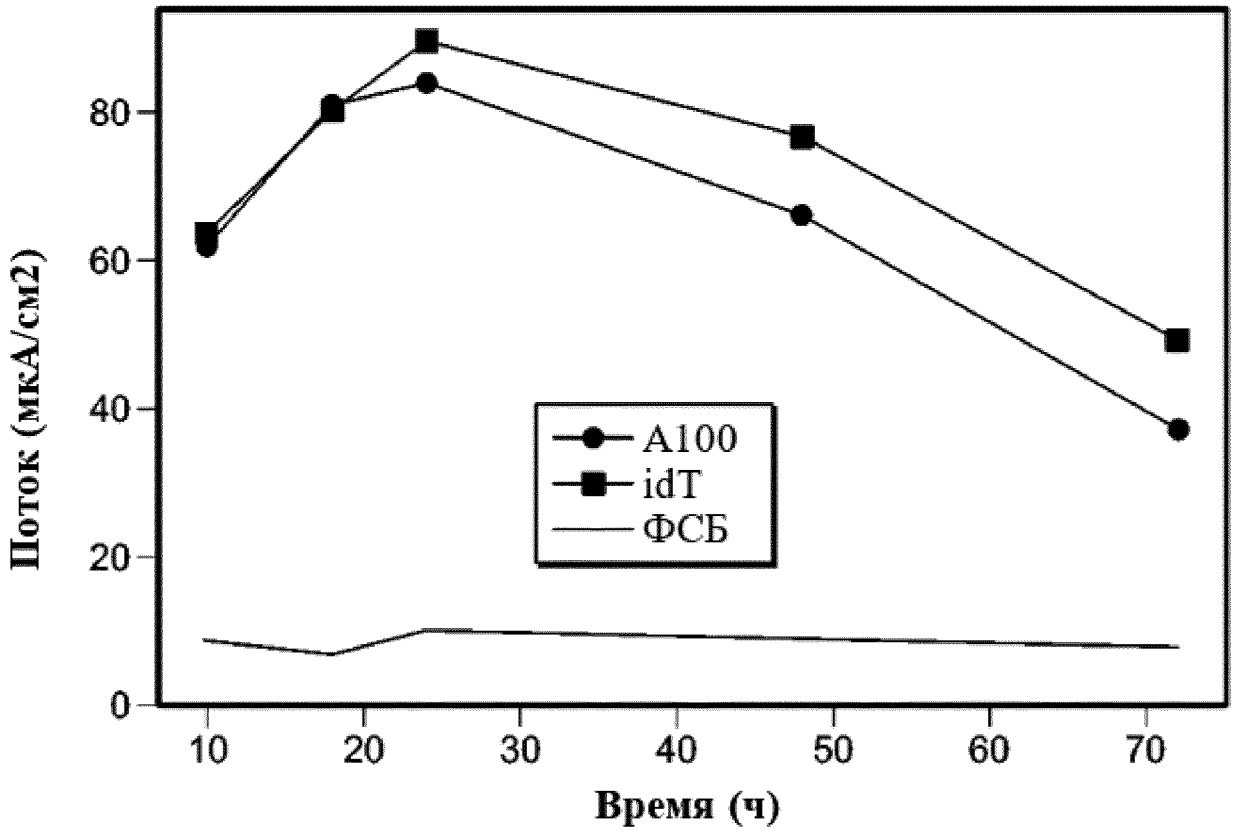
ФИГ. 2


idT-защищенная мРНК
t1/2 12 ч
мРНК A100
t1/2 5 ч
Белок
t1/2 27 ч
Зеленая флуоресценция
6x10^6
4x10^6
2x10^6
0
0
20
40
Время (ч)

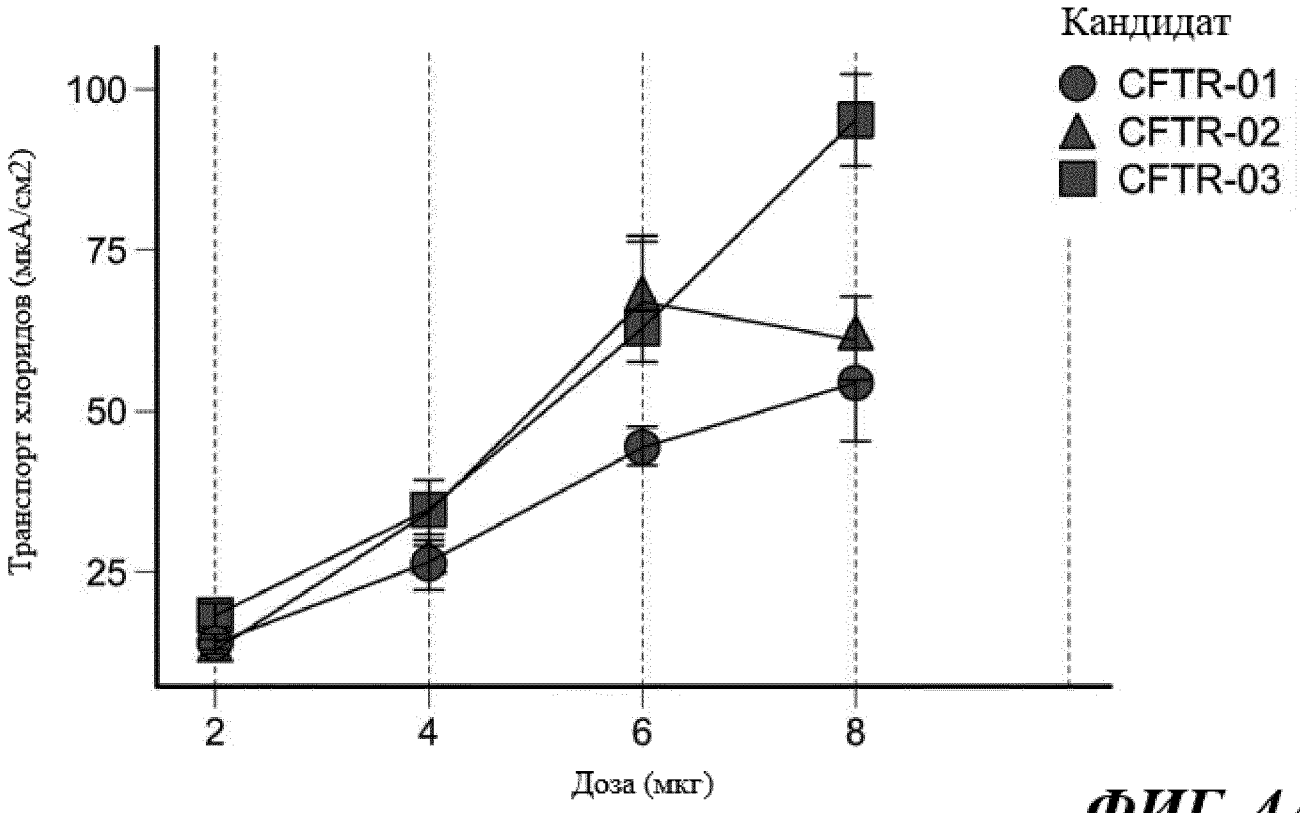
ФИГ. 3А


A100
idT
ФСБ
4x AUC
Общий поток [п/с]
6x10^10
4x10^10
2x10^10
0
0
24
48
72
96
Время (ч)

