

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391351 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.08.25

(22) Дата подачи заявки
2021.11.04

(51) Int. Cl. *A61K 38/17* (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)
A61P 31/22 (2006.01)
C07K 14/57 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ мРНК-IFN-λ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

(31) 20205674.3

(32) 2020.11.04

(33) EP

(86) PCT/EP2021/080658

(87) WO 2022/096582 2022.05.12

(71) Заявитель:
ЭТРИС ГМБХ (DE)

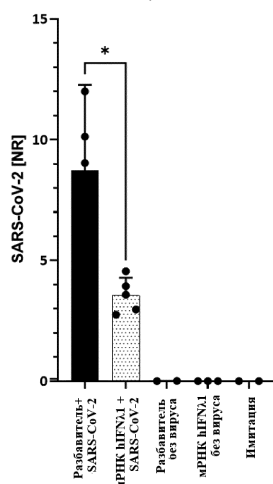
(72) Изобретатель:

Рудольф Карстен, Планк Кристиан
(DE), Лангениккель Томас (CH), Махт
Анна, Ломер Кристиан (DE)

(74) Представитель:

Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) В изобретении описывают фармацевтические композиции, содержащие мРНК, кодирующую полипептид IFN-λ, для применения в лечении вызванного вирусом заболевания, предпочтительно вызванного вирусом респираторного заболевания, такого как COVID-19.



A1

202391351

202391351

A1

ПРИМЕНЕНИЕ мРНК IFN-ЛЯМБДА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

5 Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим мРНК, которая кодирует полипептид IFN- λ , для применения в лечении вирусного заболевания, предпочтительно вызванного вирусом респираторного заболевания, такого как грипп или COVID-19.

Интерфероны (Interferon – IFN) представляют собой группу белков, 10 которые в настоящее время подразделяются на три разных семейства: интерфероны I типа, интерфероны II типа и интерфероны III типа.

Интерфероны I типа представляют собой семейство близкородственных гликопротеинов, состоящее из тринадцати подтипов IFN- α , а также IFN- β , IFN- κ , IFN- ϵ и IFN- ω . У человека семейство генов IFN α состоит из 12 различных 15 подтипов, кодируемых 14 генами, включая один псевдоген и два гена, кодирующих идентичные белки (Díaz с соавт., *Genomics* 22, 1994, 540–552), т.е. IFN- α 1, IFN- α 2, IFN- α 8, IFN- α 14, IFN- α 17, IFN- α 4, IFN- α 5, IFN- α 6, IFN- α 7, IFN- α 10, IFN- α 16, IFN- α 21 (da Rocha Matos с соавт., *Emerg Microbes Infect.* 8, 2019, 1763-1776). Установлено, что подтипы IFN- α проявляют спектр 20 противовирусных, антипролиферативных и иммуномодулирующих ответов. Интерфероны I типа играют важную роль во врожденном иммунном ответе на респираторную вирусную инфекцию. Механизм включает начальное высвобождение интерферона- β , который, в свою очередь, стимулирует дальнейшее высвобождение интерферона- β и интерферонов α в каскаде, 25 опосредованном через рецептор интерферона I типа.

Один из интерферонов II типа, а именно IFN-гамма, связывается с рецептором, отличным от рецептора интерферона I типа, и обладает функциями, существенно отличающимися от функций интерферонов I типа.

Интерфероны III типа представляют собой недавно открытое семейство 30 интерферонов. Их также называют интерферонами лямбда (IFN λ). IFN λ представляют собой три близкородственных белка, которые были открыты в 2003 году. Интерферон λ -1 также известен как IL-29, а интерферон λ -2 и λ -3 также известны как IL-28A и IL-28B, соответственно. Эти интерфероны

связываются с третьим рецептором, отличным от рецепторов интерферонов I и II типов. Было показано, что эти интерфероны обладают противовирусной активностью. Обнаружено, что интерферон λ играет важную роль при широком спектре вирусных инфекций, включая вирус гепатита C (HCV), вирус гепатита B (HBV), вирус гриппа, риновирус, респираторно-синцитиальный вирус (RSV – respiratory syncytial virus), вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV – lymphocytic choriomeningitis virus), ротавирус, реовирус, норовирус и вирус Западного Нила (WNV). Экспериментальные подходы *in vivo* с использованием мышей с нокаутом рецептора IFN λ подчеркнули важность передачи сигналов IFN λ в контроле уровней вируса гриппа A (IAV), коронавируса SARS, RSV и метапневмовируса человека в легких, а также норовируса, реовируса и ротавируса в желудочно-кишечном тракте. Исследования *in vivo* показывают, что IFN λ демонстрирует, по сравнению с IFN α/β , пониженный ответ ISG, хотя *in vivo* он проявляет гораздо менее выраженное воспаление, чем IFN α/β .

Интересно, что IFN λ сохраняет многие противовирусные свойства, несмотря на менее выраженную воспалительную реакцию по сравнению с IFN I типа. Это стимулировало разработку IFN λ для клинического применения в качестве альтернативы IFN α для лечения инфекции вируса гепатита C (Muir с соавт., *J. Hepatol.* 61, 2014, 1238-1246). Более поздние разработки также указывают на то, что применение IFN λ можно также использовать для лечения инфекций, вызванных респираторными вирусными инфекциями. Было показано, что IFN λ 2 и 3 контролируют легочные титры IAV аналогично применяемым для лечения IFN α или IFN β (Davidson с соавт., *EMBO Mol. Med.* 8, 2016, 1099-1112; Kim с соавт., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 56, 2017, 202-212). Важно отметить, что лечение IFN λ позволяет избежать чрезмерного воспаления легких, связанного с лечением IFN α (Kim с соавт., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 56, 2017, 202-212).

Терапевтические применения IFN λ пока сосредоточено на введении рекомбинантно полученного белка. Однако применение рекомбинантно полученного белка требует повторного введения относительно высоких доз белка, поскольку белок относительно быстро выводится из организма и, таким образом, может действовать только в течение короткого периода времени. Например, в работе Dinno III с соавт. (Nature <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2708-8> (2020)) 2 мкг пэгелированного INF λ 1 (peg-IFN λ 1) вводят мышам

подкожно. Сходным образом, Davidson с соавт. описывают (*EMBO Mol. Med.* 8, 2016, 1099-1112) введение 2,6 мкг/50 мкл IFN λ 3 мышам линии B6.A2G-Mx для лечения или предупреждения заболевания гриппом. В публикации Galani с соавт. (*Immunity* 46, 2017, 875-890) сообщают, что мышам лечили 5 или 10 мкг рекомбинантного мышинного пэгелированного IFN λ 2.

Следовательно, существует потребность в средствах и способах для эффективного способа доставки IFN λ *in vivo* в ткани-мишени, т.е. таким образом, который гарантирует, что он активен в течение длительного периода времени и может оказывать свое действие в течение длительного периода времени. Это позволило бы уменьшить количество IFN λ , вводимого пациенту в течение заданного периода времени, а также позволило бы уменьшить количество введений пациенту.

Настоящее изобретение нацелено на эту потребность, предоставляя варианты осуществления настоящего изобретения, указанные в формуле изобретения.

Таким образом, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей мРНК, кодирующую полипептид IFN- λ , для применения в лечении и/или предупреждении вызываемого вирусом заболевания.

Настоящее изобретение основано на обнаружении того обстоятельства, что мРНК, кодирующая IFN λ , обеспечивает чрезвычайно эффективное и продолжительное активирующее действие на нижерасположенные мишени, важные для противовирусной активности IFN- λ , при трансфекции в клетки, которые служат моделью альвеолярных эпителиальных клеток. В частности, в модели *in vitro* с использованием клеток A-549 (модель пневмоцитов II типа/альвеолярных эпителиальных клеток) даже при чрезвычайно низких дозах мРНК нижестоящие мишени IFIT3, ISG15, IFIT1 и OAS3 (которые являются показателями противовирусной активности IFN λ) активируются до высоких уровней и в течение длительного периода времени (более 120 часов). Эти результаты могут быть подтверждены в экспериментах на мышах *in vivo*.

Кроме того, неожиданно было обнаружено, что в клетках A-549, которые ранее были стабильно трансфицированы для экспрессии рецептора ACE2, индукция нижестоящих мишеней столь же высока, как и в случае клеток A-549,

которые не экспрессируют рецептор ACE2, когда применяют мРНК, кодирующую полипептид IFN-λ, в то время как в случае введения рекомбинантного белка IFNλ индукция нижестоящих мишеней намного ниже в клетках A-549, экспрессирующих ACE2, по сравнению с клетками A-549, которые не экспрессируют рецептор ACE2. Это указывает на то, что введение рекомбинантного полипептида IFNλ не приводит к эффективной активации нижестоящих мишеней в клетках, которые экспрессируют рецептор ACE2, в то время как введение мРНК, кодирующей IFNλ, обеспечивает эффективную активацию. Соответственно, применение мРНК, кодирующей IFNλ, особенно выгодно в случаях, когда вирусные инфекции нацелены на клетки, экспрессирующие ACE2, то есть когда вирус проникает в клетки через рецептор ACE2.

Более того, неожиданно было показано, что в культурах различных типов клеток на границе воздух-жидкость (ALI – Air-Liquid Interface) мРНК, кодирующая IFNλ, способна проявлять эффект в отношении активации нижестоящих мишеней при нанесении на апикальную сторону клеток (обращенную к воздуху), хотя ожидалось, что соответствующий рецептор будет расположен на базолатеральной стороне клеток (обращенной к жидкой культуральной среде). Эти результаты могут быть подтверждены *in vivo* на мышах в экспериментах, в которых мРНК, кодирующая IFNλ, непосредственно нанесена на легкие. Известно, что эпителий дыхательных путей образует механические барьеры, отделяющие внешнюю среду от внутренней среды, и что структурная полярность эпителия имеет решающее значение для целостности барьера и контролируется сложными межклеточными адгезивными комплексами, которые содержат адгеренты и обеспечивают плотные контакты (см., например, Humlicsek с соавт., *J. Immunol.* 178, 2007, 6395-6403). Кроме того, известно, что существует полярность в отношении функциональности некоторых цитокинов в том смысле, что только их базолатеральное расположение по отношению к эпителию дыхательных путей приводит к эффекту, поскольку соответствующие рецепторы, очевидно, присутствуют только на базолатеральной стороне клеток. Соответственно, эпителиальные реакции дыхательных путей на определенные цитокины можно было наблюдать только после их аппликации в просвет дыхательных путей, если ранее барьерная

функция эпителия была нарушена физически или фармакологически (Humlicek с соавт., ссылка приведена выше). Таким образом, удивительно, что введение мРНК IFN λ на апикальную сторону эпителиальных клеток, культивируемых в культурах ALI, или нанесение непосредственно на легкие мышей без нарушения барьерной функции эпителия приводит к эффективной активации нижерасположенных мишеней IFN λ (что свидетельствует о противовирусном эффекте).

В принципе, в контексте настоящего изобретения мРНК, кодирующая полипептид IFN λ , может быть использована для лечения и/или профилактики любого возможного заболевания, вызванного вирусами. Было показано, что IFN λ проявляет противовирусную активность в отношении многих вирусов *in vitro*. *In vivo* противовирусная активность IFN λ , в частности, наблюдалась в отношении вирусов, поражающих эпителиальные клетки респираторного, желудочно-кишечного и урогенитального трактов, а также печени (см., например, Lazear с соавт., *Immunity* 43, 2015, 15-28; табл. 1). Вызванные вирусами заболевания, которые можно лечить или предотвращать согласно настоящему изобретению, включают заболевания, вызываемые вирусом, принадлежащим к семействам Pneumoviridae, Orthomyxoviridae, Adenoviridae, Arenaviridae, Paramyxoviridae, Flaviviridae, Retroviridae, Caliciviridae, Picornaviridae, Coronaviridae, Parvoviridae, Reoviridae, Herpesviridae или Hepadnaviridae.

Вирусы, принадлежащие к семейству Pneumoviridae, включают метапневмовирус человека.

Вирусы, принадлежащие к семейству Orthomyxoviridae, включают вирус гриппа.

Вирусы, принадлежащие к семейству Adenoviridae, включают аденовирусы.

Вирусы, принадлежащие к семейству Arenaviridae, включают вирус лимфоцитарного хориоменингита.

Вирусы, принадлежащие к семейству Paramyxoviridae включают респираторно-синцитиальный вирус (RSV – Respiratory syncytial virus).

Вирусы, принадлежащие к семейству Flaviviridae, включают вирус денге, вирус гепатита С, вирус Зика и вирус Западного Нила.

Вирусы, принадлежащие к семейству Retroviridae, включают вирус иммунодефицита человека.

Вирусы, принадлежащие к семейству *Caliciviridae*, включают норовирусы.
Вирусы, принадлежащие к семейству *Picornaviridae*, включают риновирус.
Вирусы, принадлежащие к семейству *Coronaviridae*, включают SARS-CoV, SARS-CoV2, MERS, а также HCoV-NL63, -OC43, -229E и HKU1.

5 Вирусы, принадлежащие к семейству *Parvoviridae*, включают бокавирусы.
Вирусы, принадлежащие к семейству *Reoviridae*, включают реовирусы и ротавирусы.

Вирусы, принадлежащие к семейству *Herpesviridae*, включают цитомегаловирусы и вирус простого герпеса (*Herpes simplex virus*), например,
10 *Herpes simplex* вирус 1 и 2.

Вирусы, принадлежащие к семейству *Hepadnaviridae*, включают вирус гепатита В.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения вызванное вирусом заболевание представляет собой вызванное вирусом
15 респираторное заболевание. В этом контексте предпочтительно, чтобы вирус, вызывающий респираторное заболевание, был выбран из группы, состоящей из риновируса, вируса гриппа, вируса парагриппа, метапневмовируса, респираторно-синцитиального вируса, аденовируса и коронавируса.

В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения вирус представляет собой вирус, который проникает в клетки через
20 рецептор ACE2. ACE2 (ангиотензинконвертирующий фермент 2) представляет собой фермент, прикрепленный к клеточным мембранам клеток легких, артерий, сердца, почек и кишечника. Он снижает кровяное давление, катализируя гидролиз ангиотензина II в ангиотензин. ACE2 также служит точкой входа в
25 клетки для некоторых коронавирусов, включая SARS-CoV, SARS-CoV-2 и HCoV-NL63.

Таким образом, в особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения вирус представляет собой коронавирус и наиболее предпочтительно вирус, выбранный из группы, состоящей из SARS-CoV, SARS-
30 CoV-2 и HCoV-NL63.

Соответственно, в особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения вирусное заболевание представляет собой тяжелый острый респираторный синдром SARS (вызванный SARS-CoV), COVID-19

(вызванный SARS-CoV-2) и инфекции верхних дыхательных путей легкой и средней степени тяжести, тяжелую инфекцию нижних дыхательных путей, круп и бронхолит (вызванный HCoV-NL63).

Белок IFN λ , кодируемый мРНК, содержащейся в фармацевтической композиции, может представлять собой любой возможный белок IFN λ , в частности интерферон λ -1 (также известный как IL-29), интерферон λ -2 (также известный как IL-28A) или интерферон λ -3 (IL-28B) или любую их комбинацию. В варианте осуществления настоящего изобретения белок IFN λ представляет собой белок человека.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения белок IFN λ , кодируемый мРНК, содержащейся в фармацевтической композиции, представляет собой IFN λ -1, предпочтительно IFN λ -1, содержащий аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:2. В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения мРНК, кодирующая IFN λ -1, содержит кодирующую область, как показано в SEQ ID NO:1.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения белок IFN λ , кодируемый мРНК, содержащейся в фармацевтической композиции, представляет собой IFN λ -2, предпочтительно IFN λ -2, содержащий аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:4. В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения мРНК, кодирующая IFN λ -2, содержит кодирующую область, как показано в SEQ ID NO:3.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения белок IFN λ , кодируемый мРНК, содержащейся в фармацевтической композиции, представляет собой IFN λ -3, предпочтительно IFN λ -3, содержащий аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:6. В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения мРНК, кодирующая IFN λ -3, содержит кодирующую область, как показано в SEQ ID NO:5.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полирибонуклеотид, используемый согласно настоящему изобретению, может содержать немодифицированные и модифицированные нуклеотиды.