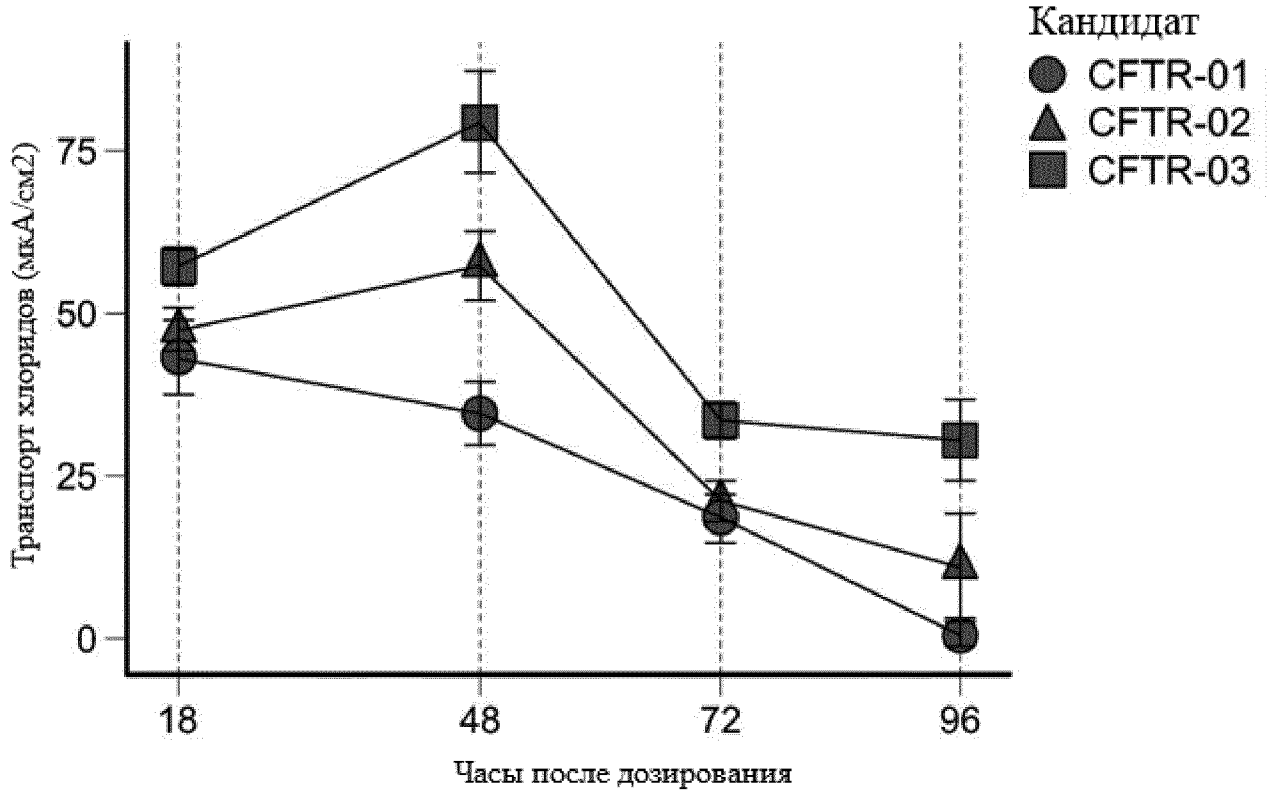
ФИГ. 3В


Поток (мкА/см2)
0
20
40
60
80
10
20
30
40
50
60
70
Время (ч)
A100
idT
ФСБ

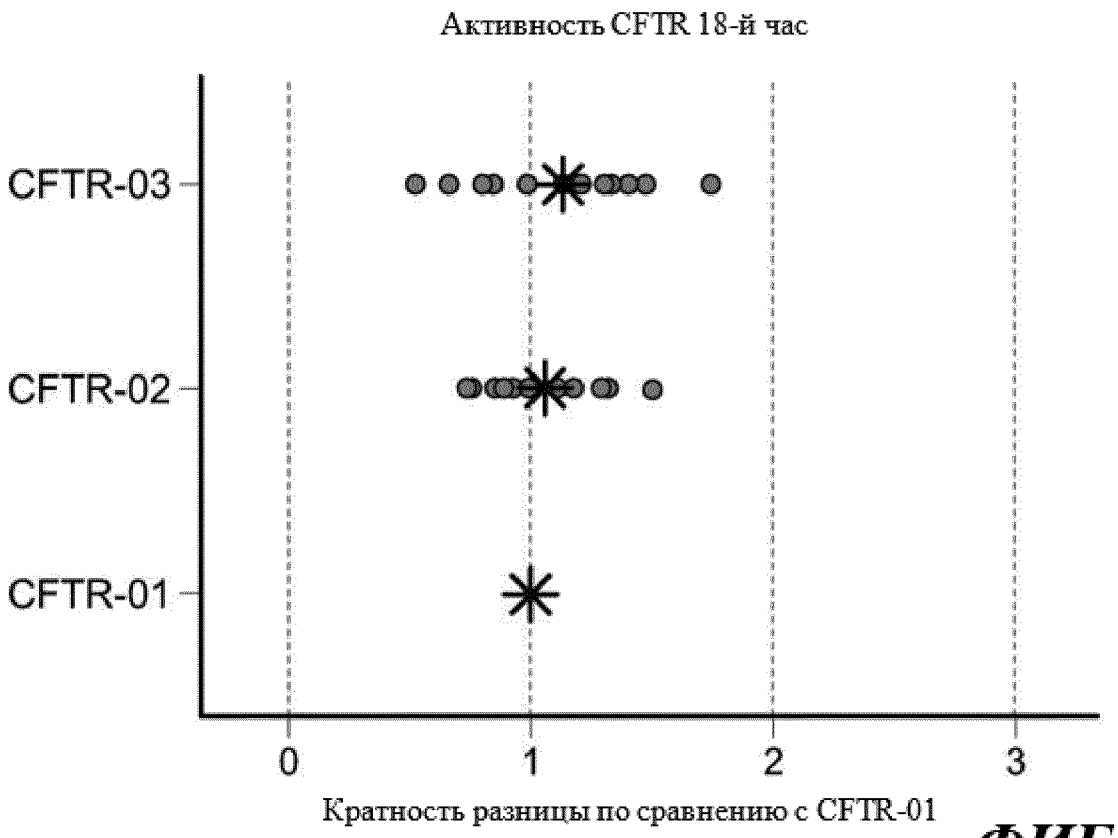
ФИГ. 3С


Кандидат
CFTR-01
CFTR-02
CFTR-03
Транспорт хлоридов (мкА/см2)
100
75
50
25
2
4
6
8
Доза (мкг)

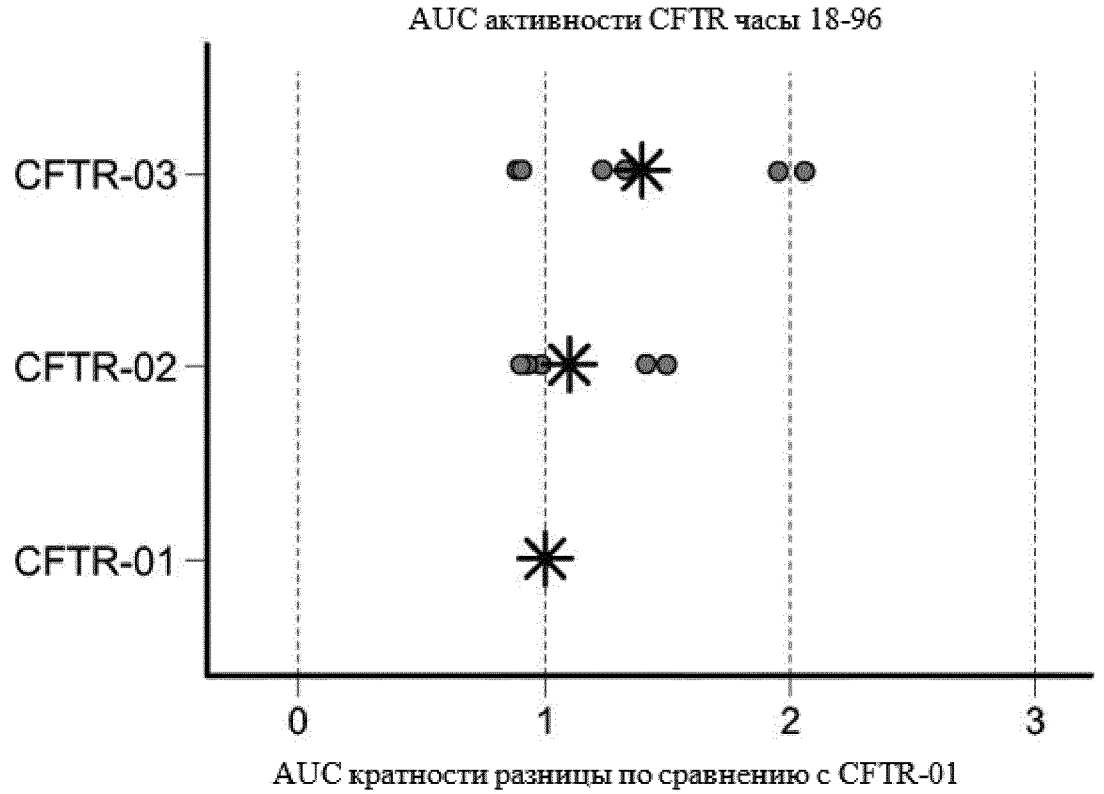
ФИГ. 4A


Кандидат
CFTR-01
CFTR-02
CFTR-03
Транспорт хлоридов (мкА/см2)
75
50
25
0
18
48
72
96
Часы после дозирования

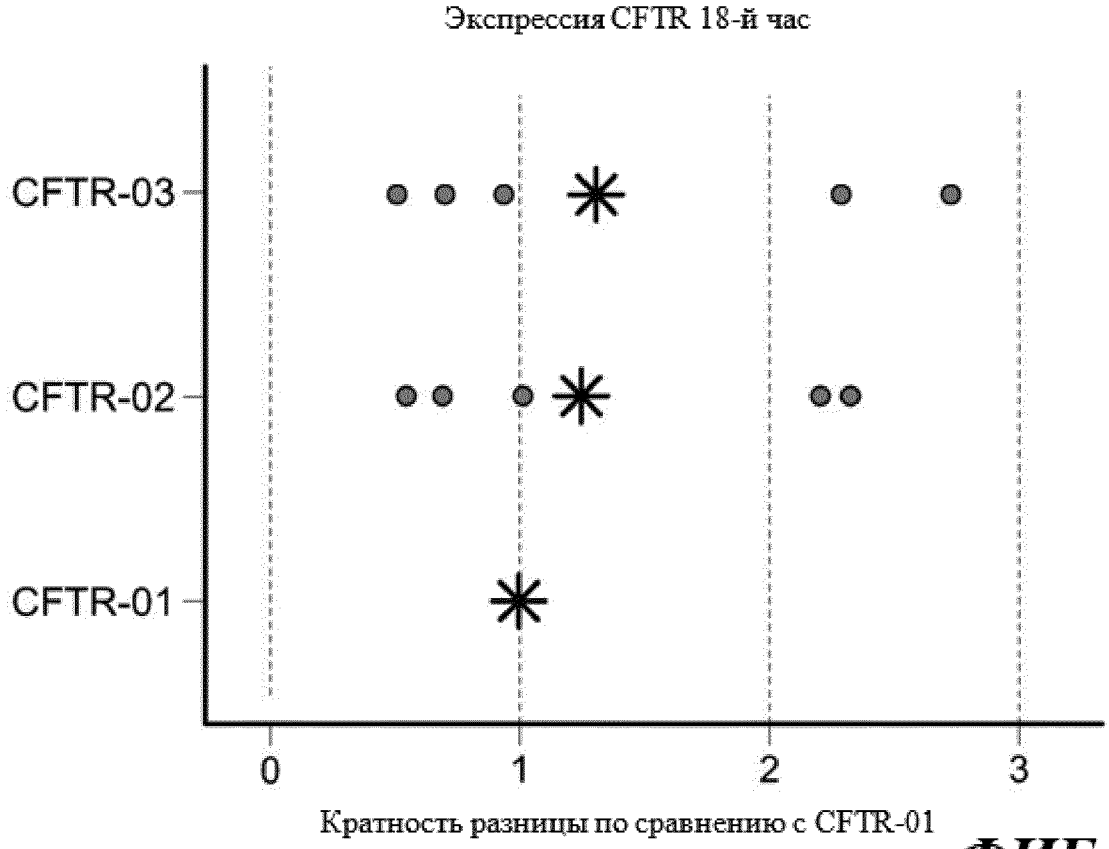
ФИГ. 4B


Активность CFTR 18-й час
CFTR-03
CFTR-02
CFTR-01
0
1
2
3
Кратность разницы по сравнению с CFTR-01

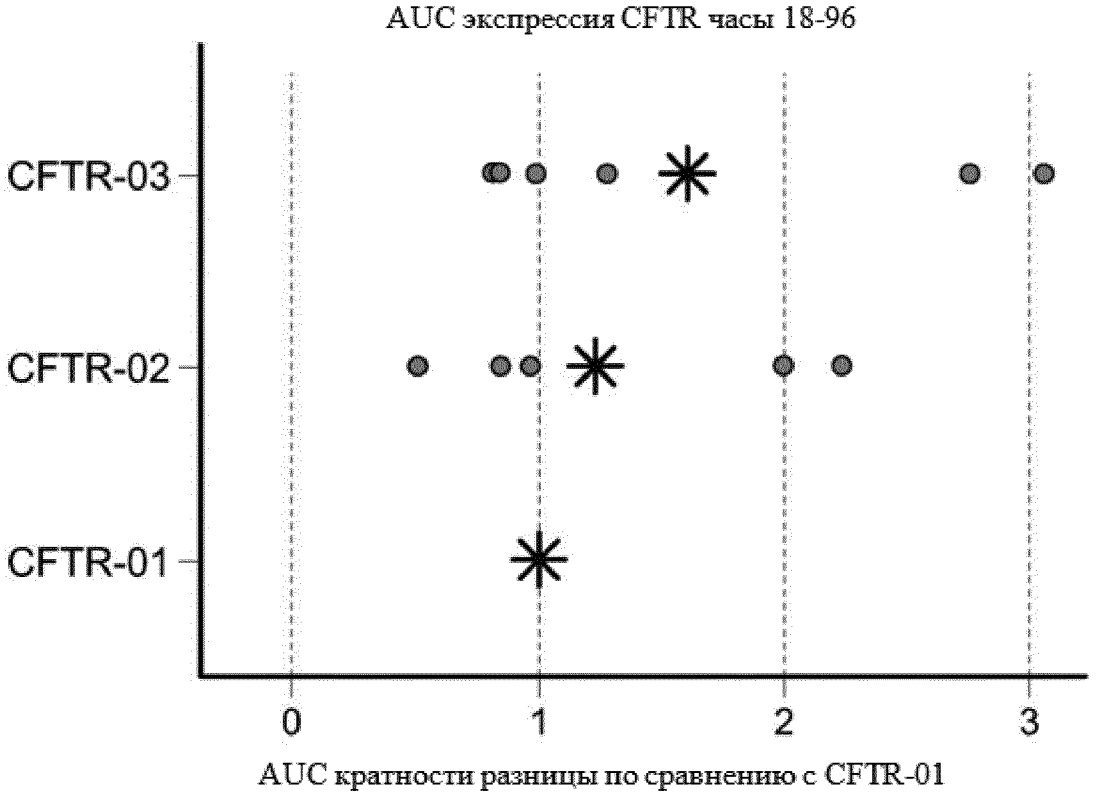
ФИГ. 5A


AUC активности CFTR часы 18-96
CFTR-03
CFTR-02
CFTR-01
0
1
2
3
AUC кратности разницы по сравнению с CFTR-01

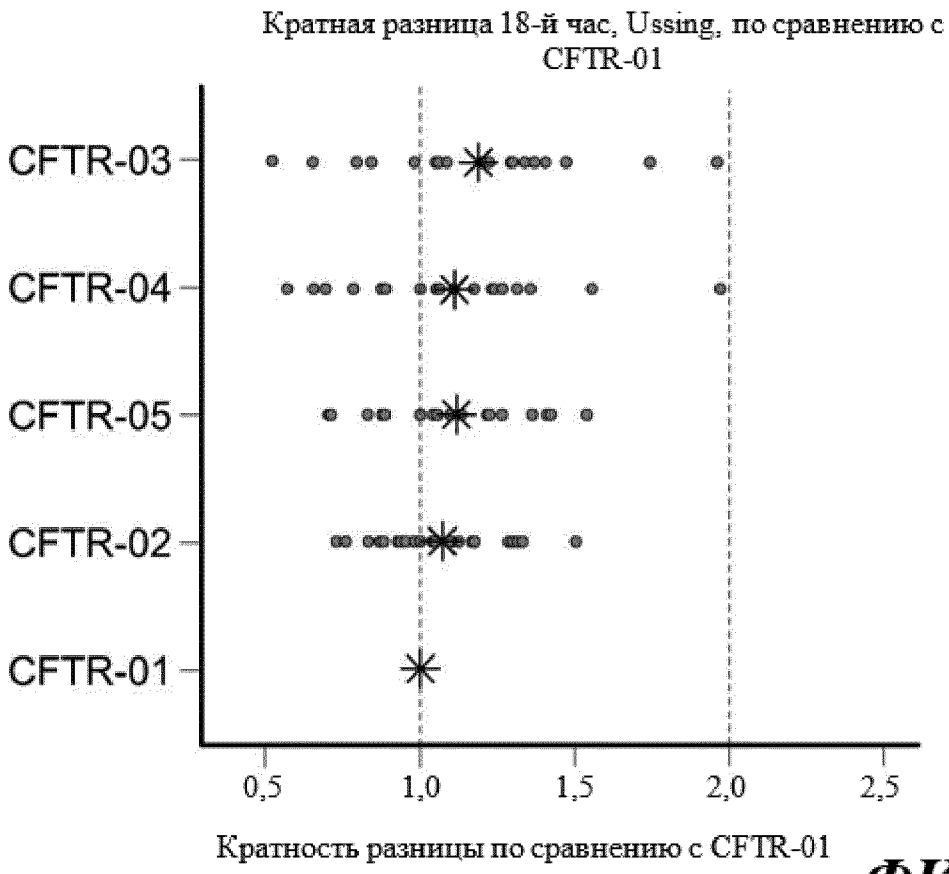
ФИГ. 5B


Экспрессия CFTR 18-й час
CFTR-03
CFTR-02
CFTR-01
0
1
2
3
Кратность разницы по сравнению с CFTR-01

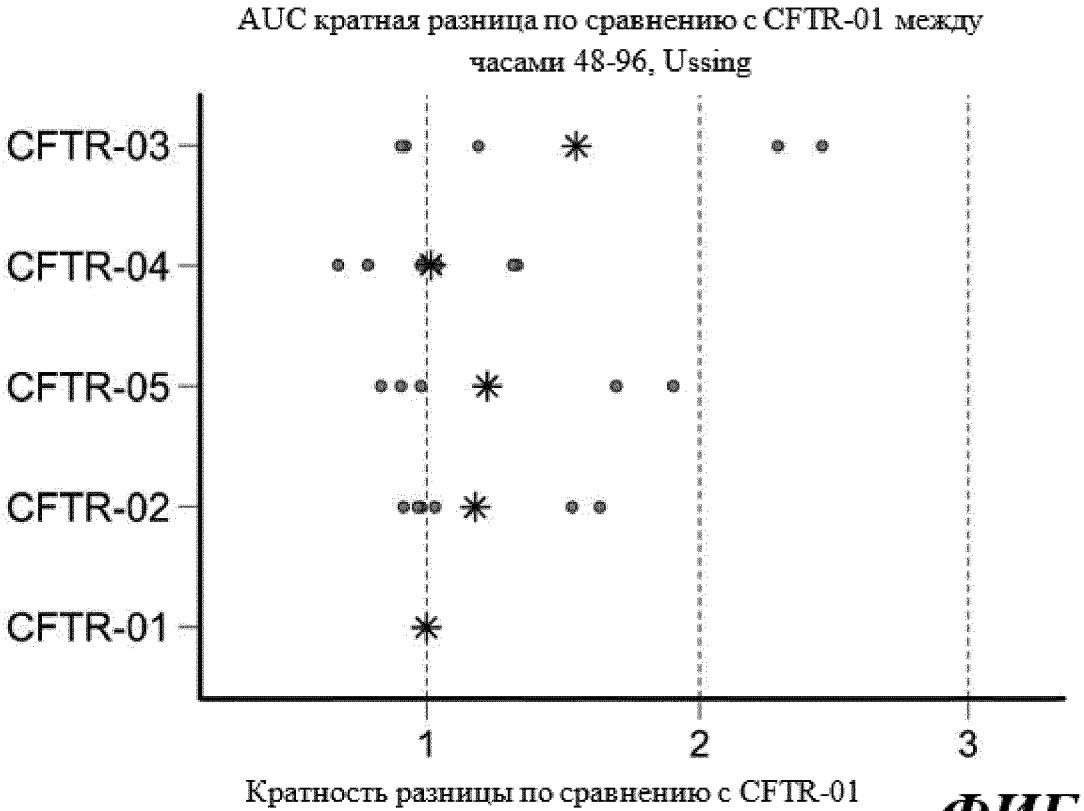
ФИГ. 5C


AUC экспрессия CFTR часы 18-96
CFTR-03
CFTR-02
CFTR-01
0
1
2
3
AUC кратности разницы по сравнению с CFTR-01

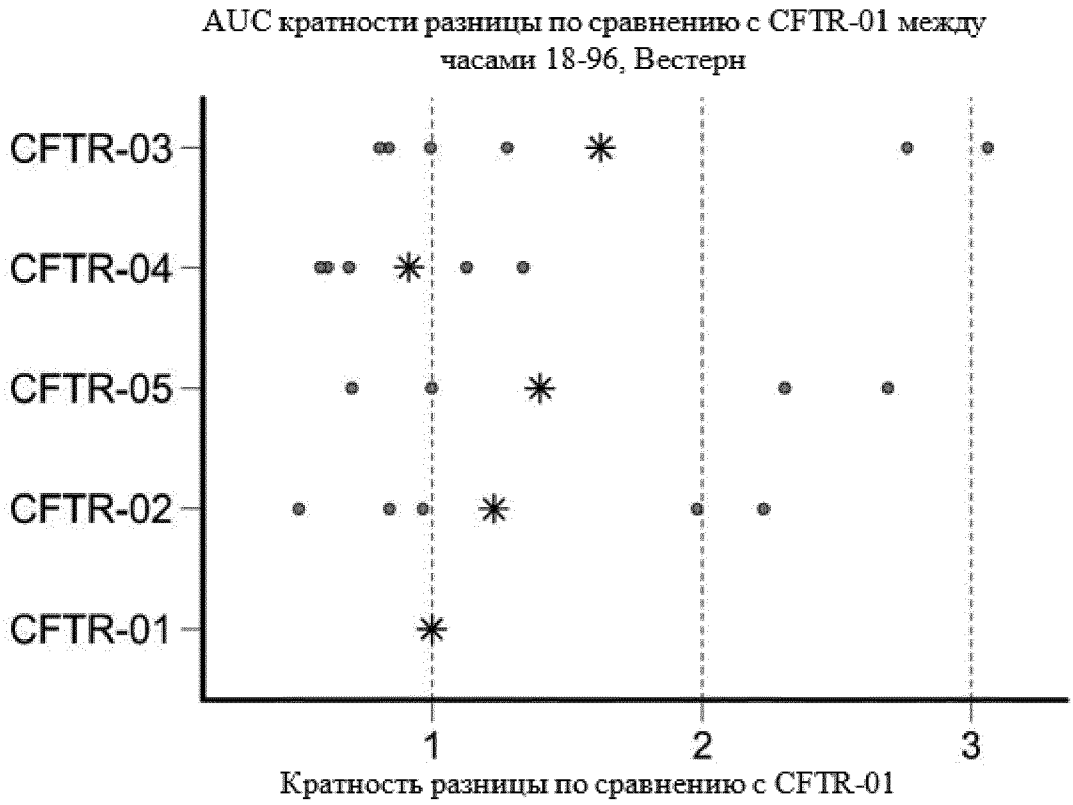
ФИГ. 5D


Кратная разница 18-й час, Ussing, по сравнению с CFTR-01
CFTR-03
CFTR-04
CFTR-05
CFTR-02
CFTR-01
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
Кратность разницы по сравнению с CFTR-01

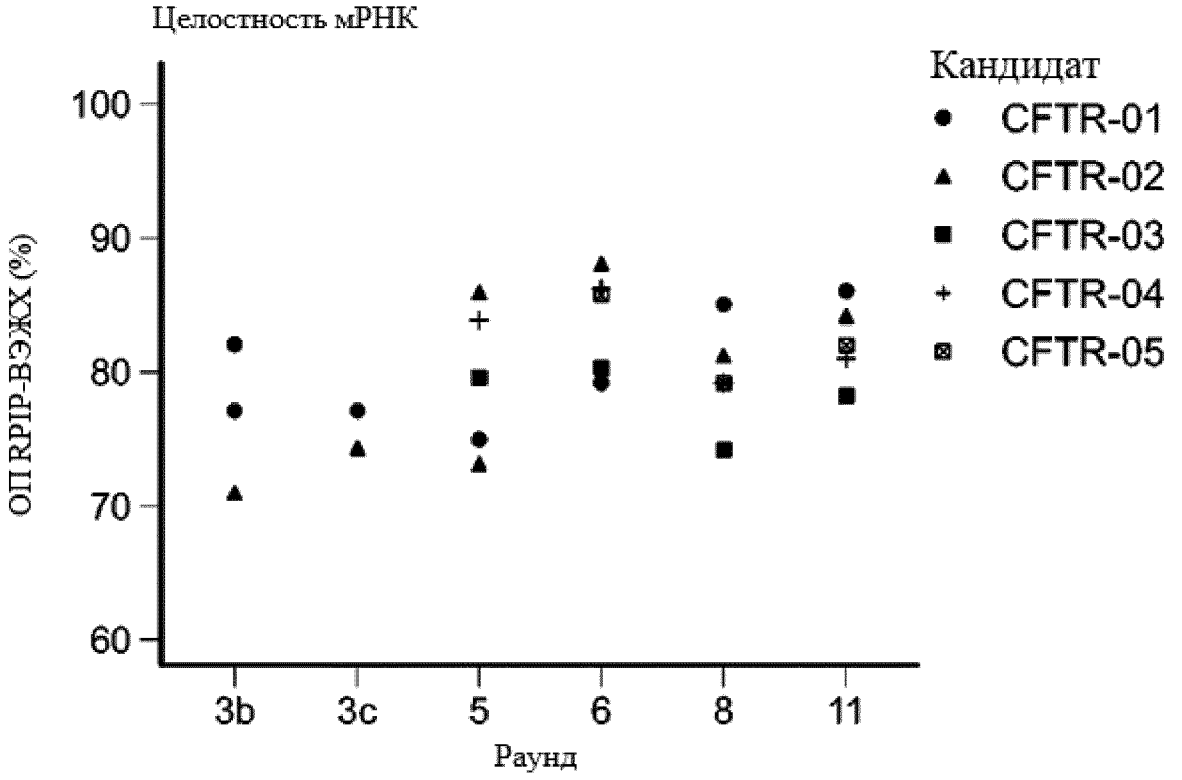
ФИГ. 6A


AUC кратная разница по сравнению с CFTR-01 между часами 48-96, Ussing
CFTR-03
CFTR-04
CFTR-05
CFTR-02
CFTR-01
1
2
3
Кратность разницы по сравнению с CFTR-01