Используемый в настоящем изобретении термин «немодифицированный нуклеотид» относится к нуклеотидам А, С, G и U. Используемый в настоящем изобретении термин «модифицированный нуклеотид» относится к любым встречающимся в природе или неприродным изомерам нуклеотидов А, С, G и U, а также к любым встречающимся в природе аналогам, альтернативным или модифицированным нуклеотидам или их изомерам, имеющим, например, химические модификации или замещенные остатки. Модифицированные нуклеотиды могут иметь модификацию основания и/или модификацию сахара. Модифицированные нуклеотиды также могут иметь модификации фосфатной группы, например, по отношению к 5'-кэпу молекулы мРНК. Модифицированные нуклеотиды также включают нуклеотиды, которые синтезируются посттранскрипционно путем ковалентной модификации нуклеотидов. Кроме того, возможна любая подходящая смесь немодифицированных и модифицированных нуклеотидов. В литературе можно найти неограниченное количество примеров модифицированных нуклеотидов (например, Cantara с соавт., *Nucleic Acids Res*, 2011, 39 (Issue suppl_1):D195-D201; Helm и Alfonzo, *Chem Biol*, 2014, 21(2):174-185; Carell с соавт., *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51(29):7110-7131) и некоторые предпочтительные модифицированные нуклеотиды указаны в качестве примеров, приводимых ниже, на основе их соответствующего нуклеозидного остатка:

1-метиладенозин, 2-метилтио-N6-гидроксинорвалилкарбамоиладенозин, 2-метиладенозин, 2'-О-рибозилфосфатаденозин, N6-метил-N6-треонилкарбамоиладенозин, N6-ацетиладенозин, N6-глицинилкарбамоиладенозин, N6-изопентениладенозин, N6-метиладенозин, N6-треонилкарбамоиладенозин, N6,N6-диметиладенозин, N6-(цис-гидроксиизопентенил)аденозин, N6-гидроксинорвалилкарбамоиладенозин, 1,2'-О-диметиладенозин, N6,2'-О-диметиладенозин, 2'-О-метиладенозин, N6,N6,2'-О-триметиладенозин, 2-метилтио-N6-(цис-гидроксиизопентенил)аденозин, 2-метилтио-N6-метиладенозин, 2-метилтио-N6-изопентениладенозин, 2-метилтио-N6-треонилкарбамоиладенозин, N6-2-метилтио-N6-треонилкарбамоиладенозин, 2-метилтио-N6-(цис-гидроксиизопентенил)аденозин, 7-метиладенозин, 2-метилтиоаденозин, 2-метоксиаденозин, 2'-амино-2'-дезоксияденозин, 2'-азидо-2'-дезоксияденозин, 2'-фтор-2'-дезоксияденозин, 2-аминопурин, 2,6-диаминопурин,

7-деаза-аденозин, 7-деаза-8-аза-аденозин, 7-деаза-2-аминопурин, 7-деаза-8-аза-2-аминопурин, 7-деаза-2,6- диаминопурин, 7-деаза-8-аза-2,6-диаминопурин; 2-тиоцитидин, 3-метилцитидин, N4-ацетилцитидин, 5-формилцитидин, N4-метилцитидин, 5-метилцитидин, 5-гидроксиметилцитидин, 5-гидроксицитидин, 5-лизидин, N4-ацетил-2'-О-метилцитидин, 5-формил-2'-О-метилцитидин, 5,2'-О-диметилцитидин, 2-О-метилцитидин, N4,2'-О-диметилцитидин, N4,N4,2'-О-триметилцитидин, изоцитидин, псевдоцитидин, псевдоизоцитидин, 2-тиоцитидин, 2'-метил-2'-дезоксидитидин, 2'-амино-2'-дезоксидитидин, 2'-фтор-2'-дезоксидитидин, 5-йодидитидин, 5-бромидитидин, 2'-азидо-2'-дезоксидитидин, 2'-амино-2'-дезоксидитидин, 2'-фтор-2'-дезоксидитидин, 5- азаидитидин, 3-метилцитидин, 1-метилпсевдоизоцитидин, пирролоцитидин, пирролопсевдоизоцитидин, 2-тио-5-метил-цитидин, 4-тио-псевдоизоцитидин, 4-тио-1-метил-псевдоизоцитидин, 4-тио-1-метил-1-деаза-псевдоизоцитидин, 1-метил-1-деаза-псевдоизоцитидин, 2-метоксидитидин, 2-метокси-5-метилцитидин, 4-метокси-псевдоизоцитидин, 4-метокси-1-метил-псевдоизоцитидин, зебуларин, 5-аза-зебуларин, 5-метил-зебуларин, 5-аза-2-тио-зебуларин, 2-тио-зебуларин; 1-метилгуанозин, N2,7-диметилгуанозин, N2-метилгуанозин, 2'-О-рибозилфосфатгуанозин, 7-метилгуанозин, гидроксивибутозин, 7-аминометил-7-деазагуанозин, 7-циано-7-деазагуанозин, N2,N2-диметилгуанозин, N2,7,2'-О-триметилгуанозин, N2,2'-О-диметилгуанозин, 1,2'-О-диметилгуанозин , 2'-О-метилгуанозин, N2,N2,2'-О-триметилгуанозин, N2,N2J-триметилгуанозин, изогуанозин, 4-деметилвиозин, эпоксикевозин, немодифицированный гидроксивибутозин, метилированный немодифицированный гидроксивибутозин, изовиозин, пероксивибутозин, галактозил-кевозин, маннозил-кевозин, кевозин, археозин, вибутозин, метилвиозин, виозин, 7-аминокарбоксипропилдеметилвиозин, 7-аминокарбоксипропилвиозин, метиловый эфир 7-аминокарбоксипропилвиозина, 7-деаза-гуанозин, 7-деаза-8-аза-гуанозин, 6-тио-гуанозин, 6-тио-7-деаза-гуанозин, 6-тио-7- деаза-8-аза-гуанозин, 7-метилгуанозин, 6-тио-7-метилгуанозин, 7-метилюозин, 6-метоксигуанозин, 1-метилгуанозин, 8-оксогуанозин, 7-метил-8-оксогуанозин, 1-метил-6-тиогуанозин, N2-метил-6-тиогуанозин, N2,N2-диметил-6-тиогуанозин, N1-метилгуанозин, 2'-амино-3'-дезоксигуанозин, 2'-азидо-2'-дезоксигуанозин, 2'-фтор-2'-дезоксигуанозин, 2-тиуридин, 3-(3-амино-3-карбоксипропил)уридин, 3-

метилуридин, 4-тиуридин, 5-метил-2-тиуридин, 5-метиламинометилуридин, 5-карбоксиметилуридин, 5-карбоксиметиламинометилуридин, 5-гидроксиуридин, эфир 5-(карбоксигидроксиметил)уридина, дигидроуридин, 5-метилдигидроуридин, 5-метиламинометил-2-тиуридин, 5-
5 (карбоксигидроксиметил)уридин, метиловый эфир 5-(карбоксигидроксиметил)-2'-О-метилуридина, 5-(изопентениламинометил)уридин, 5-(изопентениламинометил)-2-тиуридин, 3,2'-О-диметилуридин, 5-карбоксиметиламинометил-2'-О-метилуридин, 5-карбамоилгидроксиметилуридин, 5-карбамоилметил-2'-О-метилуридин, 5-
10 карбамоилметил-2-тиуридин, 5-метоксикарбонилметил-2'-О-метилуридин, 5-(изопентениламинометил)-2'-О-метилуридин, 5,2'-О-диметилуридин, 2'-О-метилуридин, 2'-О-метил-2-тиоуридин, 2-тио-2'-О-метилуридин, уридин-5-оксиуксусная кислота, 5-метоксикарбонилметилуридин, метиловый эфир уридин-5-оксиуксусной кислоты, 5-метоксиуридин, 5-аминометил-2-тиуридин, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиуридин, 5-метиламинометил-2-селенуридин, 5-метоксикарбонилметил-2-тиуридин, 5-тауринометил-2-тиуридин, псевдоуридин, 1-метил-3-(3-амино-3-карбоксипропил)псевдоуридин, 1-метилпсевдоуридин, 3-метилпсевдоуридин, 2'-О-метилпсевдоуридин, 5-формилуридин, 5-аминометил-2-геранилуридин, 5-тауринометилуридин, 5-йодоуридин, 5-бромурин, 2'-
20 метил-2'-дезоксиуридин, 2'-амино-2'-дезоксиуридин, 2'-азидо-2'-дезоксиуридин, 2'-фтор-2'-дезоксиуридин, инозин, 1-метилянозин, 1,2'-О-диметилянозин, 2'-О-метилянозин, 5-азауридин, 2-тио-5-азауридин, 4-тио-псевдоуридин, 2-тио-псевдоуридин, 5-карбоксиметилуридин, 1-карбоксиметилпсевдоуридин, 5-пропинилуридин, 1-пропинилпсевдоуридин, 1-тауринометилпсевдоуридин, 5-тауринометил-2-тиоуридин, 1-тауринометил-4-тиоуридин, 5-метилуридин, 1-метил-псевдоуридин, 4-тио-1-метил-псевдоуридин, 2-тио-1-метил-псевдоуридин, 1-метил-1-деаза-псевдоуридин, 2-тио-1-метил-1-деаза-псевдоуридин, дигидропсевдоуридин, 2-тио-дигидроуридин, 2-тио-дигидропсевдоуридин, 2-метоксиуридин, 2-метокси-4-тиоуридин, 4-метокси-псевдоуридин, 4-метокси-2-
25 тио-псевдоуридин, 1,2'-О-диметиладенозин, 1,2'-О-диметилгуанозин, 1,2'-О-диметилянозин, 2,8-диметиладенозин, 2-метилтиометилентио-N⁶-изопентениладенозин, 2-геранилтиуридин, 2-лизидин, 2-метилтиоциклический N⁶-треонилкарбамоиладенозин, 2-метилтио-N⁶-(цис-

гидроксиизопентенил)аденозин, 2-метилтио-N6 -
гидроксинорвалилкарбамоиладенозин, 2-метилтио-N6-
треонилкарбамоиладенозин, 2-селенуридин, 2-тио-2'-О-метилуридин, 2'-О-
метиладенозин, 2'-О-метилцитидин, 2'-О-метилгуанозин, 2'-О-метиинозин, 2'-О-
метилпсевдоуридин, 2'-О-метилуридин, 2'-О-метилуридин, метиловый эфир 5-
5 оксиксусной кислоты, 2'-О-рибозиладенозинфосфат, 2' -О-
рибозилгуанозинфосфат, 3,2'-О-диметилуридин, 3-(3-амино-3-карбоксипропил)-
5,6-дигидроуридин, 3-(3-амино-3-карбоксипропил)псевдоуридин, 5,2'- О-
диметилцитидин, 5,2'-О-диметилуридин, метиловый эфир 5-
10 (карбоксигидроксиметил)-2'-О-метилуридина, 55-(изопентениламинметил)-2'-
О-метилуридин, 5-аминометил-2-геранилтиуридин, 5-аминометил-2-
селенуридин, 5-аминометилуридин, 5-карбамоилметил-2'-О-метилуридин, 5-
карбоксигидроксиметилуридин, 5- карбоксиметил-2-тиуридин, 5-
карбоксиметиламинметил-2-геранилтиуридин, 5-карбоксиметиламинметил-2-
15 селенуридин, 5-карбоксиметиламинметил-2'-О-метилуридин, 5-
цианометилуридин, 5-формил-2'-О-метилцитидин, 5-метоксикарбонилметил-2'-
О-метилуридин, 5-метиламинметил-2-геранилтиуридин, 7-
аминокарбоксипропил-деметилвиозин, 7-метилгуанозин, 8-метиладенозин, N2,
2'-О-диметилгуанозин, N2,7,2'-О-триметилгуанозин, N2,7-диметилгуанозин,
20 N2,N2,2'-О-триметилгуанозин, N2,N2,7-триметилгуанозин, N2,N2,7-
триметилгуанозин, N4,2'-О-диметилцитидин, N4,N4,2'-О-триметилцитидин,
N4,N4-диметилцитидин, N4-ацетил-2'-О-метилцитидин, N6,2'-О-
диметиладенозин, N6,N6,2'-О-триметиладенозин, N6-формиладенозин, N6-
гидроксиметиладенозин, агматидин, 2-метилтиоциклический N6-
25 треонилкарбамоиладенозин, глутамилкевозин, гуанозин, добавленный к любому
нуклеотиду , гуанилированный 5'-конец, гидрокси-N6-
треонилкарбамоиладенозин; наиболее предпочтительно псевдоуридин, N1-
метилпсевдоуридин, 2'-фтор-2'-дезоксидитидин, 5-йодидитидин, 5-метилцитидин,
2-тиуридин, 5-йодоуридин и/или 5-метилуридин.

30 Кроме того, термин «модифицированный нуклеотид» включает
нуклеотиды, содержащие изотопы, такие как дейтерий. Термин «изотоп»
относится к элементу, имеющему одинаковое количество протонов, но разное
количество нейтронов, что приводит к разным значениям массы. Таким образом,

изотопы водорода, например, не ограничиваются дейтерием, но включают также тритий. Кроме того, полирибонуклеотид может также содержать изотопы других элементов, включая, например, углерод, кислород, азот и фосфор. Также возможно, что модифицированные нуклеотиды дейтерированы или содержат другой изотоп водорода или кислорода, углерода, азота или фосфора.

Общее количество типов модифицированных нуклеотидов в полирибонуклеотиде может составлять 0, 1, 2, 3 или 4. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один нуклеотид одного типа нуклеотидов, например, по меньшей мере один нуклеотид U, может представлять собой модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один нуклеотид всего из двух типов нуклеотидов, например, по меньшей мере один нуклеотид U и по меньшей мере один нуклеотид C, могут представлять модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один нуклеотид из трех типов нуклеотидов, например по меньшей мере один нуклеотид G, по меньшей мере один нуклеотид U и по меньшей мере один нуклеотид C могут быть модифицированными нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один нуклеотид из всех четырех типов нуклеотидов может представлять собой модифицированный нуклеотид. Во всех этих вариантах осуществления настоящего изобретения можно модифицировать один или несколько нуклеотидов каждого нуклеотидного типа, при этом процентное содержание указанных модифицированных нуклеотидов каждого нуклеотидного типа составляет 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 100%.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения общий процент модифицированных нуклеотидов, содержащихся в очищаемых молекулах мРНК, составляет 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 100%.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения мРНК представляет собой мРНК, которая содержит комбинацию модифицированных и немодифицированных нуклеотидов. Предпочтительно это мРНК, содержащая комбинацию модифицированных и немодифицированных

нуклеотидов, как описано в WO 2011/012316. Сообщают, что описанная в настоящем изобретении мРНК демонстрирует повышенную стабильность и пониженную иммуногенность. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения в такой модифицированной мРНК модифицируют от 5 до 50% цитидиновых нуклеотидов и от 5 до 50% уридиновых нуклеотидов. Нуклеотиды, содержащие аденозин и гуанозин, могут быть немодифицированными. Аденозиновые и гуанозиновые нуклеотиды могут быть немодифицированными или частично модифицированными, и они предпочтительно содержатся в немодифицированной форме. Предпочтительно модифицированы от 10 до 35% цитидиновых и уридиновых нуклеотидов, и особенно предпочтительно содержание модифицированных цитидиновых нуклеотидов находится в диапазоне от 7,5 до 25%, а содержание модифицированных уридиновых нуклеотидов находится в диапазоне от 7,5 до 25%. Было обнаружено, что на самом деле относительно низкое содержание, т.е. только 10% модифицированных цитидиновых и уридиновых нуклеотидов, могут достичь желаемых свойств. Особенно предпочтительно, чтобы модифицированные цитидиновые нуклеотиды представляли собой остатки 5-метилцитидина, а модифицированные уридиновые нуклеотиды представляли собой 2-тиоуридиновые остатки. Наиболее предпочтительно содержание модифицированных цитидиновых нуклеотидов и содержание модифицированных уридиновых нуклеотидов составляет 25%, соответственно.

В некоторых любых вариантах осуществления настоящего изобретения из числа вышеизложенных процентное содержание аналогов данного нуклеотида относится к вводимому процентному содержанию (например, процентное содержание аналогов в исходной реакции, такой как исходная реакция транскрипции *in vitro*). В некоторых любых вариантах осуществления настоящего изобретения из числа вышеизложенного процентное содержание аналогов данного нуклеотида относится к выходу (например, процентное содержание в синтезированном или транскрибированном соединении). Оба варианта рассматриваются одинаково.