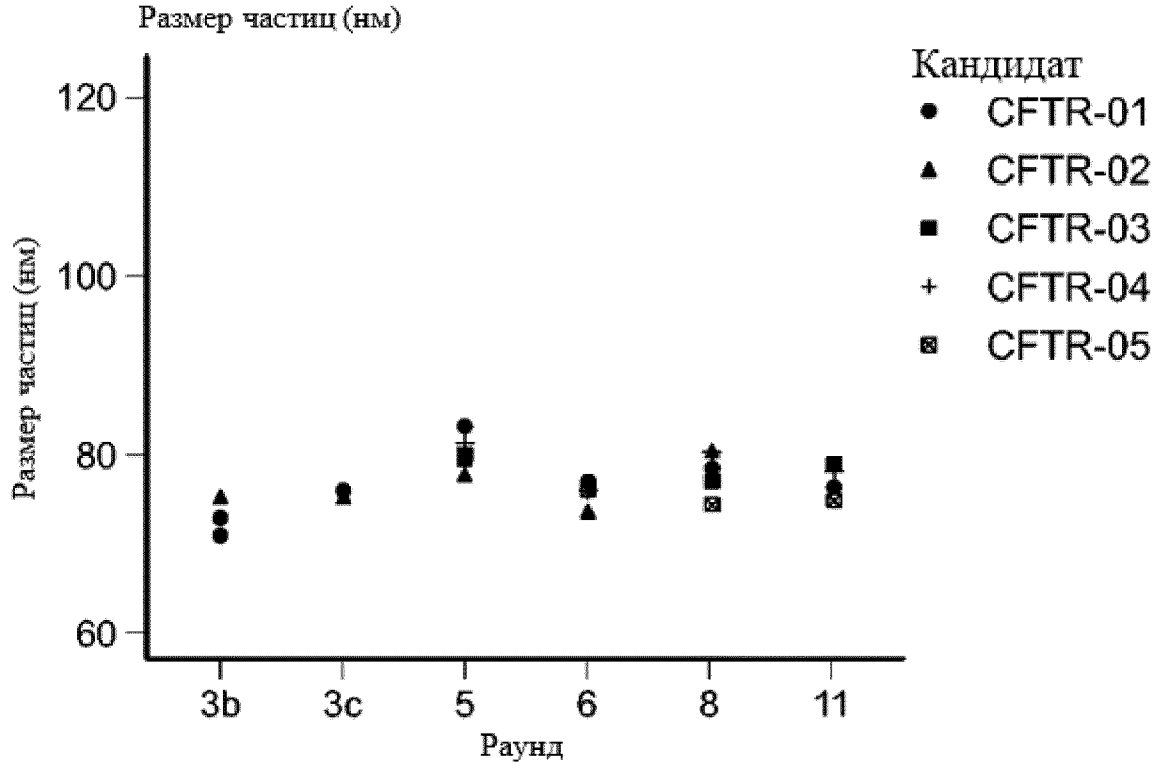
ФИГ. 6B


AUC кратности разницы по сравнению с CFTR-01 между часами 18-96, Вестерн
CFTR-03
CFTR-04
CFTR-05
CFTR-02
CFTR-01
1
2
3
Кратность разницы по сравнению с CFTR-01

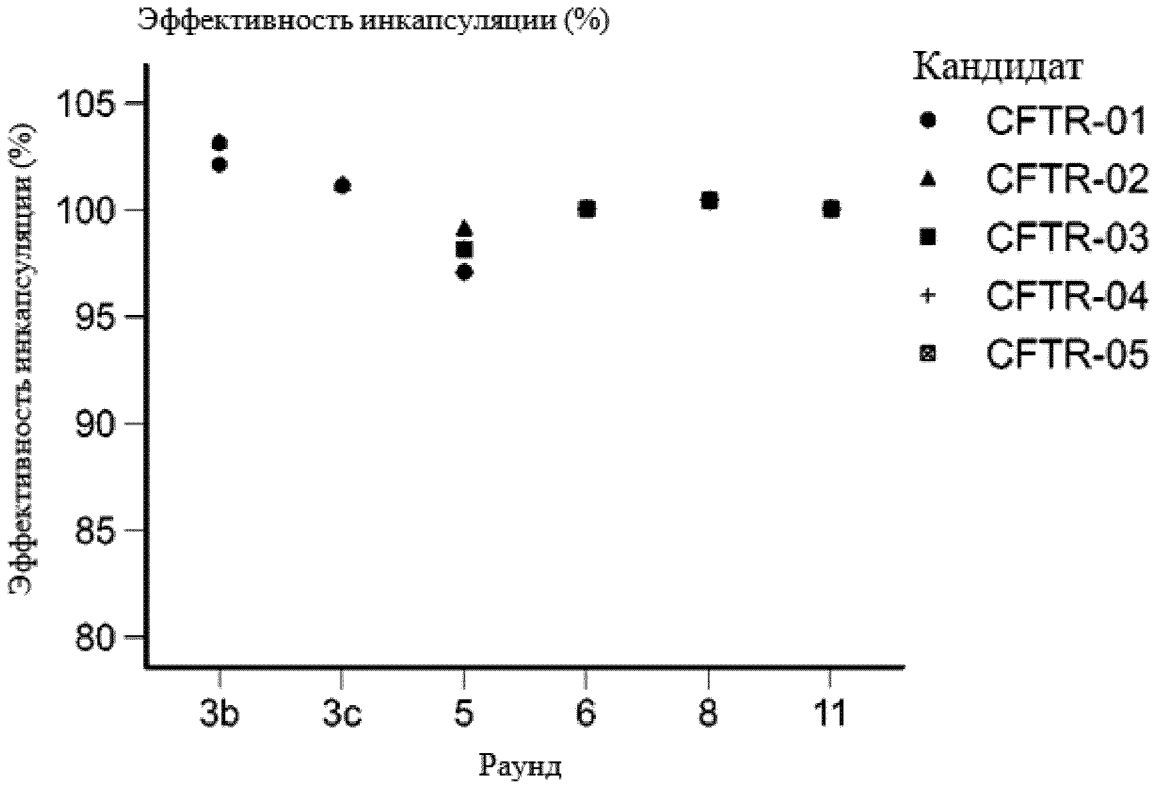
ФИГ. 6С


Целостность мРНК
ОП RPIP-ВЭЖХ (%)
100
90
80
70
60
3b
3c
5
6
8
11
Раунд
Кандидат
CFTR-01
CFTR-02
CFTR-03
CFTR-04
CFTR-05

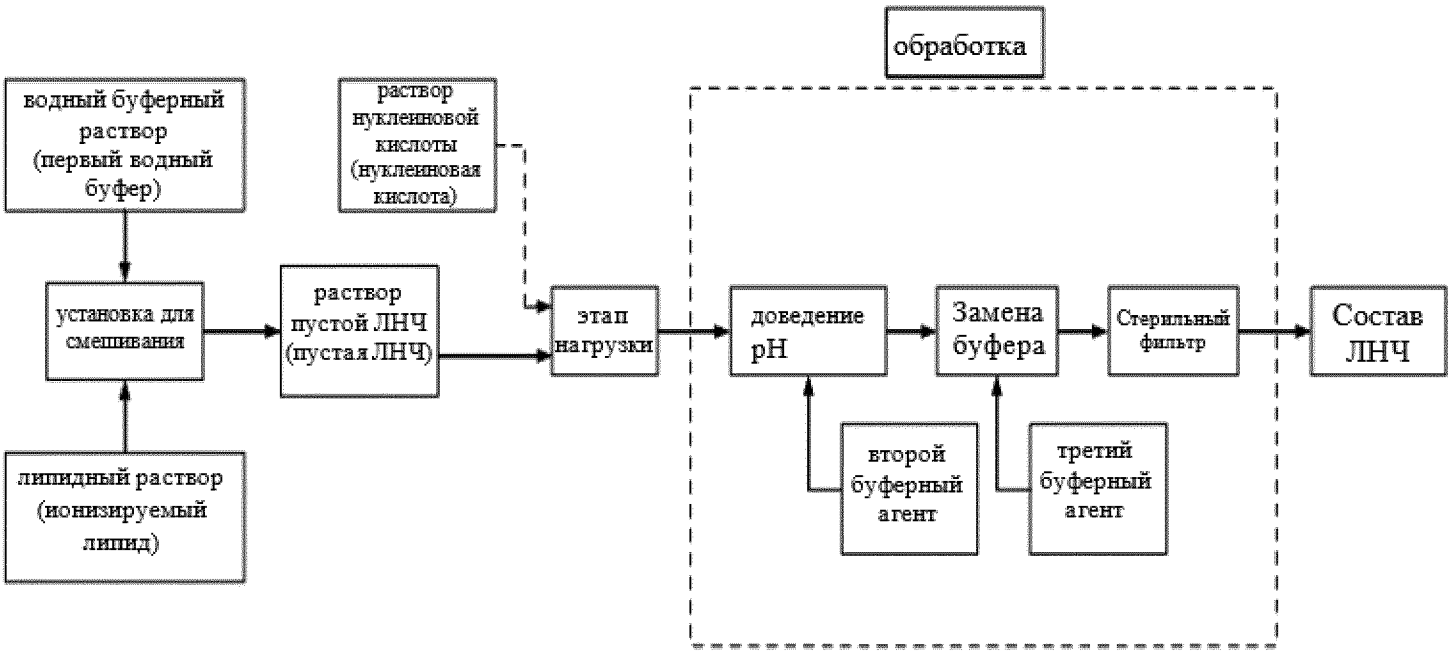
ФИГ. 7А


Размер частиц (нм)
Размер частиц (нм)
120
100
80
60
3b
3c
5
6
8
11
Раунд
Кандидат
CFTR-01
CFTR-02
CFTR-03
CFTR-04
CFTR-05

ФИГ. 7В

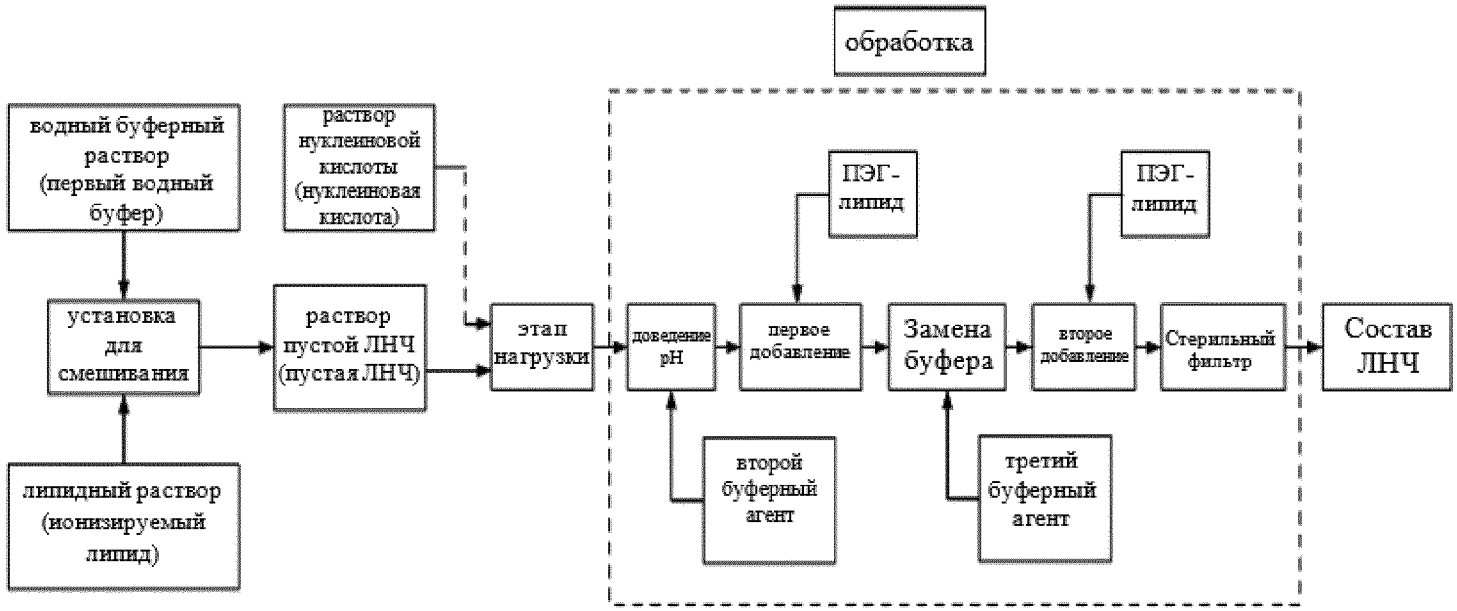

Эффективность инкапсуляции (%)
Эффективность инкапсуляции (%)
105
100
95
90
85
80
3b
3c
5
6
8
11
Раунд
Кандидат
CFTR-01
CFTR-02
CFTR-03
CFTR-04
CFTR-05

ФИГ. 7С



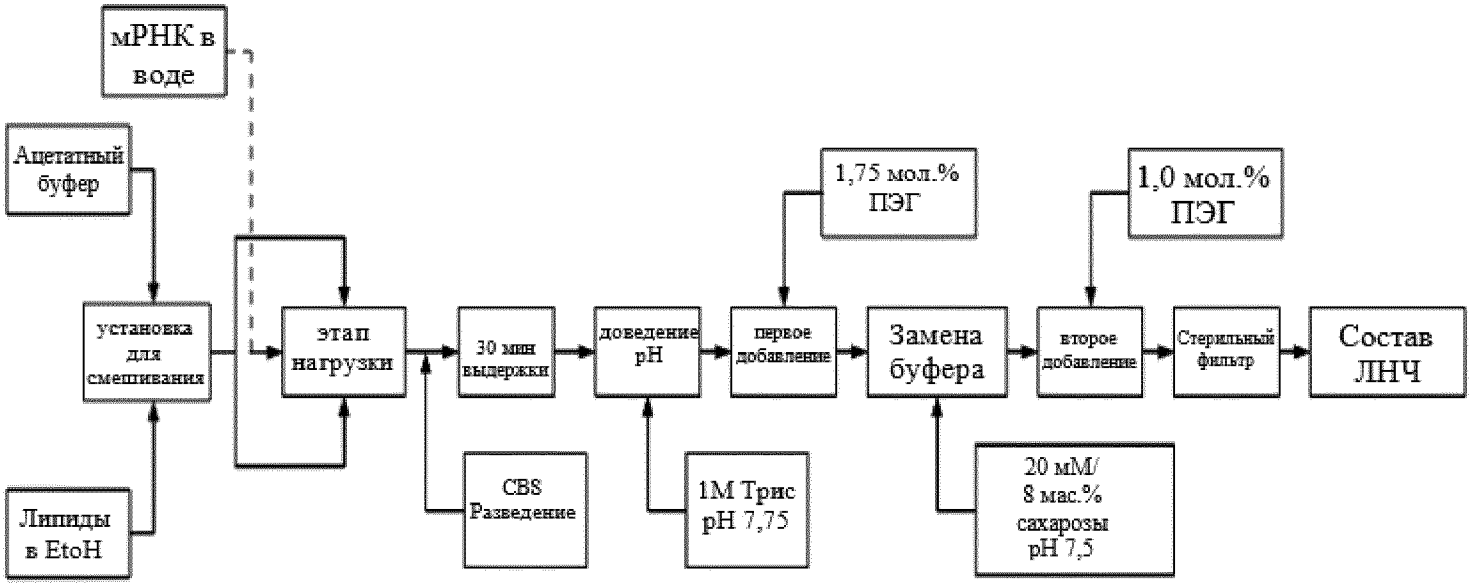
Примерная схема PHL первого поколения

ФИГ. 8



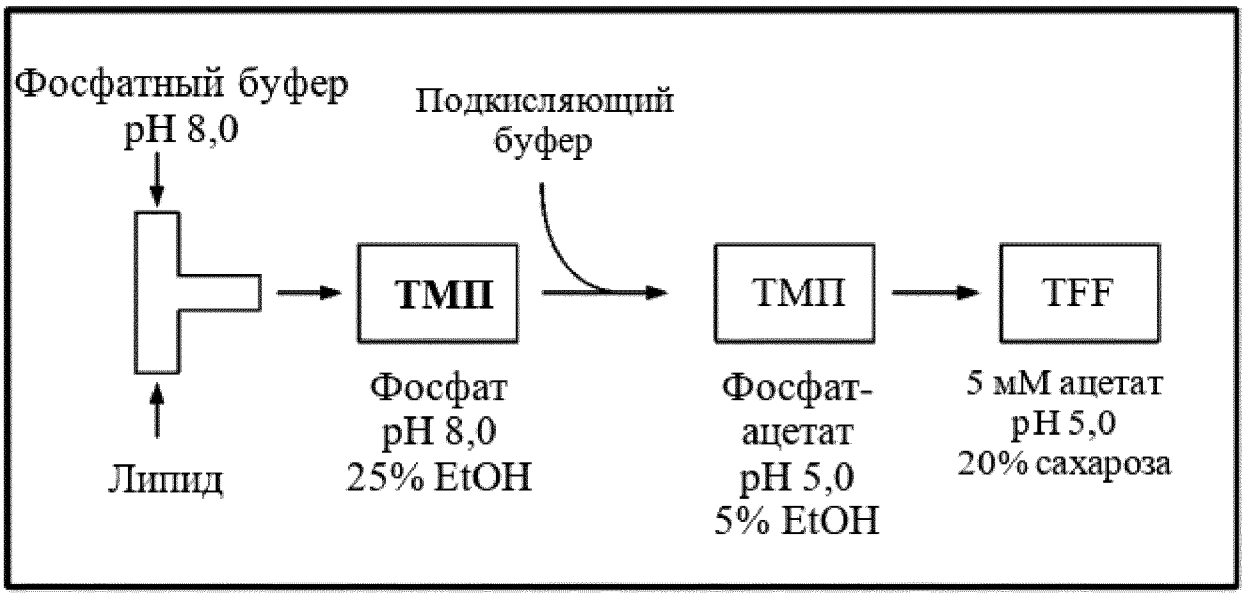
Примерная схема PHL второго поколения (общая)

ФИГ. 9

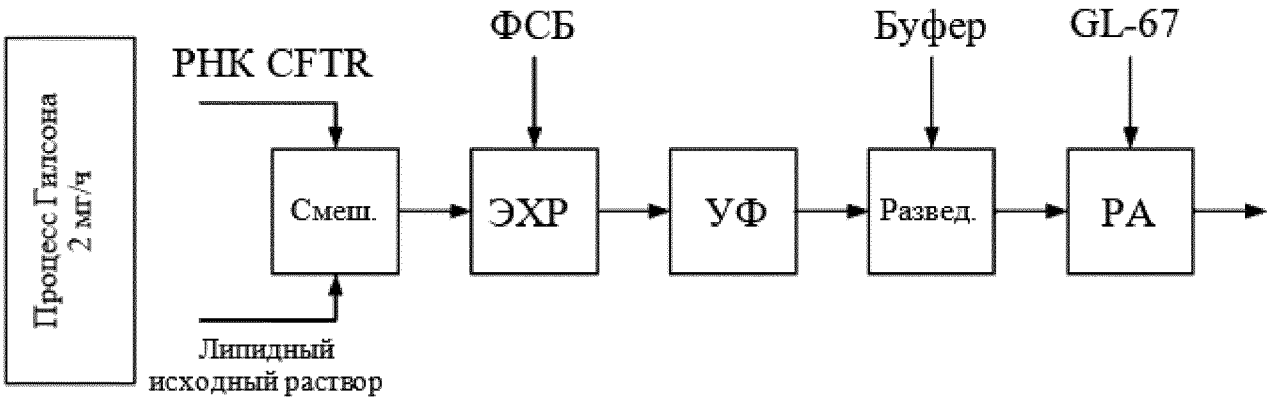


Примерная схема PHL второго поколения (конкретная)

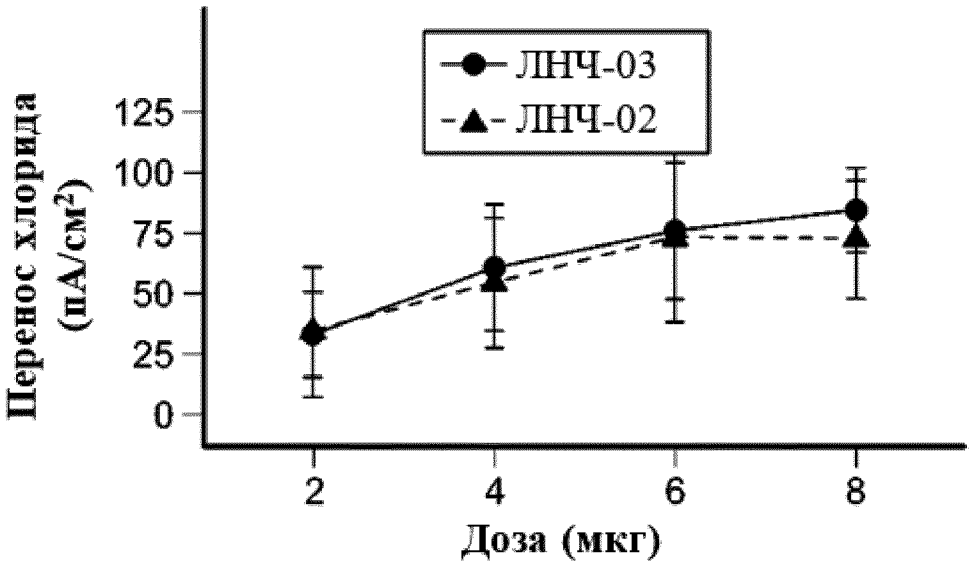
ФИГ. 10


Фосфатный буфер
pH 8,0
Подкисляющий
буфер
ТМП
ТМП
TFF
Липид
Фосфат
pH 8,0
25% EtOH
Фосфат-
ацетат
pH 5,0
5% EtOH
5 мМ ацетат
pH 5,0
20% сахароза