Матричная РНК (мРНК) может быть получена рекомбинантно в системах *in vivo* способами, известными специалисту в данной области.

В другом варианте, модифицированная РНК, предпочтительно молекулы

мРНК по настоящему изобретению, могут быть получены в системе *in vitro* с использованием, например, системы транскрипции *in vitro*, которая известна специалисту в данной области. Система транскрипции *in vitro*, способная продуцировать РНК, предпочтительно мРНК, требует вводимой смеси

5 модифицированных и немодифицированных нуклеозидтрифосфатов для получения модифицированных молекул мРНК.

Кроме того, модифицированная РНК, предпочтительно молекулы мРНК, могут быть синтезированы химически, например, путем обычного химического синтеза на автоматическом синтезаторе нуклеотидных последовательностей с

10 использованием твердофазного носителя и стандартных методик, или путем химического синтеза соответствующих последовательностей ДНК и последующей *in vitro* или *in vivo* транскрипции.

Кодирующая область, содержащаяся в мРНК и кодирующая белок IFN λ , может представлять собой частично или полностью оптимизированную по

15 кодам последовательность. Оптимизация кодонов относится к методу, который применяется для максимизации экспрессии белка за счет повышения эффективности трансляции соответствующего полирибонуклеотида, поскольку в некоторых случаях существуют кодоны, которые предпочтительно используются некоторыми видами для данной аминокислоты. Примерами кодон-

20 оптимизированных кодирующих областей являются кодирующие области, представленные в SEQ ID NO: 1, 3 и 5.

Кроме того, указанный полирибонуклеотид может содержать дополнительные модификации для регулирования и/или увеличения продолжительности действия. Указанный полирибонуклеотид может также

25 содержать кэп m7GpppG, внутренний сайт посадки рибосомы (IRES – internal ribosome entry site) и/или полиА-хвост на 3'-конце и/или дополнительные последовательности для стимуляции трансляции. Кроме того, полирибонуклеотид, используемый в соответствии с настоящим изобретением, может также содержать дополнительные функциональные области и/или 3' - или

30 5'-некодирующие области. 3' - и/или 5'-некодирующие области могут быть последовательностями, естественным образом граничащими с кодируемым белком, или искусственными последовательностями, которые способствуют стабилизации и/или регуляции указанного полирибонуклеотида. Подходящие

последовательности могут быть идентифицированы и исследованы с помощью обычных экспериментов.

Кроме того, указанный полирибонуклеотид также может иметь дополнительные функциональные области и может быть объединен с регуляторными элементами и последовательностями-мишенями микроРНК, например, для пространственного и временного контроля активности желаемого полирибонуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую белок, т.е., например, в отношении к конкретным клеткам или типам клеток и/или стадиям развития или конкретным временным рамкам.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения мРНК также содержит 5'- и/или 3'-UTR. В особенно предпочтительном варианте осуществления последовательность UTR представляет собой последовательность 5'-UTR, как описано в WO 2017/167910. Еще более предпочтительно мРНК содержит последовательность 5'-UTR непосредственно перед стартовым кодоном кодирующей области, которая имеет следующую последовательность: GGGAGACGCCACC (SEQ ID NO:7).

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения мРНК также содержит 3'-UTR, предпочтительно 3'-UTR последовательности 5'-TTCG-3'.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения мРНК транскрибируется с молекулы ДНК, как описано в WO 2017/167910. Более предпочтительно такая молекула ДНК содержит одну цепь со следующими элементами:

(а) кодирующей областью, включающей стартовый кодон на ее 5'-конце, кодирующей полипептид IFN λ ; и

(б) непосредственно выше указанной кодирующей последовательности последовательность GGGAGACGCCACC (SEQ ID NO:7) и выше этой последовательности промотор, который распознается ДНК-зависимой РНК-полимеразой, предпочтительно промотор с последовательностью

ТААТАСГАСТКАСТАТА (SEQ ID NO:8), которая распознается ДНК-зависимой РНК-полимеразой T7.

Таким образом, в таком варианте осуществления настоящего изобретения последовательность выше стартового кодона кодирующей области представляет собой ТААТАСГАСТСАСТАТА GGGAGACGCCACC (SEQ ID NO:9).

В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения мРНК транскрибируется с молекулы ДНК, как показано в любой из SEQ ID NO: 10-12. SEQ ID NO: 10 показывает молекулу ДНК для транскрипции молекулы мРНК, которая кодирует IFN λ -1. SEQ ID NO: 11 показывает молекулу ДНК для транскрипции молекулы мРНК, которая кодирует IFN λ -2. SEQ ID NO: 12 показывает молекулу ДНК для транскрипции молекулы мРНК, которая кодирует IFN λ -3.

мРНК, которая кодирует IFN λ , может быть объединена с мРНК, которая кодирует интерферон другого типа, предпочтительно интерферон I типа или интерферон II типа. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения интерферон I типа выбран из группы, состоящей из IFN- β , IFN- α 1, IFN- α 2, IFN- α 8, IFN- α 14, IFN- α 17, IFN- α 4, IFN- α 5, IFN- α 6, IFN- α 7, IFN- α 10, IFN- α 16 и IFN- α 21 или любой их комбинации. В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения интерфероном I типа является IFN- α 16 или IFN- β . В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения другой тип интерферона представляет собой интерферон II типа, в частности IFN γ . Для такой мРНК, кодирующей другой интерферон, применимо то же самое в связи с предпочтительными вариантами осуществления (например, возможные модификации, промоторные последовательности, UTR и т. д.), как описано выше для мРНК, кодирующей IFN λ .

Пример последовательности РНК, кодирующей IFN- α 16, показан в SEQ ID NO: 16. Кодируемый белок показан в SEQ ID NO: 17.

Пример последовательности РНК, кодирующей IFN- β , показан в SEQ ID NO: 18. Кодируемый белок показан в SEQ ID NO: 19.

Пример последовательности РНК, кодирующей IFN- γ , показан в SEQ ID NO: 20. Кодируемый белок показан в SEQ ID NO: 21.

Пример последовательности ДНК, которая может быть транскрибирована в мРНК, кодирующую IFN- α 16, показан в SEQ ID NO: 22.

Пример последовательности ДНК, которая может быть транскрибирована в мРНК, кодирующую IFN- β , показан в SEQ ID NO: 23.

Пример последовательности ДНК, которая может быть транскрибирована в мРНК, кодирующую IFN- γ , показан в SEQ ID NO: 24.

5 Пример последовательности мРНК, кодирующей IFN- α 16, показан в SEQ ID NO: 25.

Пример последовательности мРНК, кодирующей IFN- β , показан в SEQ ID NO: 26.

10 Пример последовательности мРНК, кодирующей IFN- γ , показан в SEQ ID NO: 27.

мРНК, которую следует вводить в соответствии с настоящим изобретением, находится в форме фармацевтической композиции. В соответствии с настоящим изобретением термин «фармацевтическая композиция» относится к композиции для введения субъекту. Примеры субъектов включают млекопитающих, таких как собака, кошка, свинья, корова, овца, лошадь, грызун, например, крыса, мышь и морская свинка, или примат, например, горилла, шимпанзе и человек. В наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения субъектом является человек.

15

Обычно РНК включают в фармацевтическую композицию в эффективном количестве. Термин «эффективное количество» относится к количеству, достаточному для того, чтобы вызвать обнаруживаемый терапевтический ответ у субъекта, которому должна быть введена фармацевтическая композиция.

20

Фармацевтическая композиция может содержать фармацевтически приемлемый носитель, т.е. химические соединения, материалы, ингредиенты и/или композиции, которые, в пределах значимого медицинского суждения, подходят для применения в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соответствующие разумному соотношению польза/риск. Таким образом, фармацевтически приемлемый носитель представляет собой неактивное вещество, объединенное вместе с фармацевтически активным веществом для облегчения обращения с ним с точки зрения дозировки, адсорбции, растворимости или фармакокинетических показаний. Примеры подходящих фармацевтически приемлемых носителей

25

30

хорошо известны в данной области техники и включают забуференные фосфатом солевые растворы, буфер, воду, эмульсии, такие как масляно-водные эмульсии, различные типы смачивающих агентов и стерильные растворы. Преимущественно водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и буферные среды. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Дополнительные примеры фармацевтически приемлемых носителей включают, но не ограничиваются ими, физиологический раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы, цитрат, фосфат и другие органические кислоты; солеобразующие противоионы, например, натрий и калий; низкомолекулярные полипептиды (>10 аминокислотных остатков); белки, напр. сывороточный альбумин или желатин; гидрофильные полимеры, т.е. поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как гистидин, глутамин, лизин, аспарагин, аргинин или глицин; углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; моносахариды; дисахариды; другие сахара, т.е. сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; хелатирующие агенты, например, ЭДТА; неионные поверхностно-активные вещества, например монолаурат полиоксиэтиленсорбитана, доступный на рынке под торговым названием Tween, пропиленгликоль, Pluronic или полиэтиленгликоль; антиоксиданты, включая метионин, аскорбиновую кислоту и токоферол; и/или консерванты, например хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенольный, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, т.е. метил- или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол. Подходящие фармацевтически приемлемые носители и их составы более подробно описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17-е изд., 1985, изд-во Mack Publishing Co. Кроме того, могут также присутствовать консерванты, стабилизаторы и другие добавки, например, противомикробные препараты, антиоксиданты, хелатирующие агенты и инертные газы, наносистемы или липосомы и т.п.

Введение мРНК, кодирующей белок IFN- λ , для лечения и/или профилактики вирусного заболевания может быть достигнуто средствами и способами, известными специалисту в данной области, в частности, для

обеспечения того, чтобы мРНК достигла намеченной целевой ткани/клетки-мишени. Возможными способами введения являются, например, внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, подкожный и введение в дыхательную систему.

5 Если вызванное вирусом заболевание представляет собой респираторное заболевание, тогда предпочтительно введение в дыхательную систему.

Возможности доставки в дыхательную систему включают инстилляции и ингаляции. В другом варианте для доставки мРНК в легкое также возможно внутривенное (в/в) введение препаратов, обладающих тропностью к легким.

10 В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическую композицию, содержащую мРНК, кодирующую полипептид IFN- λ , вводят пациенту путем ингаляции.

мРНК можно вводить путем ингаляции в любой форме, подходящей для вдыхания. В вариантах осуществления настоящего изобретения мРНК
15 присутствует в фармацевтической композиции в форме, пригодной для ингаляции в виде аэрозоля. Особенно подходящим способом введения мРНК в дыхательную систему пациента является распыление.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения вдыхание является болюсной ингаляцией. Это означает, что аэрозоль,
20 содержащий активное вещество, при вдыхании лишь на короткое время смешивается с вдыхаемым воздухом. Если аэрозоль, содержащий активный агент, смешать с воздухом в начале ингаляции, активный агент достигнет с первой частью вдыхаемого воздуха более глубоких отделов легких. Если в конце ингаляции добавление активного агента прекращается, активный агент не
25 откладывается в центральной области легких, то есть в дыхательных путях в конце ингаляции. Используя болюсную ингаляцию, можно лучше воздействовать на различные области легких, например, на периферию легких или центральную область, что касается отложения активного агента, в зависимости от потребности основного болезненного состояния.

30 мРНК может быть успешно объединена в фармацевтической композиции с соединениями, которые облегчают доставку мРНК в клетки-мишени или ткань-мишень и/или повышают ее стабильность. Одной из возможностей в этом

отношении является формирование РНК в виде наночастиц с подходящими веществами, такими как описанные, например, в РСТ/EP2020/053774.

Примерами предпочтительных агентов или реагентов для доставки и/или введения РНК в клетку-мишень или ткань-мишень в данном контексте являются реагенты для липосомальной трансфекции (LTR – liposomal transfection reagent).

Одним конкретным способом доставки и/или введения мРНК в клетки-мишени или ткань-мишень является трансфекция. Таким образом, можно предусмотреть возможность трансфекции используемой мРНК (в (целевые) клетки или ткань), доставки/введения посредством трансфекции и/или подготовки к трансфекции. Средства и способы трансфекции мРНК хорошо известны в данной области и, например, описаны Tavernier (loc. cit.), Yamamoto (*Eur J Pharm Biopharm.* 71(3), 2009, 484-489) и Kormann (*Nat. Biotechnol.*, 29(2), 2011, 154-157). Конкретными способами трансфекции являются липофекция, магнитофекция, магнитолипофекция или комплексообразование с полимерами. Следовательно, используемая мРНК может быть приготовлена для липофекции, подготовлена для трансфекции посредством липофекции, доставлена/введена посредством липофекции и/или введена посредством липофекции.

Таким образом, фармацевтическая композиция может (дополнительно) содержать по меньшей мере один липидный или липосомальный реагент для трансфекции или энхансер (LTR; липосомальный реагент для трансфекции). Используемая мРНК может содержаться в LTR, образовывать комплекс с LTR и/или доставляться посредством LTR. В частности, используемая мРНК может содержаться и/или доставляться с помощью (соответствующих) комплексов для липофекции, содержащих мРНК и LTR. Фармацевтическая композиция может (дополнительно) содержать комплексы для липофекции.

LTR известны в данной области техники и предоставляются, например, фирмой OzBiosciences, Марсель, Франция. Например, такие LTR могут быть липидами или липидоидами, предпочтительно катионными липидами или катионными липидоидами, такими как липидоиды, описанные в РСТ/EP2014/063756 (например, C12-(2-3-2), липиды, как описано в EP2285772 (например, продукт Dogtor) и липополиамины, описанные в EP 1003711 (например, продукты DreamFect™ и DreamFect Gold™). Конкретный LTR может быть выбран из группы, состоящей из

- (i) C12-(2-3-2);
(ii) DreamFectTM, предпочтительно DreamFect GoldTM (DFTM/DF-GoldTM, фирма OzBiosciences, Марсель, Франция);
(iii) Dogtor (OzBiosciences, Марсель, Франция); и
5 (iv) продукт типа липофектамина, например, Lipofectamine 2000 (фирма Invitrogene, Калифорния, США).

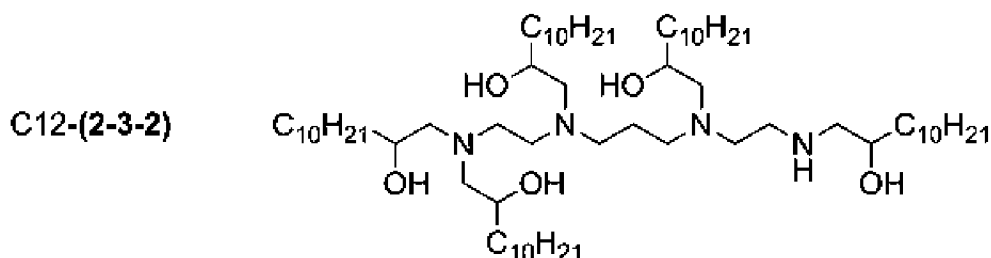
В принципе продукт Dogtor предпочтителен, продукт DreamFectTM более предпочтителен и продукт DF-GoldTM и C12-(2-3-2) является еще более предпочтительным реагентом (реагентами) LTR.

10 Такие LTR, как продукт Dogtor, описаны, например, в EP2285772. Такие LTR, как продукт DFTM или DF-GoldTM, описаны, например, в EP1003711. В принципе предпочтительными LTR являются такие олигомеры, полимеры или липидоиды, как описанные в PCT/EP2014/063756, конкретные катионные липиды, как описанные в EP2285772, и конкретные липополиамины, как описано
15 в EP1003711. Такие LTR, как C12-(2-3-2) и DF-GoldTM, являются наиболее предпочтительными.

Неограничительными примерами комплексов липофекции являются DF-GoldTM/РНК липоплексы и C12-(2-3-2)/РНК липоплексы.