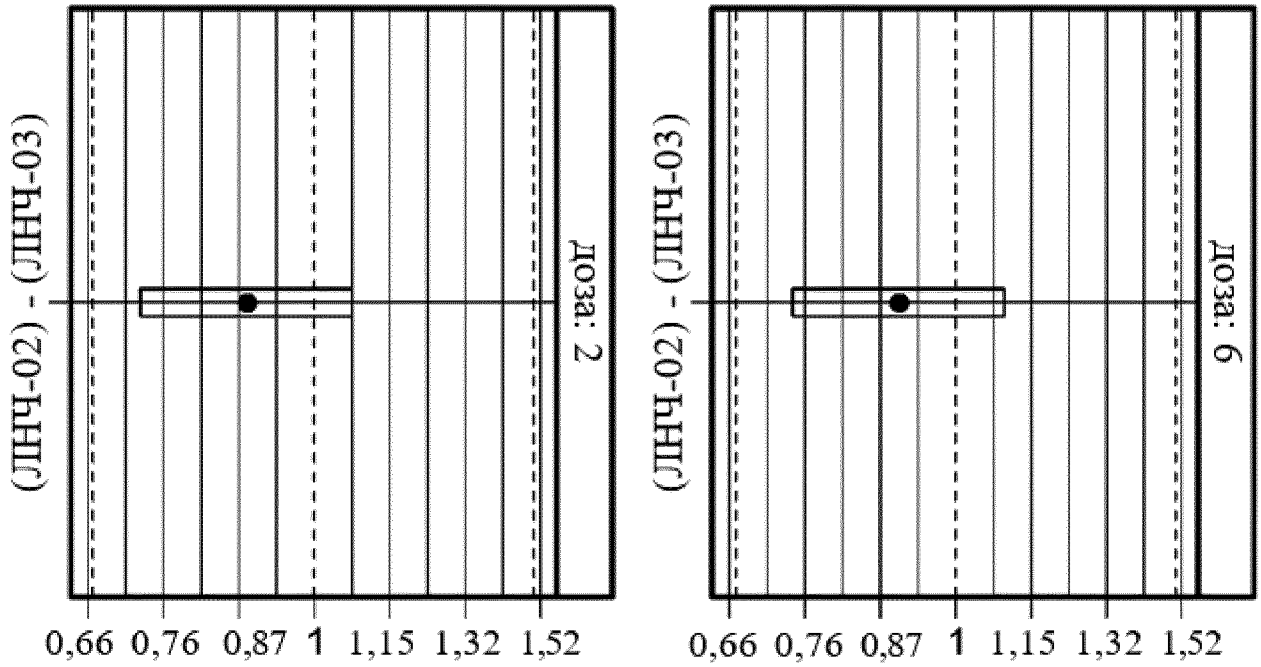
ФИГ. 11


Процесс Гилсона
2 мг/ч
РНК CFTR
ФСБ
Буфер
GL-67
Смеш.
ЭХР
УФ
Развед.
РА
Липидный
исходный раствор

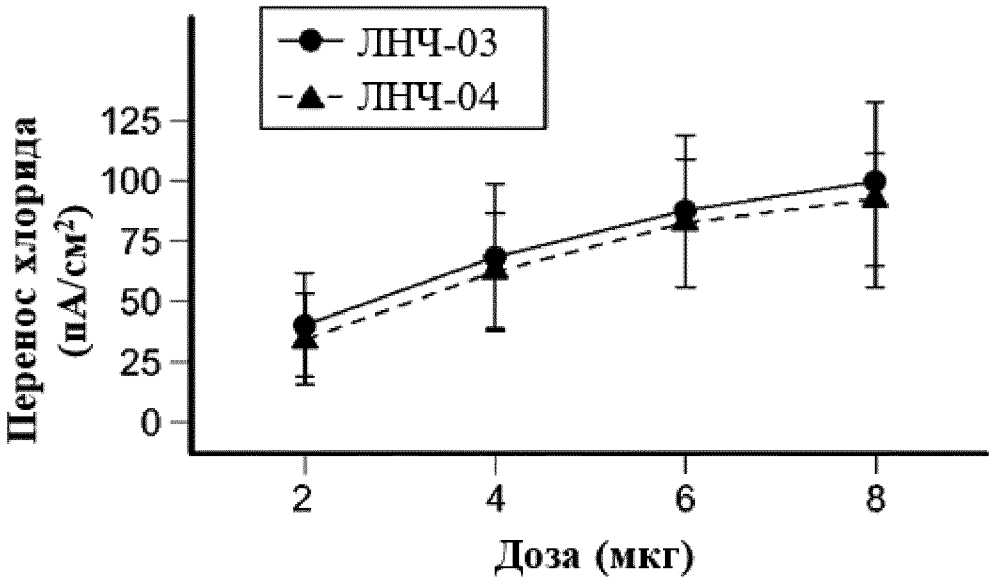
ФИГ. 12



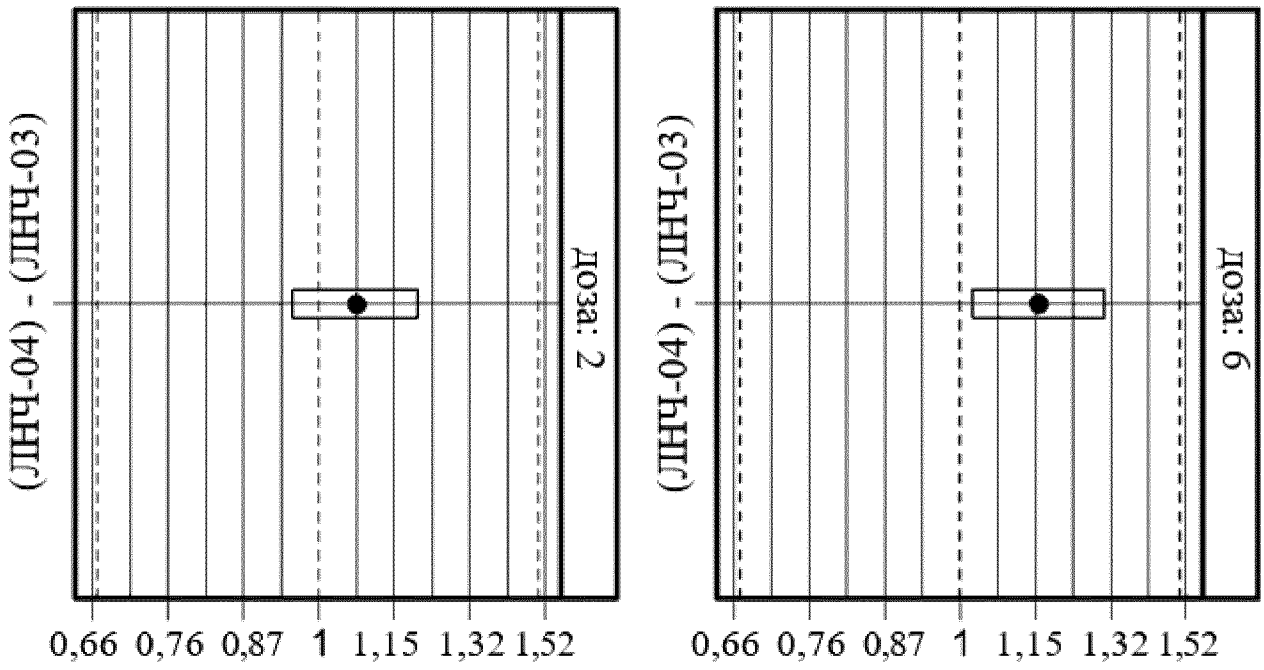
ФИГ. 13А



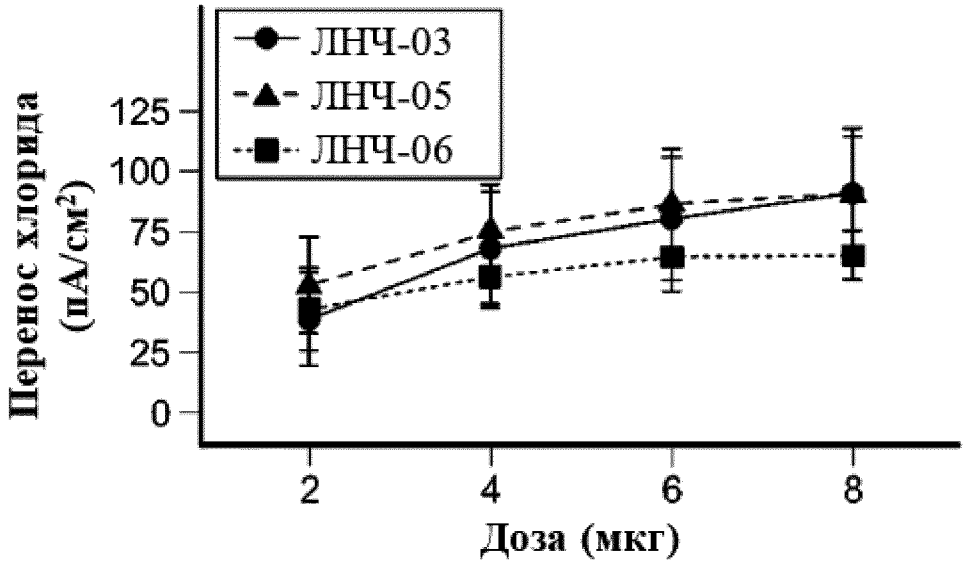
ФИГ. 13В



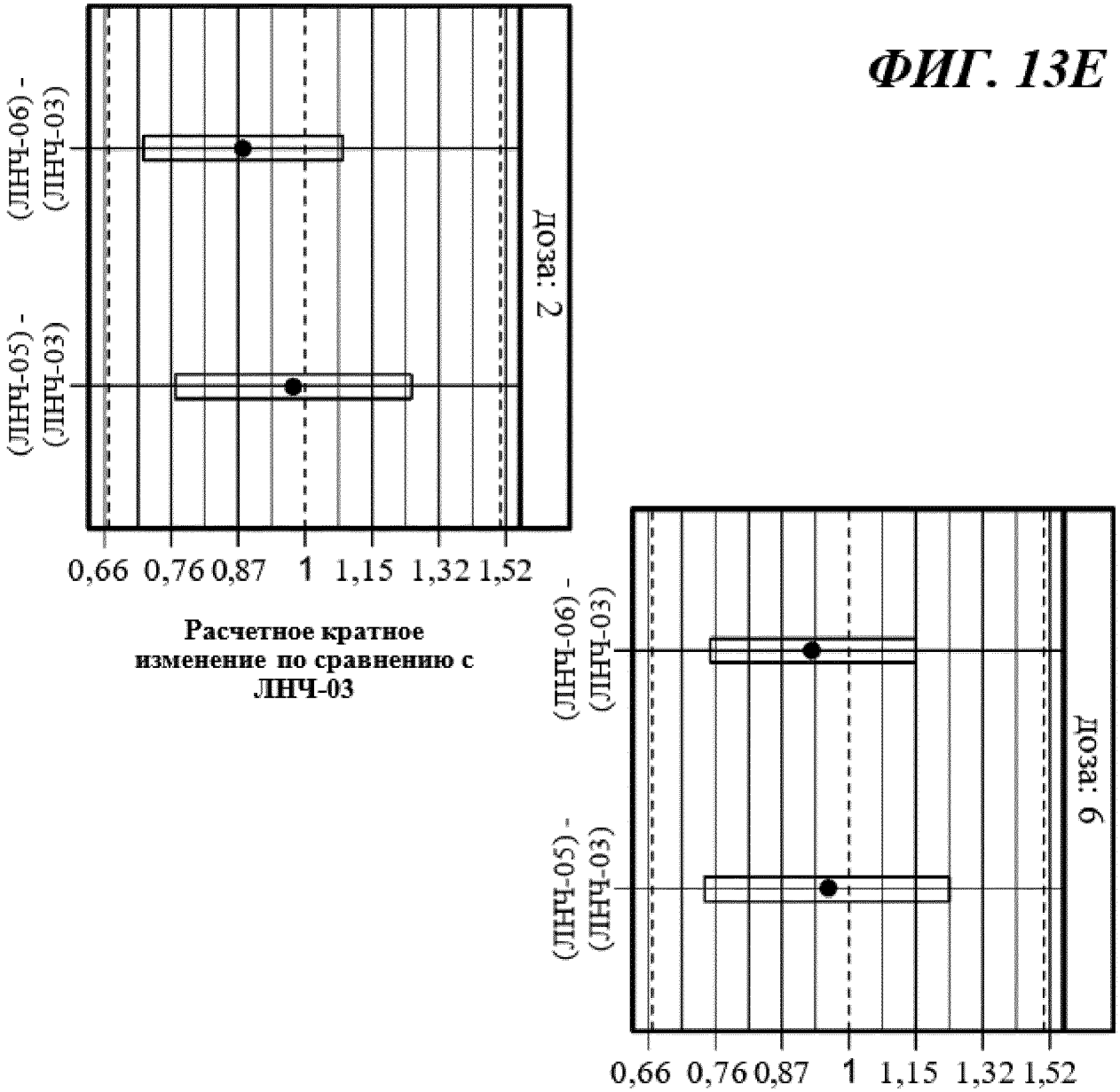
ФИГ. 13C



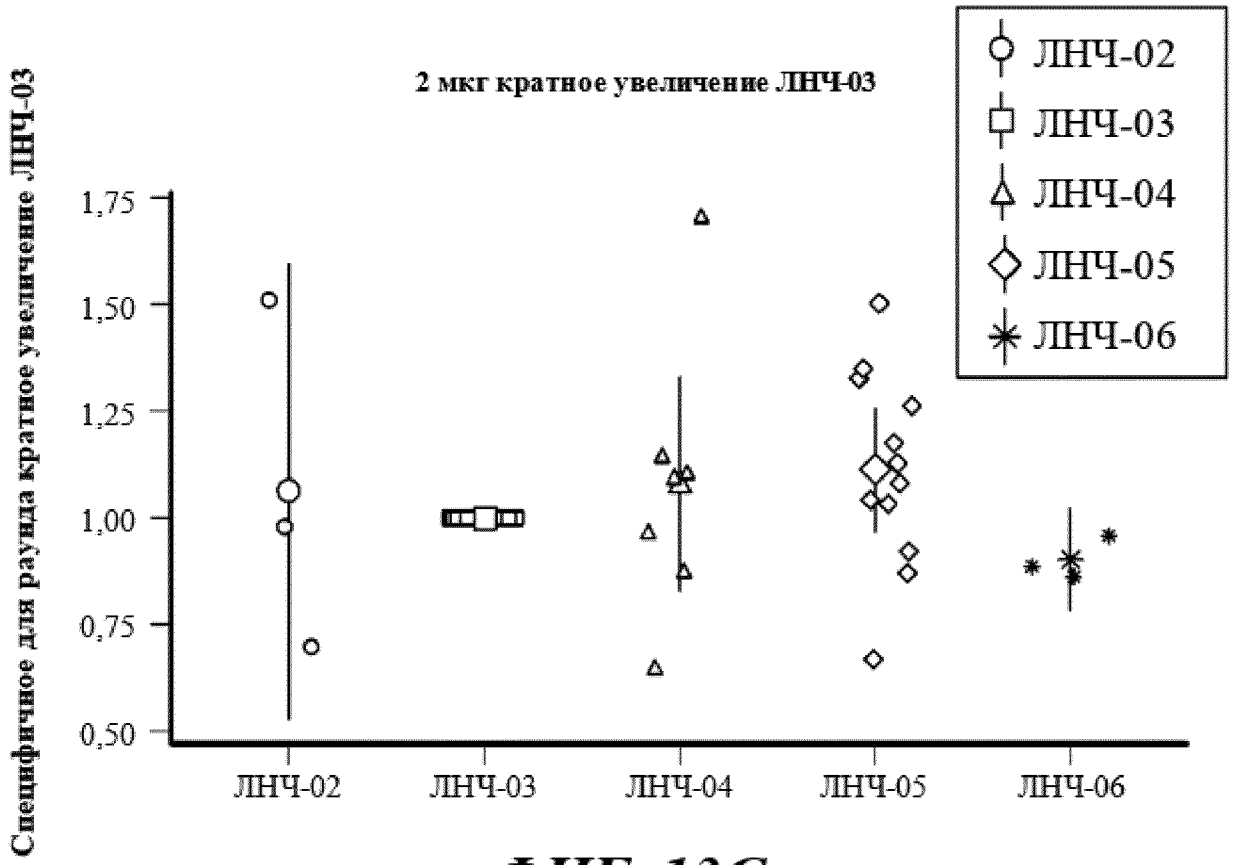
ФИГ. 13D



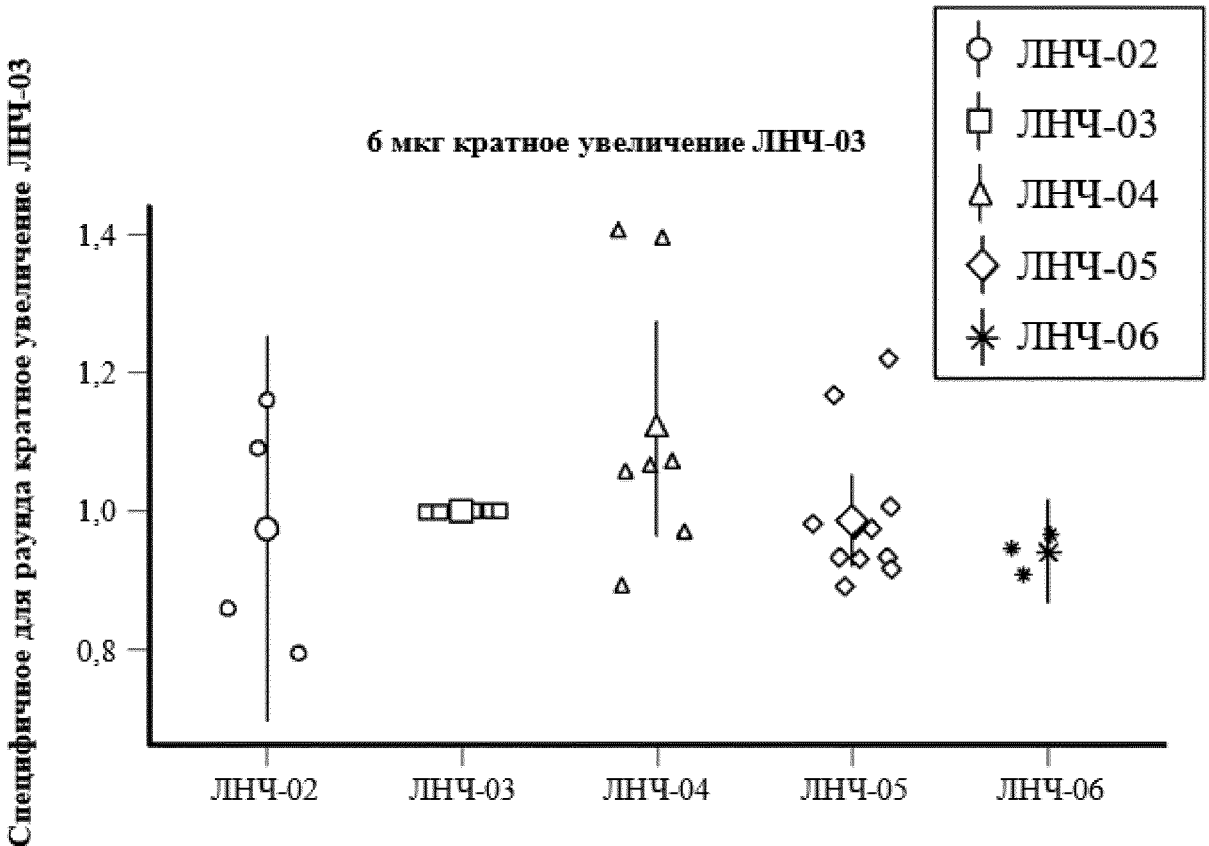
ФИГ. 13E



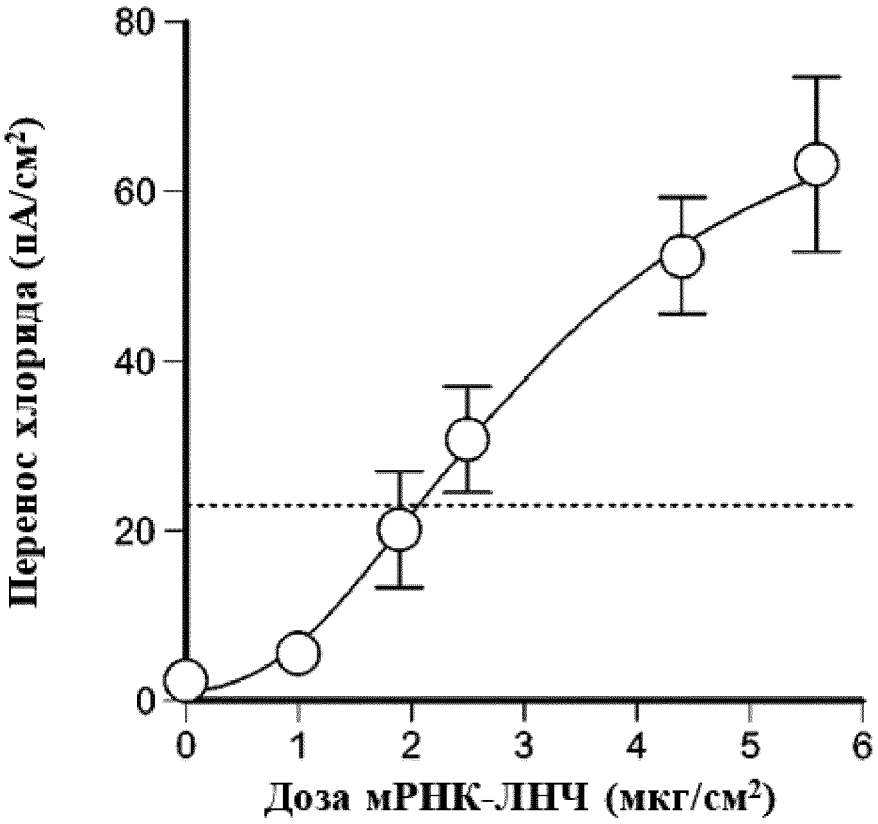
ФИГ. 13F



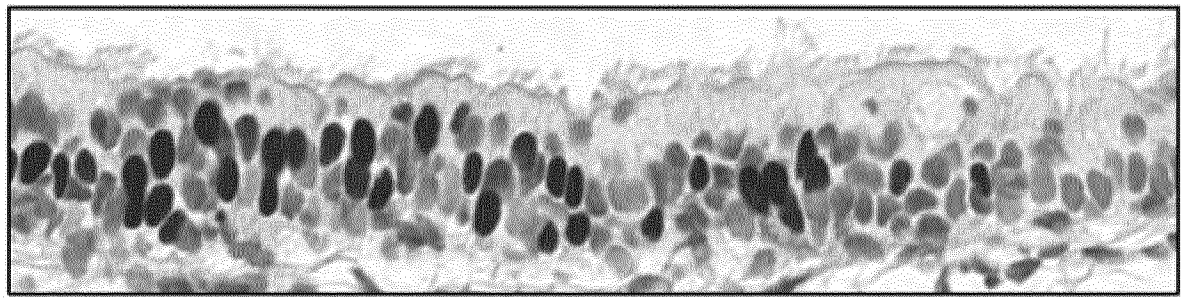