20 C12-(2-3-2) является особенно предпочтительным LTR со структурой, показанной в формуле (V) (Jarzębińska с соавт., *Angew Chem Int Ed Engl.*, 2016; 55(33):9591-5):

Формула (V)

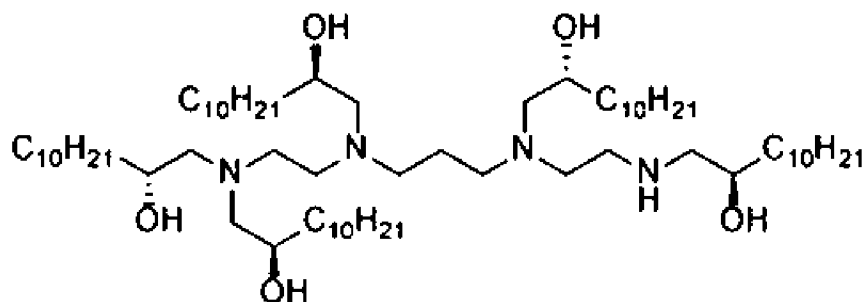


25 C12-(2-3-2) предпочтительно получают согласно описанному, например, в WO 2016/075154, A1, EP 3013964 и Jarzębińska с соавт. (*Angew Chem Int Ed Engl.*, 2016;55(33):9591-9595). Катионный липидоид можно получить путем

смешивания N1-(2-аминоэтил)-N3-(2-((3,4-диметоксибензил)амино)этил)пропан-1,3-диамина (8,9 г, 1 экв., 28,67 ммоль) с 1,2-эпоксидодеканом (42,27, 8 экв., 229,4 ммоль) при перемешивании в течение 24 ч при 80°С при постоянном встряхивании с последующей очисткой и удалением 3,4-диметоксибензильной защитной группы.

Можно использовать различные изомеры C12-(2-3-2), такие как рацемат, S-изомер и/или R-изомер. Предпочтительно C12-(2-3-2) используют в виде чистого R-изомера и он имеет структуру, показанную в формуле (VI). Для получения чистых R-изомеров C12-(2-3-2) его можно приготовить, как описано выше для C12-(2-3-2), используя для синтеза R-изомер 1,2-эпоксидодекана.

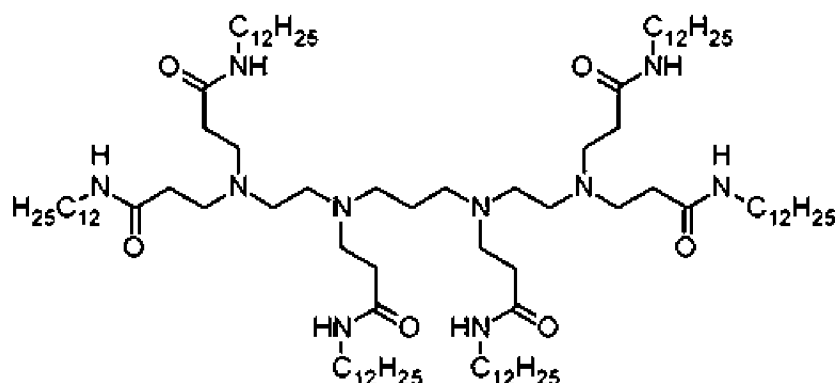
Формула (VI)



Следовательно, в предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит мРНК, кодирующую IFNλ, и дополнительно содержит липидоид, имеющий структуру, показанную в формуле (V), предпочтительно как показано в формуле (VI).

Еще одним особенно предпочтительным LTR является катионный липидоид формулы (VII), также обозначаемый в настоящем изобретении как «dL_P», который может быть синтезирован посредством реакции N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина с N-додецилакриламидом с использованием борной кислоты в качестве катализатора. Для реакции смесь можно перемешивать при 100°С в условиях микроволнового облучения.

Следовательно, в дополнительных предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит мРНК, кодирующую IFNλ, и дополнительно содержит липидоид, имеющий структуру, показанную в формуле (VII).



Кроме того, фармацевтическая композиция содержит катионный липидоид формулы (V), (VI) и/или (VII), предпочтительно dL_P и/или C12-(2-3-2), более предпочтительно dL_P и/или R-изомер C12-(2-3-2), содержащихся в составе, как описано ниже. В частности, описанные в настоящем изобретении агенты и реагенты для доставки и/или введения РНК в клетку-мишень или ткань-мишень, а также описанные в настоящем изобретении LTR, могут быть объединены с одним или несколькими (например, двумя, тремя или четырьмя) дополнительными липидами (например, холестерин, DPPC, DOPE и/или PEG-липиды (например, DMPE-PEG, DMG-PEG2000)). Эти дополнительные липиды могут поддерживать нужную функцию агентов/реагентов и LTR (поддерживать и/или увеличивать доставку и/или введение РНК в клетку или ткань и улучшать эффективность трансфекции, соответственно) и функционировать как соответствующие «хелперные липиды». Конкретными примерами таких «вспомогательных липидов» являются холестерин, DPPC, DOPE и/или ПЭГ-липиды (например, DMPE-PEG, DMG-PEG (например, DMG-PEG2000)).

Дополнительные липиды (например, «вспомогательные липиды») также могут быть частью (частями) раскрытых здесь комплексов/частиц. Специалист в данной области может получить комплексы/частицы в соответствии с настоящим изобретением. Примеры дополнительных липидов (например, «вспомогательных липидов») также известны в данной области. Специалист в данной области может выбрать подходящие дополнительные липиды (например, «хелперные липиды») и соотношения агентов/реагентов/LTR и дополнительных липидов

(например, «хелперных липидов»). Такими соотношениями могут быть молярные отношения 1-4:1-5, 3-4:4-6, примерно 4:5, примерно 4:примерно 5,3 агентов/реагентов/LTR: дополнительные липиды (более узкие предпочтительные диапазоны). Например, агенты/реагенты/LTR могут быть объединены с тремя
5 дополнительными липидами, такими как DPPC, холестерин и DMG-PEG2000, в молярном соотношении 8:5,3:4,4:0,9 соответственно или, более конкретно, 8:5,29 : 4,41 : 0,88 соответственно.

Предпочтительно, dL_P и/или C12-(2-3-2), более предпочтительно dL_P и/или R-изомер C12-(2-3-2), получают, как описано выше, и применяют со
10 вспомогательными липидами DPPC, холестерином и ПЭГ-липидом DMG-PEG2000 в молярных соотношениях 8:5,29:4,41:0,88 для приготовления липоидных частиц.

Композиция, в которой R-изомер соединения C12-(2-3-2) (формула VI) объединен с липидами DPPC, холестерином и ПЭГ-липидом DMG-PEG2000 в
15 молярных соотношениях 8:5,29:4,41:0,88, также приводится в настоящем изобретении как «LF92». Композиция, в которой соединение dL_P (формула VII) объединен с липидами DPPC, холестерином и ПЭГ-липидом DMG-PEG2000 в молярных соотношениях 8:5,29:4,41:0,88, также приводится в настоящем изобретении как «LF111».

20 Кроме того, примеры, например, описанные в WO 2016/075154 A1, EP 3013964, Zhang с соавт. (TERMIS, 2019, *Tissue Engineering*: часть A, том 25, №№ 1 и 2), dL_P и/или C12-(2-3-2), можно использовать в качестве невирусного вектора для получения стабильного липоплекса с молекулами мРНК, основанного на электростатическом взаимодействии между положительными
25 аминогруппами липидоида и отрицательными фосфатными группами молекул мРНК (Anderson, Human Gene Therapy 14, 2003, 191-202). Для стабилизации структуры липоплекса и уменьшения вытекания dL_P и/или C12-(2-3-2), более предпочтительно dL_P и/или R-изомер C12-(2-3-2), могут поставляться с двумя вспомогательными липидами под названием 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-
30 фосфохолин (DPPC) и холестерин (Anderson, *Drug Delivery* 11, 2004, 33-39; Liang, *Journal of Colloid and Interface Science* 278, 2004, 53-62) . В конце добавляют к липидной смеси 1,2-димиристоил-sn-глицерин, метоксиполиэтиленгликоль (DMG-PEG) 2кДа (DMG-PEG2000) для получения

пегелированной липосомы. Уже хорошо известно, что пегелирование улучшает физико-химические характеристики липосомального состава путем повышения растворимости в воде, защиты от ферментативной деградации и ограничения иммуногенных и антигенных реакций (Milla, *Current Drug Metabolism* 13, 2012, 105-119). Окончательные соотношения N/P для всей смеси этановых липидов должны составлять 8:5,29:4,41:0,88, обозначая молярные соотношения аминокислот dL_P и/или C12-(2-3-2)/DPPC/холестерин/DMG-PEG2000, соответственно, на одну фосфатную группу молекулы мРНК.

Следовательно, в предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит мРНК, кодирующую IFN λ , и дополнительно содержит dL_P и/или C12-(2-3-2), предполагаемый dL_P и/или R-изомер C12-(2-3-2), объединенные в единый состав с DPPC, холестерином и DMG-PEG2000. Кроме того, в особенно предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит мРНК, кодирующую IFN λ , и дополнительно содержит dL_P и/или C12-(2-3-2), предпочтительно dL_P и/или R-изомер C12-(2-3-2), объединенные в единый состав с DPPC, холестерином и DMG-PEG2000 с окончательными соотношениями N/P для всей смеси этановых липидов 8:5,29:4,41:0,88 аминокислот dL_P и/или C12-(2-3-2)/DPPC/холестерин/DMG-PEG2000, соответственно, к одной фосфатной группе молекулы мРНК.

R-изомеры C12-(2-3-2), объединенные с DPPC, холестерином и DMG-PEG2000, как указано выше, также называют составом LF92.

Следовательно, в особенно предпочтительных вариантах осуществления фармацевтической композиции, содержащей мРНК, кодирующую IFN λ , указанная фармацевтическая композиция дополнительно содержит состав LF92.

dL_P, объединенный с DPPC, холестерином и DMG-PEG2000, как указано выше, также обозначают как состав LF111.

Следовательно, в другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция, содержащая мРНК, кодирующую IFN γ , дополнительно содержит состав LF111.

Когда фармацевтическую композицию вводят пациенту путем ингаляции, одна доза для ингаляции пациента содержит от 200 мкг до 15 мг мРНК, кодирующей полипептид IFN- λ . В прилагаемых примерах приводят

эксперименты на мышах, которые показывают, что индукция нижестоящих мишеней IFN- λ (что указывает на противовирусную активность) уже может быть достигнута при чрезвычайно низких уровнях мРНК IFN- λ при введении путем инстилляций в легкие. При экстраполяции на пациентов-людей в зависимости от массы легкого можно ожидать, что эффективное количество мРНК IFN- λ будет лежать в диапазоне от 200 мкг до 15 мг на дозу, предпочтительно от 250 мкг до 5 мг на дозу, даже больше предпочтительно от 250 мкг и 1 мг на дозу, еще более предпочтительно от 250 мкг до 750 мкг на дозу.

Количество доз, которые должны быть введены субъекту, зависит от фактической цели. В случае острой вирусной инфекции предпочтительно назначают следующие дозы:

- Одна доза однократно (например, при легкой инфекции); или
- Одна доза каждые два дня в течение 2, 4, 6, 8, 10 или 14 дней; или
- Одна доза в день в течение 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дней; или
- Две дозы в день в течение 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дней.

В случае профилактики вирусной инфекции или вызываемого вирусом обострения легочных заболеваний, таких как астма или хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), предпочтительно следующее введение:

- одна доза в неделю, предпочтительно на протяжении 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 недель, предпочтительно на протяжении 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 месяцев.

Настоящее изобретение также относится к молекуле мРНК, включающей последовательность, показанную в любой из SEQ ID No: 13-15, 25, 26 или 27.

SEQ ID No: 13-15, 25, 26 и 27 содержат оптимизированную по кодонам кодирующую область для IFN- λ 1, - λ 2 и - λ 3 из IFN- α 16, IFN- β и IFN- γ , соответственно. Более того, каждая из этих мРНК содержит непосредственно перед стартовым кодоном последовательность GGGAGACGCCACC (SEQ ID NO:7) и в качестве 3'-UTR последовательность 5'-TTCG-3'.

Предпочтительно такая мРНК дополнительно содержит поли-А хвост, например, примерно из 200 нуклеотидов.

Настоящее изобретение также относится к молекуле ДНК, содержащей последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 10-12 или 22-24. SEQ ID NO: 10 показывает молекулу ДНК для транскрипции молекулы мРНК,

которая кодирует IFN- λ -1. SEQ ID NO: 11 показывает молекулу ДНК для транскрипции молекулы мРНК, которая кодирует IFN- λ -2. SEQ ID NO: 12 показывает молекулу ДНК для транскрипции молекулы мРНК, которая кодирует IFN- λ -3. SEQ ID NO: 22 показывает молекулу ДНК для транскрипции молекулы мРНК, которая кодирует IFN- α 16. SEQ ID NO: 23 показывает молекулу ДНК для транскрипции молекулы мРНК, которая кодирует IFN- β . SEQ ID NO: 24 показывает молекулу ДНК для транскрипции молекулы мРНК, которая кодирует IFN- γ .

Фигура 1. Концентрации IFN- λ 1 в супернатантах клеток, обработанных рекомбинантным IL-29 человека (гес. hIL-29). Супернатанты клеток A-549, обработанных дозами гес. hIL-29, как показано на оси x, собирали и хранили при -80°C. В день анализа проводят ИФА ELISA hIL-29 в соответствии с протоколом набора. Триметилбензидин (ТМБ) инкубировали в течение 15 мин. Дельту оптической плотности (ОП) 650 и 450 нм использовали для анализа с помощью программы GraphPad Prism V.8.

Фигура 2. Концентрации IFN λ 1 в супернатантах клеток, трансфицированных мРНК IFN λ . Собирали супернатанты клеток A-549, трансфицированных дозами мРНК, кодирующей hIL-29, как указано на оси x, и хранили при -80°C. В день анализа проводили ИФА ELISA hIL-29 в соответствии с протоколом набора. ТМБ инкубировали в течение 15 мин. Дельту оптической плотности (ОП) 450 и 650 нм использовали для анализа с помощью программы GraphPad Prism V.8.

Фигура 3. Активация мишени после лечения или трансфекции высокой дозой. Клетки A549 трансфицировали 15 нг/лунку мРНК IFN-лямбда и стимулировали 2,9 нг/лунку гес. hIL-29 человека. В качестве контроля A549 трансфицировали 15 нг/лунку BMP2-Stop-кодирующей мРНК. В разные моменты времени (6, 10, 24, 48, 72 и 120 ч) собирают и лизируют клетки для ПЦР-анализа в реальном времени.

Фигура 4. Целевая индукция после лечения или трансфекции средней дозой. Клетки A549 трансфицировали 4 нг/лунку мРНК IFN-лямбда и стимулировали 0,6 нг/лунку гес. hIL-29 человека. В качестве контроля A549 трансфицировали 4 нг/лунку BMP2-Stop-кодирующей мРНК. В разные моменты

времени (6, 10, 24, 48, 72 и 120 ч) собирают и лизируют клетки для ПЦР-анализа в реального времени.

Фигура 5. Активация мишени после трансфекции или лечения низкой дозой. Клетки A549 трансфицировали 2 нг/лунку мРНК IFN-лямбда и стимулировали 0,3 нг/лунку гес. hIL-29 человека. В качестве контроля A549 трансфицировали 2 нг/лунку BMP2-Stop-кодирующей мРНК. В разные моменты времени (6, 10, 24, 48, 72 и 120 ч) собирали и лизировали клетки для ПЦР-анализа реального времени.

Фигура 6. Активация мишени после трансфекции или лечения низкой дозой. Клетки A549 трансфицировали 1 нг/лунку мРНК IFN-лямбда и стимулировали 0,1 нг/лунку гес. hIL-29 человека. В качестве контроля A549 трансфицировали 1 нг/лунку BMP2-Stop-кодирующей мРНК. В разные моменты времени (6, 10, 24, 48, 72 и 120 ч) собирали и лизировали клетки для ПЦР-анализа реального времени.

Фигура 7. Активация нижерасположенной мишени через 6 часов после обработки рекомбинантным IFN λ 1 или мРНК, кодирующей IFN λ 1, по оценке с помощью количественной ПЦР для IFIT1, IFIT3, OAS3 и ISG15. Активацию нижерасположенной мишени наносят на график против измеренных уровней IFN λ 1.

Фигура 8. На фигуре показано:

(а) нисходящая передача сигналов IFN λ 1 в клетках A-549 и A-549-ACE2 через 48 ч после трансфекции мРНК разными дозами. Сходные структуры индукции наблюдают в обеих клеточных линиях.

(б) нисходящая передача сигналов IFN λ 1 в клетках A-549 и A-549-ACE2 с использованием рекомбинантного белка через 48 ч. В этом случае повышенные уровни индукции наблюдают в клетках A-549.

(в) экспрессия IFN- λ 1 в клетках A-549-ACE2: трансфекция клеток A549-ACE2 мРНК, кодирующей IFN- λ 1, приводит к дозозависимой выработке IFN- λ 1 через 48 ч.

Фигура 9. Экспрессия IFN λ 1 в супернатантах трансфицированных клеток после трансфекции погруженных клеток. Сопоставимые уровни экспрессии наблюдают между клетками HEK293, A-549 и FreeStyle 293-F. Более низкие уровни наблюдали в клетках 16HBE14o-; необработанные лунки показали

фоновое значение при анализе методом ELISA. Пик экспрессии наблюдали через 24 часа после трансфекции, причем уровни оставались постоянными, по крайней мере, до 48 часов после трансфекции.

Во всех клеточных линиях, кроме клеток 16HBE14о-, дозы трансфекции ниже 4 нг/лунку были достаточными для достижения эффективной противовирусной концентрации IFN λ 0,3 нг/мл через 6 ч после трансфекции.

Фигура 10. (а) нисходящая передача сигналов IFN λ 1 в погруженных клетках A-549 после трансфекции мРНК IFN-лямбда. Указанные значения нормализованы относительно нетрансфицированных клеток. Наблюдали активацию всех генов-мишеней, причем пик экспрессии был через 24 часа после трансфекции. Наблюдали очень сильное целевое стимулирование даже при низких дозах мРНК. (б) нисходящая передача сигналов IFN λ 1 в погруженных клетках 16HBE14о- после трансфекции мРНК IFN-лямбда. Указанные значения нормализованы относительно нетрансфицированных клеток. Наблюдали активацию всех генов-мишеней (ниже для OAS3), причем пик экспрессии был через 24 часа после трансфекции. В целом наблюдали слабое стимулирование мишени по сравнению с клетками A-549.

Фигура 11. (а) Результаты анализа ELISA для обнаружения IFN λ 1 в культурах ALI после трансфекции мРНК IFN λ 1. Значения измеряли через 24 часа после трансфекции. Общее количество IFN λ 1 измеряли в апикальном и базолатеральном компартментах. Обнаружение IFN λ 1 было следующим: A-549 > 16HBE14о- > Epithelix человеческие первичные ALI дикого типа. Максимальный базальный выход в ALI Epithelix в 500 раз ниже, чем в ALI A-549.

(б) Измерение нисходящей активации мишени в культурах ALI через 24 часа после трансфекции мРНК IFN λ 1. Самую высокую нисходящую активацию мишени наблюдали в культуре A-549 ALI. Указанные значения нормализованы относительно нетрансфицированных клеток. Одинаковый характер активации наблюдали для всех клеточных линий: ISG15 > IFIT1 $\geq$ IFIT3 > OAS3.

(в) Эндогенные уровни нижерасположенных мишеней в необработанных 16HBE и первичных ALI человека Epithelix по сравнению с ALI A-549. Первичные ALI человека 16HBE14о- и Epithelix имеют до 40 раз более высокие базальные эндогенные уровни нижерасположенных мишеней, чем ALI A-549.

Фигура 12. (а) Количественное определение мРНК IFN λ 1 в гомогенате легких обработанных мышей через 5 и 24 часа после лечения. мРНК IFN λ 1 определяют в зависимости от дозы через 5 часов после применения с очень низкими уровнями через 24 часа после применения. (б) Результаты анализа ELISA, определяющего IFN λ 1 в гомогенате легких и в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ) через 5 и 24 часа после применения. IFN λ 1 можно было измерить в гомогенате легких и показать в ЖБАЛ через 5 часов после нанесения. Через 24 часа после применения определялись только низкие уровни IFN λ 1. (в) Нисходящая активация IFN λ 1 в гомогенате легких. Показана функциональность мРНК IFN λ 1 человека у мышей. Указанные значения нормализованы относительно необработанных мышей. Высокий уровень индукции целевых генов наблюдают через 5 ч после применения и активация продолжается через 24 ч после применения, хотя и менее активно. Индукция OAS3 слабее по сравнению с другими целевыми генами, но индукция выше через 24 часа, чем через 5 часов.

Фигура 13. Сравнение мРНК hIFN λ 1 с рекомбинантным белком (см. также пример 8).

Фигура 14. Анализ методом ELISA hIFN λ в супернатантах трансфицированных клеток A-549: сравнение LF92 с коммерческим реагентом для трансфекции (см. также пример 9).

Фигура 15. Индукция целевого гена мРНК в составе LF92 (см. также пример 10).

Фигура 16. Переносимость *in vitro* в составе LF92 мРНК, кодирующей hIFN λ 1 (см. также пример 11).

Фигура 17. Корреляция трансляции мРНК и индукции генов-мишеней (а) IFIT1, (б) OAS3, (в) ISG15 и (г) MX1 (см. также пример 12).

Фигура 18. Ингибирование *in vitro* (а) SARS-CoV-2 и (б) IAV, оцененное с помощью количественной ПЦР (см. также пример 13).

Фигура 19. Обнаружение мРНК hIFN λ 1 в гомогенате легких (см. также пример 14).

Фигура 20. Обнаружение белка hIFN λ 1 в гомогенате легких (см. также пример 15).

Фигура 21. Активация целевого гена (а) IFIT1, (б) IFIT3, (в) ISG15 и (г) OAS3 в ткани легкого после применения мРНК hIFNλ1 (см. также пример 16).

Фигура 22. Обнаружение хемокинов в плазме после однократного назального применения мРНК hIFNλ1 (см. также пример 17).

5 Фигура 23. Активация целевого гена (а) IFIT1 (б) IFIT3 (в) ISG15 и (г) OAS3 в ткани легких при лечении мРНК hIFNλ1 (см. также пример 18).

Фигура 24. Обнаружение отложений мРНК hIFNλ1 в легких после назальной аппликации у мышей (см. также пример 19).

10 Фигура 25. Масса тела при повторном введении мРНК hIFNλ1 (см. также пример 20).

Фигура 26. Количественное определение мРНК hIFNλ1 в гомогенате легких хорька (см. также пример 21).

Фигура 27. Активация целевого гена в гомогенате легких хорька (см. также пример 22).

15 Фигура 28. Количественное определение мРНК IFN, активации гена-мишени и индукции цитокинов в гомогенате легких хорька (см. также пример 23).

Фигура 29. Снижение репликации IAV с помощью мРНК, кодирующих IFN (см. также пример 24).

20 Фигура 30. Снижение репликации SARS-CoV2 с помощью мРНК, кодирующей hIFNλ1 (см. также пример 25).

Другие объекты и преимущества настоящего изобретения описываются в приводимых ниже примерах, которые приведены в целях иллюстрации, а не в качестве ограничения рамок охвата настоящего изобретения. Каждая публикация, патент, патентная заявка или другой документ, цитируемые в настоящей заявке, полностью включены в нее посредством ссылки.

ПРИМЕРЫ

Примеры 1 и 2, описанные ниже, направлены на оценку активации нижерасположенной мишени при обработке IFNλ1 рекомбинантным белком или мРНК, кодирующей IFNλ1, в клетках A-549. Для этой цели клетки A549 инкубируют в течение 6 часов с рекомбинантным IFNλ1 или трансфицируют мРНК, кодирующей IFNλ1, и последующую активацию анализируют через 6, 10, 24, 48, 72, 120 и 168 ч после обработки с помощью количественной ПЦР для

IFIT1, IFIT3, OAS3 и ISG15. Кроме того, уровни IFNλ1 измеряют с помощью ELISA hIL-29 в клеточном супернатанте во все моменты времени отбора проб.

При обработке клеток А-549 рекомбинантным IFNλ1 активацию нижерасположенной мишени наблюдают через 6 ч после обработки, но она быстро снижается в более поздние моменты времени после замены среды. IFNλ1-ELISA показывает, что около 30% добавленного белка было восстановлено в супернатанте через 6 ч после обработки. При трансфекции клеток А-549 мРНК, кодирующей IFNλ1, и замене среды через 6 ч после трансфекции IFNλ1 обнаруживают в супернатантах этих клеток до 168 ч с пиком через 48 ч. Нижерасположенные мишени сильно индуцируются также низкими дозами трансфицированной мРНК и остаются активными до 120 ч после трансфекции мРНК.

В прилагаемых примерах используют следующие сокращения и определения:

Аббревиатура	Описание
DMEM	Среда Игла, модифицированная по Дульбекко
ELISA	Фермент-связанный иммуносорбентный анализ
ФБС	Фетальная бычья сыворотка
IFNλ1	Интерферон лямбда 1
ФСБ	Фосфатно-солевой буфер
кПЦР (qPCR)	Количественная полимеразная цепная реакция
IFIT1/3	Интерферон-индуцированный белок с тетратрикопептидным повтором 1/3
OAS3	2'-5'- олигоаденилатсинтетаза 3
ISG15	Стимулируемый интерфероном ген 15
MX1	MX динамин-подобная ГТФ-аза 1
IL-6/8	Интерлейкин 6/8
MCP-1	С-С мотив хемокинового лиганда 2
CXCL9/10/11	С-Х-С мотив хемокинового лиганда 9/10/11
CXCL10	С-Х-С мотив хемокинового лиганда 10

В прилагаемых примерах применяют следующие материалы и методы:

Материал	Фирма	Номер в каталоге
Среда MEM GlutaMAX™	Gibco	41090-028
Термоинактивированная ФБС	Thermo Fisher Scientific	10500064
Пенициллин-стрептомицин 100х	Thermo Fisher Scientific	15140122
Реагент для трансфекции Lipofectamine MessengerMax	Thermo Fisher Scientific	LMRNA008
Фосфатно-солевой буфер Дульбекко (DPBS) 1х без Са и Mg	Thermo Fisher Scientific	Gibco 14190-250

Набор для ELISA IL-29 человека	Abcam	ab100568
Рекомбинантный hIL-29	Abcam	ab155625

Зонды TaqMan	Фирма	Номер в каталоге
IFIT3	Thermo Fisher Scientific	Hs01922752_s1
IFIT1	Thermo Fisher Scientific	Hs03027069_s1
OAS3	Thermo Fisher Scientific	Hs00196324_m1
ISG15	Thermo Fisher Scientific	Hs01921425_s1

Устройство	Фирма	Номер в каталоге или тип
Счетчик клеток Countess	Thermo Fisher Scientific	C10281
Счетчик клеток Countess с камерой	Thermo Fisher Scientific	C10283
96-луночный планшет для культивирования клеток	Corning	Costar 3599
96-луночный планшет для хранения	Corning	Costar 3363
Шейкер для микропланшетов	Heidolph	Titramax
Ридер для микропланшетов	Tecan	Tecan Infinite M200 Pro
Светоциклер® 96	Roche	Light Cycler® 96

2. Методы

5 2.1 Культура клеток

Клетки А-549 культивируют в среде MEM с добавлением 10% термически активированной ФБС и 1% P/S при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. За 24 ч до трансфекции 20000 клеток на лунку высевают в 96-луночные планшеты в общем объеме 100 мкл.

10 2.2 Транскрипция *in vitro*

Для создания матриц для транскрипции *in vitro* кольцевые плазмиды линеаризируют рестрикционным расщеплением с помощью Bsp119I и дополнительно очищают осаждением с помощью этанола и хлороформа.

мРНК получают с использованием стандартной смеси для транскрипции *in vitro* (включая указанные модифицированные трифосфатные нуклеотиды), содержащей РНК-полимеразу T7, неорганическую пирофосфатазу и ингибитор РНКазы. Ко-транскрипционное экпирование было достигнуто путем добавления аналога кэпа ARCA. Для транскрипции химически модифицированной РНК *in vitro* 25% цитидин-5'-трифосфата заменяют на 5-метилцитидин-5'-трифосфат, и 25% уридин-5'-трифосфата заменяют на 2-тиуридин-5'-трифосфат (фирма Jena Biosciences), соответственно (например, SEQ ID NO: 1). Оставшуюся матричную

ДНК расщепляют с помощью ДНКазы I. Затем мРНК очищают с помощью запатентованного процесса фильтрации с помощью тангенциального потока (ссылка на патент авторов).

5 мРНК дополнительно полиаденилируют с использованием поли(А)-полимеразы и снова очищают с помощью запатентованного процесса тангенциальной проточной фильтрации (ссылка на патент авторов). В итоге мРНК фильтруют с использованием мембраны с порами 0,22 мкм. Критические атрибуты качества, включая длину поли(А)-хвоста, целостность, пропорцию кэпа, включение модифицированных нуклеотидов, измеряют при последующем
10 контроле качества мРНК.

2.3 Трансфекция

мРНК, кодирующую IFN λ 1 (SEQ ID NO:13) (которую получают, как описано выше в разделе 2.2), трансфицируют с использованием Lipofectamine® MessengerMAX™ в соотношении РНК к липофектамину 1:1,5 (масса/объем). Для
15 формирования липоплекса мРНК разводят в dH₂O. Lipofectamine® MessengerMAX™ разводят в бессывороточной среде и смешивают пипетированием. После инкубации в течение 10 мин при комнатной температуре раствор РНК добавляют к раствору Lipofectamine® MessengerMAX™, перемешивают и инкубируют еще 5 мин при комнатной температуре.
20 Выполняют титрование дозы в пределах от 500 до 0,98 нг мРНК/лунку. Затем в соответствующие лунки добавляют по 25 мкл раствора Lipoplex для 15,6, 3,9, 1,95 и 0,98 нг мРНК на лунку.

2.4 Сбор материала

Через 6, 10, 24, 48, 72, 120 и 168 ч после трансфекции супернатанты
25 собирают и хранят в свежем 96-луночном планшете для хранения при -80°C до проведения иммуно-ферментного анализа (ELISA). Перед проведением ELISA супернатанты центрифугируют в режиме 500 g в течение 2 мин для осаждения остатков клеток.

Для количественной ПЦР после сбора супернатанта клетки промывают 150
30 мкл D-PBS на лунку и замораживают при -80°C.

2.5 ELISA IFN λ 1

Метод ELISA в отношении к IFN λ применяют в соответствии с протоколом к набору, за исключением того, что инкубация триметилбензидина (ТМБ) сокращена до 15 мин.

5 Пример 1. Экспрессия IFN λ 1 в супернатантах

Наличие IFN λ 1 в супернатантах клеток, трансфицированных или обработанных мРНК, измеряют с помощью hIL-29 ELISA. Обработку рекомбинантным hIL-29 проводят в дозах 2,9, 0,6, 0,3 и 0,1 нг/лунку. Дозы соответствуют 23, 5, 2,5 и 1 нг/мл в супернатанте. Через 6 ч после обработки концентрации от 0,3 до 8 нг/мл количественно определяют в супернатантах методом ELISA. 70% добавленного белка потребляют клетки или он разрушается (см. фиг. 1).

В супернатантах клеток, трансфицированных мРНК, кодирующей IFN λ 1, увеличивающиеся концентрации IFN λ 1 измеряют для каждой дозы вплоть до 48 ч. С 48 до 168 ч IFN λ 1 все еще обнаруживают с небольшим понижением (см. фиг. 2).

15 Пример 2. Активация нижерасположенной мишени

Активацию нижерасположенной мишени после обработки рекомбинантным IFN λ 1 или мРНК, кодирующей IFN λ 1, оценивают с помощью количественной ПЦР для IFIT1, IFIT3, OAS3 и ISG15.

Для всех доз трансфекции мРНК наблюдают высокий уровень индукции IFIT1, IFIT3 и ISG15. Пик индукции наступает между 24 и 48 ч в зависимости от мишени и дозы. После трансфекции мРНК гены-мишени остаются активными до 120 ч (см. фиг. 3–6). Пик индукции OAS3 достигается через 120 ч при всех дозах трансфекции.

Обработка рекомбинантным белком показывает сравнимую индукцию мишени с трансфекцией мРНК через 6 ч после обработки. Во все более поздние моменты времени после замены среды, когда белок больше недоступен для клеток, последующая активация быстро снижается (см. фиг. 3-6).