ФИГ. 13G



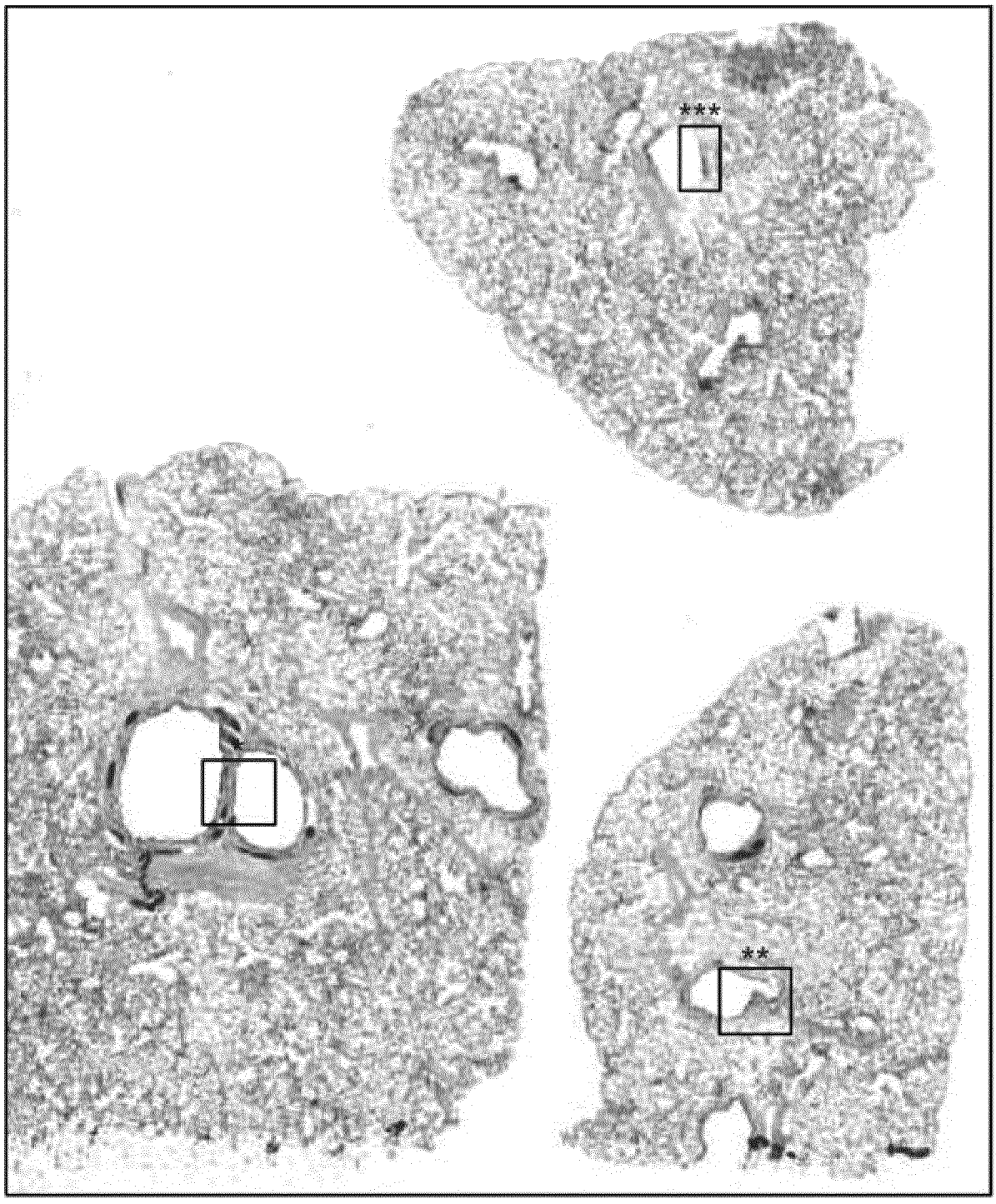
ФИГ. 13H


Перенос хлорида (пА/см²)
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
6
Доза мРНК-ЛНЧ (мкг/см²)

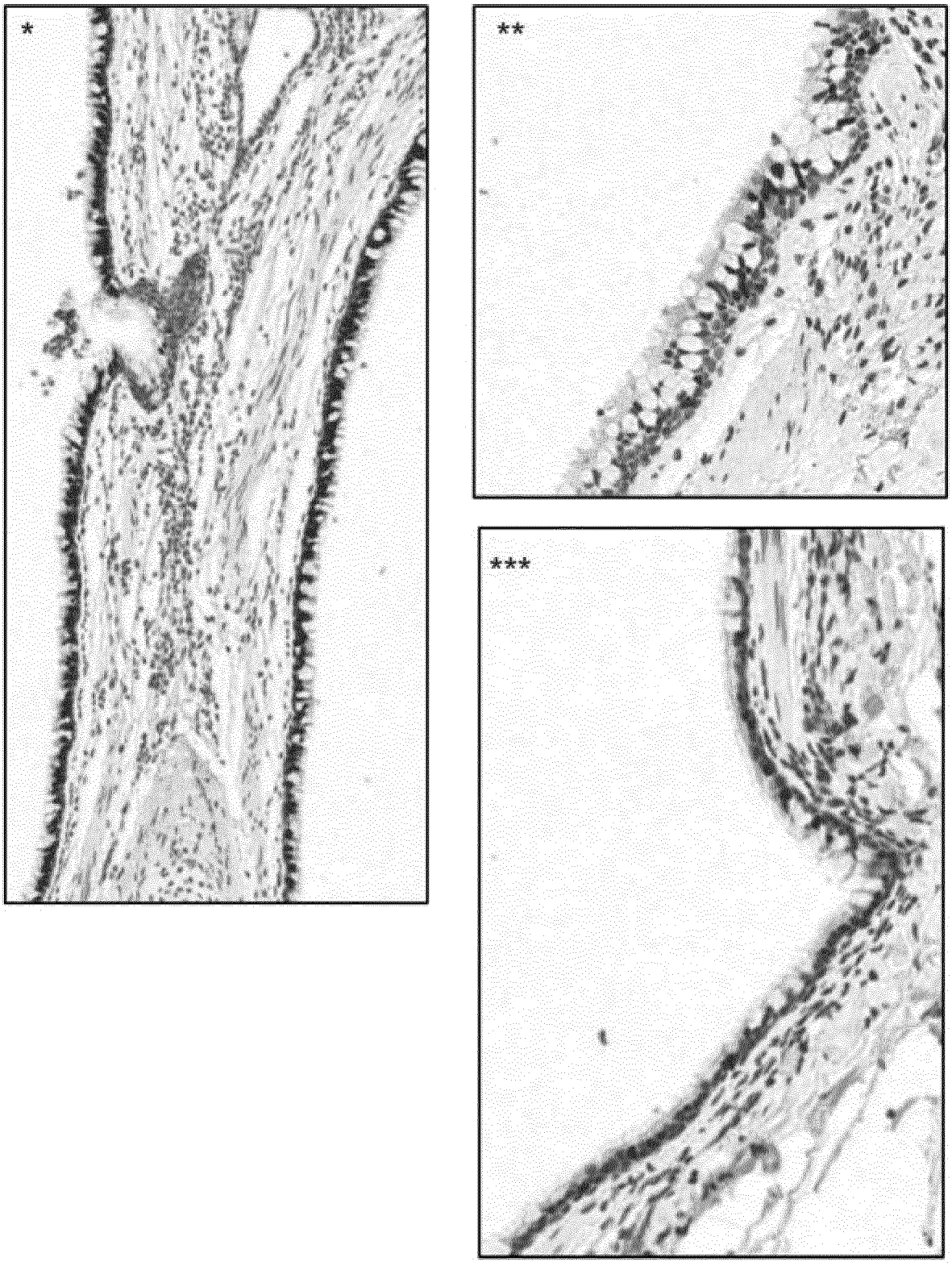
ФИГ. 14



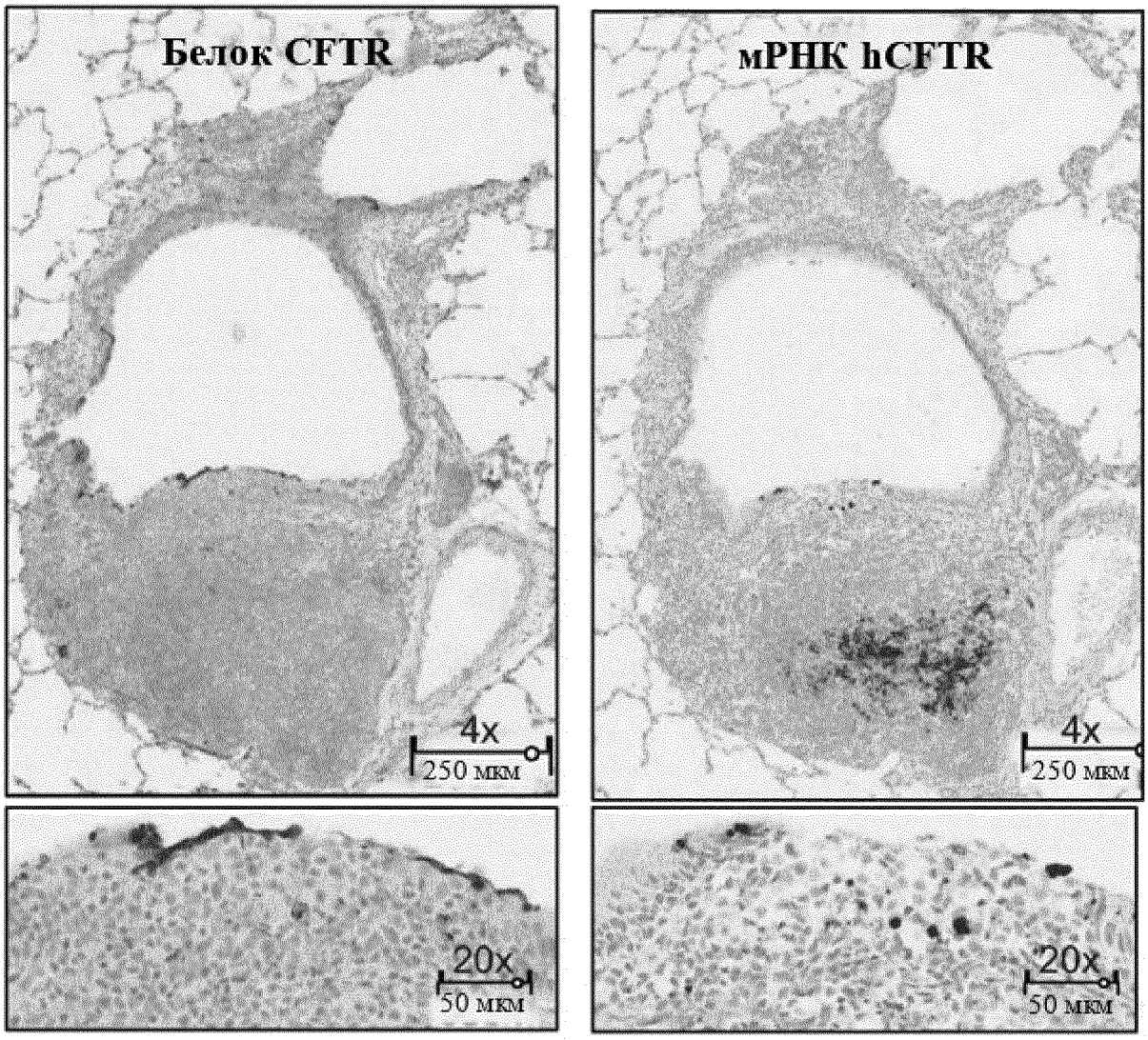
ФИГ. 15



ФИГ. 16А



ФИГ. 16В


Белок CFTR
мРНК hCFTR
4x
250 мкм
4x
250 мкм
20x
50 мкм
20x
50 мкм

ФИГ. 17