30 Активацию нижерасположенной мишени через 6 ч после обработки рекомбинантным IFN λ 1 или мРНК, кодирующей IFN λ 1, оценивают с помощью количественной ПЦР для IFIT1, IFIT3, OAS3 и ISG15. Активацию нижерасположенной мишени наносят на график в зависимости от измеренных

уровней IFN λ 1. Активация IFIT1, IFIT3 и ISG15 выше при низких уровнях IFN λ 1 при трансфекции мРНК IFN λ 1 по сравнению с инкубацией с рекомбинантным белком IFN λ 1 (см. фиг. 7).

Краткое изложение примеров 1 и 2

5 При трансфекции клеток A-549 мРНК, кодирующей IFN λ 1, и замене среды через 6 ч после трансфекции IFN λ 1 обнаруживают в супернатантах этих клеток до 168 ч с пиком через 48 ч. Нижерасположенные мишени сильно индуцированы также при низких дозах трансфицируемой мРНК и остаются активными до 120 ч после трансфекции мРНК.

10 При обработке рекомбинантным hIL-29, активацию нижерасположенной мишени наблюдают через 6 ч после обработки и она быстро снижается после замены среды.

В описываемых примерах используют следующие материалы и методы:

1. Методы

15 1.1 In Vitro

1.1.1 Культура клеток

1.1.1.1 Погруженные клетки

Клетки HEK293, A-549 и 16HBE14о- культивируют в среде MEM, обогащенной 10% инаktivированного нагреванием ФБС
20 1% пенициллина/стрептомицина, при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Для клеток 16HBE14о- используют флаконы с покрытием. Клетки FreeStyle 293-F культивируют в суспензии в вентилируемой колбе Эрленмейера на 125 мл с использованием среды для экспрессии FreeStyle F17.

25 За 24 ч до трансфекции клетки высевают в 96-луночные планшеты с общим объемом в лунке 100 мкл со следующей плотностью:

HEK293: 25000 клеток/лунку

FreeStyle 293-F: 25000 клеток/лунку

16HBE14о-: 25000 клеток/лунку

A-549: 20000 клеток/лунку

30 1.1.1.2 Культуры ALI (Air-Liquid-Interface – на границе воздух-жидкость)

Для культур ALI высевают 16HBE14о- и A-549 6×10^4 погруженных клеток (при слиянии 80-90%) в 24-луночные вставки с покрытием. Для 16HBE14о-ALI вставки покрыты 50 мкг/мл коллагена I типа, разведенного в 20 mM уксусной

кислоте. Клетки высевают в 250 мкл среды 16HBE14о- или А-549 апикально. Для 16HBE14о- 500 мкл среды и для А-549 700 мкл среды добавляют к базолатеральной стороне. Клетки инкубируют в течение 72 ч для прикрепления к мембране со средой с апикальной и базолатеральной стороны. За 24 ч до трансфекции базальную среду заменяют свежей средой, а посевную среду на апикальной стороне осторожно отсасывают (метод эрлифта). Клетки поддерживают в виде культур ALI без жидкости на апикальной стороне.

Используют вставки с модельными клетками MucilAirTM от фирмы Epithelix. Культивирование осуществляют в 700 мкл культуральной среды MucilAirTM при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂ в виде культур ALI (воздух-жидкость-интерфейс). Перед трансфекцией клетки оставляют в покое на 2-3 дня после приобретения. Для поддержания культуры среду заменяют каждые 2-3 дня.

1.1.2 Трансфекция

1.1.2.1 Погруженные культуры

мРНК трансфицируют с использованием Lipofectamine® MessengerMAXTM в соотношении РНК к липофектамину 1:1,5 (масса/объем). Титруемую дозу варьируют в пределах от 500 до 0,98 нг мРНК/лунку. Для образования липоплекса мРНК разводят в dH₂O, а Lipofectamine® MessengerMAXTM разводят в среде без сыворотки и смешивают пипетированием. После инкубирования Lipofectamine/ММах в течение 10 мин при комнатной температуре раствор РНК добавляют к раствору Lipofectamine® MessengerMAXTM, перемешивают и инкубируют дополнительно 5 мин при комнатной температуре. Затем в соответствующие лунки добавляют по 25 мкл раствора Lipoplex желаемой концентрации.

1.1.2.2 Культуры ALI

Перед трансфекцией первичных ALI человека Epithelix проводят отмывание слизи. 200 мкл ФСБ (без Mg/Ca) добавляют к апикальной стороне и инкубируют в течение 20 мин при 27°C. Общее время апикальной промывки не должно превышать 30 мин. Для отделения слизи от апикальной поверхности пипеткой Р200 выполняют три движения вперед-назад со 100 мкл апикальной жидкости. ФСБ с апикальной поверхности культуры ALI удаляют осторожной аспирацией, не повреждая эпителий. Для удаления следов ФСБ смывают с помощью 200 мкл

воды для инъекций. ALI 16HBE14o- и A-549 промывают исключительно водой для инъекций (WFI).

Затем клетки трансфицируют 0,1, 0,3, 1, 3 и 6 мкг мРНК в LNP/вставке. Составы размораживают при комнатной температуре и хранят на льду до

5 дальнейшего использования. Подробные расчеты приведены в табл. 1.

Таблица 1. Расчет трансфекции на границе воздух-жидкость (ALI)

		0,1 мкг	0,3 мкг	1 мкг	3 мкг	6 мкг
Доза	мкг/см ²	0,3	0,9	3	9	18
	мкг/вставку	0,1	0,3	1	3	6
Объем трансфекции	[мкл]	25	25	25	25	25
Итоговая концентрация LNP в лунке	[нг/мкл]	4	12	40	120	240
LNP в концентрате	[мкг/мл]	500	500	500	500	500
Число лунок		3	3	3	3	3
Разведение (включая избыток)	мкл LNP	1,0	2,1	7	21	36
	Разбавитель	124,0	85,4	80,5	66,5	39,0

6 ч после трансфекции, LNP отсасывают.

1.1.3 Сбор материала

10 1.1.3.1 Погруженные культуры

В соответствующие моменты времени после трансфекции супернатант клеток собирают и хранят в новом 96-луночном планшете для хранения при -80°C до проведения ELISA. Перед проведением ELISA супернатанты центрифугируют в режиме 500 g в течение 2 мин для осаждения клеточных

15 остатков.

Для количественной ПЦР после сбора супернатанта погруженные клетки промывают 150 мкл D-ФСБ на лунку и осадок клеток замораживают при -80 °C.

1.1.3.2 Культуры ALI

20 Через 24 ч после трансфекции апикальную сторону вставок промывают 200 мкл ФСБ, которые пипетируют трижды. Промывочный раствор собирают в 96-луночный планшет для хранения. Также в планшет для хранения собирают 200 мкл базальной среды. Образцы хранят при -80°C до проведения ELISA.

25 Для количественной ПЦР среду полностью удаляют из вставок без промывки ФСБ. На вставку вносят 175 мкл буфера RLT из набора RNease Mini Kit (фирма Qiagen, номер в каталоге 74104), дополненного DTT (40 мкл/мл). С помощью мини-скребка для клеток клетки отделяют от вкладыша. Буфер RLT

переносят в колонку QIAshredder. Чтобы обеспечить перенос всех клеток, вставку промывают дополнительно 175 мкл буфера RLT. Для завершения лизиса клеток колонки центрифугируют в течение 2,5 мин на максимальной скорости. Лизаты клеток можно заморозить при температуре -80°C или сразу же

5 использовать для выделения РНК.

1.1.4 IFN λ 1 ELISA

IFN λ ELISA проводят в соответствии с инструкциями набора (набор IL-29 Human ELISA, Abcam, ab100568), за исключением того, что ТМБ инкубируют в течение 10 мин вместо 30 мин.

10 1.1.5 Выделение РНК

1.1.5.1 Погруженные клетки

Для погруженных клеток выделение РНК проводят с использованием набора для лизиса клеток SingleShot™ (BioRad, арт. №: 1725080).

15 Приготовление буфера для лизиса клеток SingleShot™ проводят в соответствии с табл. 2. Приготовление всегда осуществляют так, чтобы применять свежеприготовленным, и буфер держат на льду. Лизирующий буфер интенсивно перемешивают, центрифугируют и применяют в течение 2 ч.

Таблица 2. Лизирующий буфер

Компонент	Объем в лунке [мкл]	Объем в 9-луночном планшете [мкл] (с избытком)
Буфер для лизиса клеток SingleShot™	48	4800
Раствор протеиназы К	1	100
Раствор ДНКазы	1	100

20 К замороженным образцам добавляют по 50 мкл лизирующего буфера для выделения РНК на лунку и инкубируют без перемешивания в течение 10 мин при комнатной температуре. Образцы обрабатывают в течение 20 мин. Затем клеточный лизат переносят на планшет для ПЦР. Белок и ДНК расщепляют с использованием программы «BioDNA» в следующих условиях (см. табл. 3):

25 протокол термоблочного циклера для лизиса клеток.

Таблица 3. Протокол термоблочного циклера для лизиса клеток

Время	Температура
5 мин	37°C
5 мин	75°C

Лизат клеток можно хранить до 4 ч на льду, до 2 месяцев при -20°C или до 12 месяцев при -80°C.

1.1.5.2 Культуры на границе воздуха и жидкости (ALI)

РНК выделяют с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104) в соответствии с протоколом производителя. Для элюирования используют 30 мкл воды, свободной от РНКазы.

6. Синтез кДНК

1.1.6.1 для погруженных клеток

Применяют набор iScript™ Select cDNA Synthesis Kit (фирма BioRad, номер в каталоге: 1708897). Планшеты с лизатами клеток размораживают на льду. Все компоненты набора, за исключением обратной транскриптазы iScript™, размораживают на льду, тщательно перемешивают и кратковременно центрифугируют. Синтез кДНК проводят с использованием праймеров OligodT. Следующие компоненты добавляют в пробирку объемом 2 мл, причем обратную транскриптазу iScript добавляют последней (см. табл. 4).

Таблица 4. Избирательный синтез кДНК с применением Master Mix iScript™

Компонент	Объем в лунке (мкл)	Объем в 96-луночном планшете (мкл)
Вода без нуклеазы	9	900
5x реакционная смесь iScript™	4	400
OligodT	2	200
Обратная транскриптаза iScript	1	400
Всего	16	1600

4 мкл клеточного лизата переносят в новый планшет для ПЦР с помощью многоканальной пипетки перед добавлением сверху 16 мкл мастер-микса. Планшет закрывают крышкой из фольги и осторожно перемешивают при 400 об/мин, после чего планшет кратковременно недолго вращают. Синтез кДНК проводят с использованием термоблочного циклера по следующему протоколу («ISCRIP2»).

Таблица 5. Протокол термоблочного циклера для синтеза кДНК

Время	Температура	Стадия
60 мин	42°C	Синтез кДНК
5 мин	85°C	Инактивация прогревом

кДНК можно хранить при -20°C до выполнения кПЦР.

1.1.6.2 Культуры на границе воздуха и жидкости (ALI)

Для синтеза кДНК культур ALI применяют набор Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (фирма Roche, номер в каталоге 4896866001). РНК

5 транскрибируют в кДНК в соответствии с протоколом производителей. Для двухстадийного синтеза кДНК 1 мкг суммарной РНК и 1 мкл праймеров олиго(dT) в общем объеме 13 мкл необходимо для осуществления первой стадии. Один из примеров приготовления смеси матрица-праймер приведен в табл. 6.

10 Таблица 6. Матрица-праймер-смесь

Название	Концентрация нуклеиновой кислоты (нг/мкл)	Объем РНК (мкл)	Праймер Oligo(dT) (мкл)	Вода (без РНКазы) (мкл)
Образец № 1	147,7	6,8	1,0	5,2
			Общий объем	13

Необязательную стадию денатурации при 65°C в течение 10 мин проводят в термоблочном циклере. После этого все оставшиеся реагенты, кроме ферментов обратной транскриптазы и ингибитора РНКазы, оттаивают на льду и
15 кратковременно центрифугируют. Чтобы приготовить мастер-микс из компонентов, перечисленных в табл. 7, в новую пробирку вносят:

Таблица 7. Master-Mix

Реактив	1 × [мкл]	n=4
5X реакционный буфер	4	16
Ингибитор РНКазы	0,5	2
dNTPS	2	8
Обратная транскриптаза	0,5	2
Общий объем (мкл)	7	28

Наконец, к реактивам, перечисленным в табл. 7, добавляют ферменты.
20 Объем мастер-микса адаптируют в зависимости от количества образцов. В каждую пробирку, содержащую смесь матрицы и праймера, добавляют 7 мкл мастер-микса, чтобы получить конечный объем 20 мкл на пробирку, см. табл. 6. Пробирки тщательно перемешивают и быстро центрифугируют. Пробирки помещают обратно в термоблочный циклер и используют следующую программу
25 обратной транскрипции (вторая стадия синтеза кДНК):

Таблица 8. Программа обратной транскрипции с применением праймера Oligo(dT)

Стадия в термоблочном циклере	Длительность [мин]	Температура [°C]
1	30	55
2	5	85

До применения кДНК можно хранить при -20 °C.

5 1.1.7 кПЦР с использованием зондов TaqMan

Следующие компоненты, указанные в табл. 9, объединяют и кратковременно взбалтывают. Чтобы опустить реакционную смесь до дна пробирки и удалить пузырьки воздуха смесь кратковременно центрифугируют. 18 мкл TaqMan мастер-микс переносят в оптический 96-луночный реакционный планшет для количественной ПЦР. Добавляют 2 мкл матрицы кДНК (кДНК и вода, не содержащая нуклеаз), как показано в табл. 10, в оптический 96-луночный планшет для реакции количественной ПЦР, чтобы получить конечный объем 20 мкл. Оптический 96-луночный планшет для проведения реакции количественной ПЦР заклеивают оптической клейкой пленкой и кратковременно центрифугируют.

Таблица 9. Мастер-микс qPCR TaqMan

Компонент	Объем в лунке (мкл)	Объем в 96-луночном планшете (мкл)
Вода без нуклеаз	7	700
Зонд TaqMan	1	100
Набор реагентов TaqMan Fast Advanced Master Mix	10	1000
Всего	18	1800

Таблица 10. Получение матрицы кДНК

Компонент	Объем в лунке (мкл)	Объем в 96-луночном планшете (мкл)
кДНК	1	96
Вода без нуклеаз	1	96
Всего	2	192

20 Анализ TaqMan проводят с использованием следующих параметров:

Режим	Цикл	Стадия
2-я стадия амплификации	40	95°C в течение 5 сек
		60°C в течение 30 сек

Зонды TaqMan	Поставщик	Номер в каталоге
IFIT3	Thermo Fisher Scientific	Hs01922752_s1
IFIT1	Thermo Fisher Scientific	Hs03027069_s1
OAS3	Thermo Fisher Scientific	Hs00196324_m1
ISG15	Thermo Fisher Scientific	Hs01921425_s1

1.2 In vivo

1.2.1 Содержание животных

Мышей содержат в особых условиях, свободных от патогенов (условия, соответствующие данным ежегодного исследования здоровья и гигиены 2017 г., предотвращают попадание любых патогенов, перечисленных в списке FELASA) в индивидуально вентилируемых клетках с циркадным световым циклом (свет включен с 7:00 до 19:00). Еда и питьевая вода предоставлялись вволю. После прибытия животным давали не менее 7 дней для акклиматизации до включения в исследование.

1.2.2 Внутритрахеальное введение

Животных анестезируют ингаляцией чистого кислорода, содержащего 4% изофлурана (продукт Isothesia, фирма Henry Shine, Германия). Животных в бессознательном состоянии интубируют катетером 20 размера, укороченным до 37 мм. Испытуемый образец в конечном объеме 50 мкл наносят в виде одной капли на проксимальный конец трубки и таким образом аспирируют во время физиологических дыхательных движений животного. В конце подают 150 мкл воздуха, чтобы убедиться, что внутри катетера не осталось жидкости.

1.2.3 Клиническое обследование

Животных подвергают клиническому обследованию перед нанесением тестируемого вещества и через 24 часа используют клиническую систему подсчета баллов для мышей. Клиническое обследование состоит из 4 различных категорий, которые оценивают по отдельности. Баллы по каждой из 4 категорий суммируют в общую клиническую оценку. Суммарную оценку более 4 баллов или оценку более 1 балла в одной категории считают умеренным страданием и, следовательно, гуманной конечной точкой.

1.2.4 Вскрытие

Животных вводят в полную анестезию путем внутрибрюшинной инъекции фентанила/мидазолама/медетомидина (0,05/5,0/0,5 мг/кг массы тела). Впоследствии мышей умерщвляют смещением шейных позвонков.

1.2.5 Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) и удаление легкого

Грудную и брюшную полости вскрывают и в трахею устанавливают катетер 18G. 0,5 мл ФСБ вводят, извлекают из легких и центрифугируют в режиме 300 g в течение 10 мин при 4°C. Отбирают супернатант и хранят при -80°C до дальнейшей обработки. Осадок из клеток хранят в биобанке при -80°C. Далее легкие эксплантируют и также хранят при -80°C до дальнейшей обработки.

1.2.6 Гомогенизация легких

Образцы гомогенизируют с использованием жидкого азота. Для этого орган помещают в ступку, которую устанавливают в ящик со льдом. Жидкий азот добавляют в объеме, полностью покрывающем легкое. Легкое измельчают в ступке с помощью пестика. Шпатель погружают в жидкий азот и используют для разделения порошка органа на две части. Обе части взвешивают в пустой пробирке, масса которой заранее определена. Ступку, пестик и шпатель очищают этанолом после каждого образца.

Для анализа ELISA лизис проводят в 250 мкл лизирующего буфера Triton X-100 (0,25 М триэтаноламина, 0,1% Triton X-100, pH 7,7), дополненного ингибитором протеазы. Для количественной ПЦР лизис проводят в 350 мкл буфера для лизиса в расчете на 30 мг органа. Лизирующий буфер RLT входит в набор и его дополняют 40 мкл/мл DTT. Для количественной ПЦР проводят дополнительную гомогенизацию в пробирках для лизиса. Соответственно, применяют объемы, как описано выше, и процедуру проводят в течение 3 × 20 сек в гомогенизаторе тканей (гомогенизатор тканей и клеток MP FastPrep-24).

Образцы инкубируют в течение 10 мин на льду и центрифугируют в течение 10 мин при 4 °C в центрифуге Mikro 22R (фирма Hettich Zentrifugen) с максимальной скоростью. Супернатант переносят в новые пробирки и хранят при -80°C до дальнейшего анализа.

1.2.7 Лизис клеток и синтез кДНК для количественной ПЦР

Образцы инкубируют течение 10 мин на льду и центрифугируют в течение 10 мин при 4°C в центрифуге Mikro 22R (фирма Hettich Zentrifugen) с максимальной скоростью. Супернатант переносят в новые пробирки и хранят при -80°C до дальнейшего анализа.

Выделение РНК проводят с использованием набора NucleoSpin® RNA Kit (фирма Macherey & Nagel, номер в каталоге 740984.50) в соответствии с протоколом производителя.

Синтез кДНК проводят с использованием набора для синтеза кДНК

- 5 Transcriptor First Strand (фирма Roche, номер в каталоге 4896866001). В соответствии с протоколом производителя РНК транскрибируют в кДНК. Для двухэтапного синтеза кДНК для подготовки первого этапа требуется 1 мкг тотальной РНК и 1 мкл праймеров OligoDT в общем объеме 13 мкл. Один из примеров приготовления смеси шаблон-грунтовка приведен в табл. 11:

10 Таблица 11. Смесь праймеров для матрицы

Название	Концентрация нуклеиновой кислоты [нг/мкл]	Объем мРНК [мкл]	Праймер OligoDT [мкл]	Вода (без РНКазы) [мкл]
Образец № 1	147,7	6,8	1	5,2
			Общий объем	13

- Стадию денатурации при 65°C в течение 10 мин проводят в термоблочном циклере. После этого все оставшиеся реагенты, кроме ферментов, обратной транскриптазы и ингибитора РНКазы, оттаивают на льду и кратковременно центрифугируют. Для приготовления мастер-микса в свежую пробирку добавляют следующие компоненты, перечисленные в таблице 12:
- 15

Таблица 12. Мастер-микс

Название	1х [мкл]
5х реакционный буфер	4
Ингибитор РНКазы	0,5
Дезоксинуклеозидтрифосфаты (дНТФ)	2
Обратная транскриптаза	0,5
Общий объем [мкл]	7

- Затем к реагентам, перечисленным в табл. 12, добавляют ферменты. Объем мастер-микса адаптируют в соответствии с количеством образцов. В каждую пробирку добавляют по 7 мкл мастер-микса, содержащего смесь матрицы и праймеров, чтобы получить конечный объем 20 мкл на пробирку. Пробирки тщательно перемешивают и кратковременно центрифугируют. Пробирки помещают обратно в термоблочный циклер и запускают следующую программу обратной транскрипции:
- 20
- 25

Стадия в термоблочном цикле	Длительность [мин]	Температура [°C]
Обратная транскрипция	30	55
Денатурация фермента	5	85

До применения кДНК можно хранить при -20 °C.

1.2.8 ПЦР в реальном времени с использованием зондов TaqMan для нижестоящих мишеней см. 1.1.7.

Зонды TaqMan	Фирма	Номер в каталоге
IFIT3	Thermo Fisher	Mm01704846_s1 (ifit3,
IFIT1	Thermo Fisher	mM07295796_m1
OAS3	Thermo Fisher	Mm00460944_m1
ISG15	Thermo Fisher	Mm01705338_s1
IFNλ	Thermo Fisher	Mm00558035_m1

5

1.2.9. кПЦР с использованием UPL для количественного определения SNIM® РНК

Для количественного определения РНК ETH061T02 SNIM в легких мышей проводят количественную ПЦР. Для синтеза кДНК используют 1 мкг РНК IFNλ1 SNIM, и проводят синтез, как описано в разделе 1.1.6. кДНК мРНК IFNλ1 разводят в воде, не содержащей РНКаз, в следующих разведениях: 1:10¹, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶, получая стандартную кривую. Важно, чтобы серия разбавлений кДНК была приготовлена в большем объеме (например, 20 мкл), чтобы избежать неточностей при пипетировании. 0,25 мкл кДНК образцов легких мыши или соответствующих образцов стандартной кривой смешивают с 3,75 мкл воды, свободной от РНКаз, и пипеткой вносят в планшет LightCycler® 480 Multiwell Plate. Приготовление мастер-микса для количественной ПЦР проводят в соответствии с табл. 13.

15

Таблица 13. UPL Master-Mix

Компонент	Объем в лунке (мкл)	Объем в 96-луночном планшете (мкл)
Вода без нуклеаз	0,625	60
Праймер 1 [20 мкМ]	0,150	14,4
Праймер 2 [20 мкМ]	0,150	14,4
Универсальная библиотека зондов (UPL [фонд])	0,075	7,2
Набор Fast Start Essential DNA Probes Master	5	480
Всего	6	576

Мастер-микс добавляют к 4 мкл разбавленного образца или стандарта кДНК в каждую лунку планшета LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 с помощью мультипипетки. Планшет покрывают запечатывающей фольгой LightCycler® 480 и непродолжительно центрифугируют. кПЦР проводят с использованием программы UniversalProbes в системе LightCycler® 96.

Пример 3. Эффективность мРНК, кодирующей IFNλ1, в клетках A-549, экспрессирующих ACE2, по сравнению с рекомбинантным IFNλ1

Активацию нижерасположенной мишени через 48 ч после обработки клеток A549 или A549-ACE2 рекомбинантным IFNλ1 (рис. 8а) или мРНК, кодирующей IFNλ1 (рис. 8б), оценивают с помощью количественной ПЦР для IFIT1, IFIT3, OAS3 и ISG15. В то время как трансфекция мРНК, кодирующей IFNλ1, приводит к сходной индукции IFIT1, IFIT3, OAS3 и ISG15, индукция одних и тех же нижерасположенных мишеней снижена в клетках A549-ACE2 по сравнению с клетками A459 после обработки рекомбинантным IFNλ1. Трансфекция клеток A549-ACE2 с помощью мРНК, кодирующая IFNλ1, приводит к дозозависимому продуцированию IFNλ1 (фиг. 8в).

Пример 4. мРНК, кодирующая IFNλ1, транслируется в клетках различных типов

Трансфекция мРНК, кодирующей IFNλ1, приводит к зависимому от времени и дозы продуцированию IFNλ1 в клетках HEK293, A549, 16HBE14о- и FreeStyle 293-F, которое измеряют с помощью IFNλ1 ELISA (фиг. 9).

Пример 5. Зависимая от времени и дозы индукция нижерасположенных мишеней в клетках A549 и 16HBE14о в погруженной культуре после трансфекции мРНК, кодирующей IFNλ1

Трансфекция мРНК, кодирующей IFNλ1, приводит к зависимой от времени и дозы индукции IFIT1, IFIT3, OAS3 и ISG15 по оценке методом количественной ПЦР (рис. 10 а и б).

Пример 6. Дозозависимая продукция IFN λ 1 и индукция
нижерасположенных мишеней в культурах клеток на границе воздух-жидкость
(ALI – Air-Liquid Interface) A549, 16HBE14o- или первичных клеток легких
человека (Epithelix)

5 Трансфекция мРНК, кодирующей IFN λ 1 в составе LF92, приводит к
дозозависимой продукции IFN λ 1 (фиг. 11a) и индукции IFIT1, IFIT3, OAS3 и
ISG15 по оценке с помощью количественной ПЦР через 24 ч после обработки
(фиг. 11б). Эндогенные уровни IFIT1, IFIT3, OAS3 и ISG15 повышены в
культурах ALI, полученных из 16HBE14o- или первичных клеток легких
10 человека, по сравнению с культурами ALI, полученными из клеток A459 (фиг.
11в).

Пример 7. Дозозависимая продукция IFN λ 1 и индукция
нижерасположенных мишеней в легких мышей, которым имплантировали мРНК,
кодирующую IFN λ 1

15 Доставка мРНК, кодирующей IFN λ 1 в составе LF92, приводит к зависящему
от дозы и времени отложению мРНК IFN λ 1 в легких (фиг. 12a), продукции
IFN λ 1 в легочной ткани и жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) (фиг.
12б), а также к индукции IFIT1, IFIT3, OAS3 и ISG15 по оценке с помощью
количественной ПЦР через 5 и 24 ч после обработки (фиг. 12в).

20 Пример 8. Сравнение трансфекции мРНК hIFN λ 1 с рекомбинантным белком

Повышенная активация гена-мишени после однократной апикальной
трансфекции мРНК, кодирующей hIFN λ 1, культур клеток первичного
бронхиального эпителия на границе воздух-жидкость (ALI) по сравнению с
апикальной обработкой рекомбинантным белком. Ожидается, что из-за
25 базолатеральной экспрессии рецептора ингаляционное (апикальное) введение
мРНК, кодирующей hIFN λ 1, и последующая повышенная базальная, а не
апикальная секреция IFN типа III, будет более эффективной у людей, чем
ингаляционное введение рекомбинантного белка.

Трансфекция мРНК hIFN λ 1 приводит к 30-40 пг общего белка в апикальном
30 компартменте через 24 ч после трансфекции, когда смесь для трансфекции
отсасывают через 6 ч после трансфекции (фиг. 13a). Это соответствует
концентрации 90 нг/мл в жидкости, выстилающей поверхность дыхательных
путей (ASL), при условии, что объем ASL в культурах ALI составляет 0,33 мкл

(0,33 см² площади поверхности вставки x 0,001 см высоты слоя ресничек). По этой причине активацию целевого гена после трансфекции сравнивают с обработкой 100 нг/мл рекомбинантного белка.

После трансфекции апикальной мРНК экспрессия гена-мишени была в 4
5 раза выше по сравнению с контролем Stop-мРНК (фиг. 13б). Напротив, после апикального введения рекомбинантного белка hIFN λ 1 в концентрации 100 нг/мл индукция гена-мишени ниже по сравнению с трансфекцией мРНК и не превышает 2-кратной индукции по сравнению с контролем Stop-мРНК (фиг. 13б). Этот эффект может быть обусловлен более длительным воздействием
10 hIFN λ после трансфекции мРНК (трансляция мРНК продолжается после замены среды через 6 ч) и, следовательно, потенциальным накоплением и, соответственно, более высоким уровнем белка в апикальных и базальных компартментах по сравнению с обработкой рекомбинантным белком. Эти наблюдения подчеркивают потенциал дополнительного ФК/ФД преимущества от
15 обработки с помощью мРНК по сравнению с обработкой рекомбинантным белком (фиг. 13).

Пример 9. Определение hIFN λ методом ELISA из супернатантов трансфицированных клеток A-549: сравнение LF92 с имеющимся в продаже реагентом для трансфекции

20 Через 6 и 24 ч после трансфекции среду заменяют в каждой чашке из числа тех, которые не собирали в эти моменты времени. Следовательно, 24-часовой момент времени отражает трансляцию между 6 и 24 ч, а 48- и 72-часовые моменты времени отражают трансляцию после 24 ч. Трансляция после трансфекции мРНК происходит в зависимости от дозы и времени и схожа с
25 эффектом мРНК в составе LF92, как и при использовании коммерческого реагента для трансфекции (фиг. 14).

Пример 10. Индукция целевого гена с помощью мРНК в составе LF92

Через 6 и 24 ч после трансфекции среду заменяют в каждой чашке, которую не собирали в эти моменты времени. Следовательно, 24-часовой момент времени
30 отражает трансляцию между 6 и 24 ч, а 48- и 72-часовые моменты времени отражают трансляцию после 24 ч. Наблюдают дозозависимую и устойчивую активацию гена-мишени hIFN λ 1 после однократной трансфекции клеток легкого A549 мРНК, кодирующей hIFN λ 1, в составе LF92 (фиг. 15).

Пример 11. Переносимость *in vitro* мРНК, кодирующей hIFN λ 1, в составе LF92

Через 6 и 24 часа после трансфекции среду заменяют в каждой чашке, которую не собирали в эти моменты времени. Следовательно, 24-часовой момент времени отражает трансляцию между 6 и 24 ч, а 48- и 72-часовые моменты времени отражают трансляцию после 24 часов. Индукцию экспрессии мРНК цитокинов после однократной трансфекции клеток легкого A549 мРНК, кодирующей hIFN λ 1, в составе LF92 наблюдают только при высоких дозах, связанных с плато индукции гена-мишени (фиг. 16).

Пример 12. Корреляция трансляции мРНК и индукции генов-мишеней

Через 6 и 24 часа после трансфекции среду заменяют в каждой чашке, которую не собирали в эти моменты времени. Следовательно, 24-часовой момент времени отражает трансляцию между 6 и 24 ч, а 48- и 72-часовые моменты времени отражают трансляцию после 24 ч. Количество hIFN λ 1, измеренное в супернатанте, коррелирует со степенью индукции гена-мишени (фиг. 17).

Пример 13. Ингибирование вируса *in vitro*, оцененное с помощью количественной ПЦР

Профилактическое лечение с помощью мРНК hIFN λ 1 снижает вирусную нагрузку SARS-CoV-2 и IAV, в то время как мРНК Stop не снижает (фиг. 18). Наблюдают дозозависимое снижение вирусной нагрузки при использовании рекомбинантного hIFN λ 1, но оно ниже при использовании рекомбинантного белка по сравнению с обработкой мРНК (фиг. 18). Лечение проводили за 24 ч до инфицирования. Образцы брали через 48 ч после инфицирования.

Ингибирование вируса *in vitro*, оцениваемое с помощью количественной ПЦР

Профилактическая обработка мРНК hIFN λ 1 снижает вирусную нагрузку SARS-CoV-2 и IAV, в то время как мРНК Stop не снижает (фиг. 18). Наблюдают дозозависимое снижение вирусной нагрузки при действии рекомбинантного hIFN λ 1, но оно ниже при использовании рекомбинантного белка по сравнению с обработкой мРНК (фиг. 18). Обработку проводят за 24 ч до заражения. Образцы берут через 48 ч после заражения.

Пример 14. Обнаружение мРНК hIFN λ 1 в гомогенате легких

Дозозависимое отложение мРНК, кодирующей IFN λ 1 человека, наблюдают через 5 ч после однократного назального введения мышам (фиг. 19). Оценивают по трем животным в группе.

5 Пример 15. Обнаружение белка hIFN λ 1 в гомогенате легких

Количественное определение IFN λ 1 человека в гомогенате легких выявляет зависящую от дозы и времени трансляцию белка при однократном интраназальном введении мРНК, кодирующей белок IFN λ 1 человека (фиг. 20). Оценивают по трем животным в группе.

10 Пример 16. Активация гена-мишени в ткани легкого после применения мРНК hIFN λ 1

Применение мРНК hIFN λ 1 хорошо переносится и сильно индуцирует экспрессию гена-мишени в легких при низких дозах после однократного назального введения мышам (фиг. 21).

15 Проанализированные гены-мишени OAS3, ISG15, IFIT1 и IFIT3 проявляют дозозависимую активацию для всех уровней доз через 5 ч (фиг. 21). Только OAS3 показывает дозозависимую активацию в течение 24 ч после применения (рис. 21г). Оценивают по трем животным в группе.

20 Пример 17. Обнаружение хемокинов в плазме после однократного назального введения мРНК hIFN λ 1

Нет изменений концентраций измеряемых хемокинов в плазме после однократного назального введения мРНК, кодирующей hIFN λ 1, или мРНК STOP по сравнению с разбавителем при всех уровнях доз у мышей (фиг. 22). Оценивают по трем животным в группе.

25 Пример 18. Активация гена-мишени в ткани легкого при обработке мРНК hIFN λ 1

мРНК hIFN λ в составе LF92 хорошо переносится и сильно индуцирует экспрессию легочного гена-мишени при низкой дозе после многократного назального введения мышам (фиг. 23).

30 Вводят три дозы с интервалом в 48 ч, и образцы собирают через 24 ч после последнего применения. Экспрессия генов-мишеней hIFN λ в гомогенатах легких увеличивается дозозависимым образом (фиг. 23). До 15-кратной активации всех проанализированных генов-мишеней наблюдают при уровне дозы 1 мкг мРНК

hIFN λ (фиг. 23). Отсутствие активации целевого гена в группах применения STOP и разбавителя позволяет предположить, что наблюдаемый эффект индуцируется мишенью (фиг. 23). Оценивают по шести животным в группе.

Пример 19. Обнаружение мРНК hIFN λ 1, отложенной в легких у мышей после назального применения

Вводят три дозы с интервалами 48 ч, и собирают образцы через 24 ч после последнего применения. Наблюдают дозозависимое отложение мРНК, кодирующей IFN λ 1 человека (фиг. 24). Оценивают по шести животным в группе.

Пример 20. Масса тела при повторном введении мРНК hIFN λ 1

Три дозы с 48-часовыми интервалами вводят мышам путем назального введения и ежедневно измеряют массу тела. Изменений массы тела не было зарегистрировано (фиг. 25). Оценивают по шести животным в группе.

Пример 21. Количественное определение мРНК hIFN λ 1 в гомогенате легких хорька

мРНК hIFN λ 1 откладывается во всех долях легких хорька после однократного назального введения (фиг. 26). Оценивают по трем животным в группе.

Пример 22. Активация гена-мишени в гомогенате легких хорька

Лечение hIFN λ 1 приводит к индукции ISG15, MX1 и OAS3 после однократного назального введения хорьку (фиг. 27). Оценивают по трем животным в группе.

Пример 23. Количественное определение мРНК IFN, активации целевого гена и индукции цитокинов в гомогенате легких хорька

Однократное назальное введение мРНК, кодирующих hIFN λ 1, hIFN β или оба этих интерферона, приводит к отложению мРНК во всех долях легкого (фиг. 28). Мх-1 индуцируется всеми тремя обработками, в то время как ни один из анализируемых цитокинов не индуцируется (фиг. 28). Оценивают по трем животным в группе.

Пример 24. Снижение репликации вируса гриппа А (IAV) с помощью мРНК, кодирующих интерфероны

Интраназальное введение мРНК, кодирующей hIFN λ 1 (фиг. 29а), hIFN β (фиг. 29б) или оба интерферона (фиг. 29в), хорошо переносится и снижает раннюю репликацию вируса и клинические симптомы в модели гриппа на

хорьках (фиг. 29). Обработку проводят в дни исследования -1, 1 и 3, а заражение проводят в день 0. Оценивают по десяти животным в группе.

Пример 25. Снижение репликации SARS-CoV2 с помощью мРНК, кодирующей hIFN λ 1

5 Интраназальное введение мРНК, кодирующей hIFN λ 1, хорошо переносится и снижает репликацию вируса и массу тела в модели мыши hACE2-TG, зараженной SARS-CoV-2 альфа, по сравнению с животными, получавшими разбавитель (фиг. 30). Вирусную репликацию оценивают путем измерения геномной вирусной РНК с помощью количественной ПЦР реального времени (RT-qPCR) (снижение на 60% по сравнению с разбавителем) (фиг. 30а) и путем определения инфекционных вирусных частиц с использованием метода TCID₅₀ (снижение на 97% по сравнению с разбавителем) (фиг. 30б). Масса тела показана как процентное изменение массы на 3-й день после заражения вирусом (фиг. 30в). Оценивают от двух до пяти животных в группе. Используют следующие

10

15

контроли: имитация обработки; мРНК hIFN λ 1, но без вируса; и мыши, обработанные носителем, но без вируса.

В примерах 8-25 применяют следующие материалы.

2.1 Материалы

Материал	Фирма	Номер в каталоге
Биополимер QIAshredder	Qiagen	79656
Набор RNeasy Mini Kit	Qiagen	74104
Раствор DL-дителиотрита (Dithiothreitol; DTT)	Sigma-Aldrich	646563-10X.5ML
Набор для синтеза кДНК первой цепи транскриптора	Roche	4896866001
Набор для ELISA IL-29 человека (IFN λ 1)	Abcam	ab100568
ФСТ, инактивированная нагреванием	Thermo Fisher Scientific	10500064
MEM с GlutaMAX™	Gibco	41090-028
Липофектами MMax	Thermo Fisher Scientific	LMRNA008
Набор для лизиса клеток SingleShot™	BioRad	1725080
Набор для синтеза кДНК iScript™	BioRad	1708897
DMEM	Sigma	D6429
DPBS 1x без Ca и Mg	Thermo Fisher Scientific	Gibco 14190-250
ФБС	Sigma	F7524
Пенициллин-стрептомицин	Sigma	P4333
Рекомбинантный hIFN λ 1	Abcam	ab155625
Карбоксиметилцеллюлоза	Sigma	SAFS21904-250G
Кристаллический фиолетовый	Carl Roth GmbH	T123.1
Реакционная смесь Fast Start Essential DNA Probes Master	Roche	06402682001

Изофлуран	Isothesia, Henry Shine	1311758
96-луночные планшеты для проведения ПЦР в реальном времени LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, белые; 50 планшетов с фольгой в упаковке	Roche	4729692001
Пробирки с лизирующей матрицей D (Lysing Matrix D)	MP Biomedicals	6913500
Смесь TaqMan™ Fast Advanced Master Mix	Thermo Fischer	4444557
ПЦР-планшет Twin.tec PCR Plate96, unskirted, low profile, farblos VE:20	Omnilab	5425895
Казеин	Thermo Fisher Scientific	37528
Набор реагентов Mouse CXCL9/MIG DuoSet ELISA, 15 пластин	R&D System	DY572
Набор реагентов Mouse CXCL10/IP-10/CRG-2 DuoSet ELISA, 15 пластин	R&D System	DY466
Набор реагентов Mouse CXCL11/I-TAC DuoSet ELISA, 15 пластин	R&D System	DY492
10X ФСБ	Roche	11666789001
Набор реагентов Custom Premix Mouse Cyto/Chemokine MAG09	Merck	MCYTOMAG-70K-09C
Tween-20	Carl Roth	9127.1

Устройство	Производитель	Номер в каталоге
96-луночный планшет для культуры клеток	Corning	Costar 3599
96-луночный планшет для хранения	Corning	Costar 3363
Счетчик клеток Countess	Thermo Fisher Scientific	C10281
Камера для подсчета клеток Countess Cell Counting chamber slides	Thermo Fisher Scientific	C10283
Система прижизненного анализа клеток IncuCyte	Sartorius	Incucyte S3
ДНК-анализатор Light Cycler®96	Roche	Light Cycler®96
Ридер для микропланшетов	Tecan	Infinite M200 Pro
Шейкер для микропланшетов	Heidolph	Titramax
Гомогенизатор тканей и клеток	MP Biomedicals	MP FastPrep-24
Мультиплексная платформа Magpix	Luminex	MAGPX14184703

2.2 Методы

2.2.1 Культуры клеток

2.2.1.1 Культуры ALI

Вставки MucilAir™ приобретают у фирмы Epithelix и культивируют в 700 мкл культуральной среды MucilAir™ при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂ в качестве культур на границе сред воздух-жидкость (ALI – Air-Liquid-Interface).

Перед трансфекцией клетки оставляют в покое на 2-3 дня после приобретения. Для поддержания культуры среду заменяют каждые 2-3 дня.

2.2.1.2 Культура клеток A-549

Клетки культивируют как описано выше в разделе 2.1.

5 2.2.1.3 Культура клеток A549-ACE2

Клетки A549-ACE2 культивируют в DMEM с 10% ФСБ, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 МЕ/мл пенициллина. 10000 клеток высевает в 96-луночные планшеты общим объемом 100 мкл за 24 ч до обработки.

2.2.2 Трансфекция/обработка

10 Перед трансфекцией проводят отмывание слизи. Для этого к апикальной стороне добавляют 200 мкл ФСБ (без Mg/Ca) и инкубируют в течение 20 мин при 37°C. Общее время апикальной промывки не должно превышать 30 мин. Для удаления слизи с апикальной поверхности выполняли три движения вперед-назад пипеткой P200 со 100 мкл апикальной жидкости. ФСБ с апикальной
15 поверхности культуры ALI удаляют осторожной аспирацией, не повреждая эпителий. Для удаления следов ФСБ осуществляют промывку 200 мкл воды для инъекций.

Затем клетки трансфицируют/обрабатывают требуемой дозой. Составы размораживают при комнатной температуре и хранят на льду до дальнейшего
20 использования. Рекомбинантный белок разводят в среде.

Удаляют мРНК и рекомбинантный белок с апикальной стороны через 6 ч после трансфекции. В случае рекомбинантного белка также обновляют базальную среду. Через 24 ч после трансфекции апикальную сторону вставок промывают с использованием 200 мкл ФСБ, который пипетируют вверх и вниз
25 три раза. Промывочный раствор собирают в 96-луночный планшет для хранения с целью последующего анализа ELISA. Также в планшет для хранения собирают 200 мкл базальной среды. Образцы хранят при -80°C до проведения ELISA.

Для количественной ПЦР на вставку добавляли 175 мкл буфера RLT из набора RNeasy Mini Kit, дополненного DTT (40 мкл/мл). С помощью мини-скребка клетки отделяли от вставки. Буфер RLT переносят в колонку QIAshredder. Чтобы обеспечить перенос всех клеток, вставку промывают еще 175 мкл буфера RLT. Для завершения лизиса клеток колонку центрифугируют в течение 2,5 мин на максимальной скорости. Колонку удаляют, и клеточные
30

лизаты в пробирке можно заморозить при -80°C или сразу использовать для выделения РНК.

2.2.2.1 Трансфекция с использованием Lipofectamine MMax в примерах 9-12

5 Трансфекцию с использованием Lipofectamine MMax проводят, как описано в разделе 2.3 выше, за исключением того, что выполняют титрование дозы в диапазоне от 0,005 до 100 нг мРНК/лунку, а затем в соответствующие лунки добавляют 25 мкл раствора Lipoplex, в котором среду заменяют 100 мкл свежей полноценной среды.

2.2.2.2 Трансфекция с использованием Lipofectamine MMax в примере 13

10 Трансфекцию с использованием Lipofectamine MMax проводят, как описано в разделе 2.3 выше, за исключением того, что выполняют титрование дозы в диапазоне от 15 нг/25 мкл до желаемой концентрации. Среду клеток заменяют 100 мкл новой среды.

Затем в соответствующие лунки добавляют по 25 мкл раствора Lipoplex.

15 Для обработки рекомбинантным белком белки предварительно разводят в среде и добавляют к клеткам по 25 мкл в необходимых концентрациях.

2.2.2.3 Трансфекция с использованием мРНК в составе LF92

мРНК в составе LF92 разводят в растворителе (10% (масса/объем) сахарозы, 50 мМ NaCl и запатентованный эксципиент) до желаемых
20 концентраций. В соответствующие лунки добавляют по 25 мкл каждого разведения, в которых среду заменяют на 100 мкл свежей полноценной среды.

2.2.3 Выделение РНК

Выделение РНК осуществляют как описано выше в разделе 1.1.5.2.

2.2.5 кПЦР с применением зондов TaqMan

25 кПЦР с использованием зондов TaqMan выполняют как описано в разделе 1.1.7 выше. Анализ результатов количественной ПЦР проводят методом $\Delta\Delta\text{Ct}$. Для этого сначала рассчитывают значение ΔCt каждого образца. Это делают путем вычитания среднего значения Ct гена домашнего хозяйства (гена RPLP0) из значения целевого Ct . Затем рассчитывают $\Delta\Delta\text{Ct}$ путем вычитания среднего ΔCt эталонных образцов (контроль разбавителя) из целевого ΔCt . Наконец, кратность изменения рассчитывают по формуле: $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

30

2.2.6 hIFN λ 1 ELISA (IL-29 ELISA)

ELISA hIFN λ 1 выполняют, как описано в разделе 1.1.4, выше.

Интерполяцию проводят с использованием стандартной кривой 4PL. Анализ выполнен с помощью программного обеспечения GraphPad Prism и Excel.

5 2.2.7 Сбор материала

Сбор материала проводят через 3, 6, 24, 48 и 72 ч после трансфекции. Для каждого планшета проводят замену среды через 6 и 24 ч после трансфекции.

Для метода ELISA супернатант клеток собирают в 96-луночный планшет для хранения и замораживают при -80°C. Поскольку проводят два разных
10 ELISA, супернатанты разделяют на два планшета, чтобы обеспечить возможность отдельного оттаивания. Для количественной ПЦР клетки промывают, используя 150 мкл ФСБ/-, и клетки замораживают без жидкости при -80°C.

15 2.2.8 Выделение РНК с использованием набора для лизиса клеток SingleShot™ Cell Lysis Kit

Выделение РНК с использованием набора для лизиса клеток SingleShot™ проводят, как описано в разделе 2.2.5.

2.2.9 Получение концентратов вирусов

Штаммы SARS-CoV-2-MUC-IMB-1, SARS-CoV-2-GFP, вируса гриппа А
20 дикого типа (IAV-WT) (SC35M) и IAV (SC35M) NS1-GFP получают путем инфицирования культивируемых клеток Vero E6 в среде DMEM (ФБС 10%, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 МЕ/мл пенициллина) в течение 2 дней (множественность заражения 0,01). Вирусный материал собирают и центрифугируют дважды (1000 г/10 мин) перед хранением при -80°C.

25 Титр вирусного концентрата определяют по анализу бляшек. Для этого конфлюэнтные монослои клеток Vero E6 инфицируют серийными пятикратными разведениями супернатантов вируса в течение 1 ч при 37°C. Инокулят удаляют и заменяют средой MEM без сыворотки, содержащей 0,5% карбоксиметилцеллюлозы. Через двое суток после инфицирования клетки
30 фиксируют в течение 20 мин при комнатной температуре с непосредственным добавлением формальдегида в среду до конечной концентрации 5%.

Фиксированные клетки тщательно промывают ФСБ перед окрашиванием водным раствором, содержащим 1% кристаллического фиолетового и 10%

этанола, в течение 20 мин. После промывки ФСБ подсчитывают количество бляшек и рассчитывают титр вируса.

2.2.10 Инфицирование вирусами

5 Клетки инфицируют через 24 ч после трансфекции SARS-CoV-2 (множественность заражения 3) или IAV (множественность заражения 0,5). Вирус добавляют в 25 мкл среды непосредственно в культуру клеток. Для анализа кинетики инфекции в системе живой визуализации используют SARS-CoV-2-GFP и IAVGFP.

2.2.11 Мониторинг клеток в IncuCyte

10 После инфицирования планшеты помещают в систему анализа живых клеток IncuCyte S3, где каждые 4 ч в течение 48 ч в режиме реального времени фиксируют полное изображение лунок, как ложных (фазовый канал), так и инфицированных (GFP и фазовый канал) клеток. Жизнеспособность клеток в лунках (ложных) и рост вируса (ложных и инфицированных) оценивают по слиянию клеток в лунках (площадь фазы) и интегрированной интенсивности зеленого флуоресцентного белка (GFP – green fluorescent protein),

15 нормализованной по слиянию клеток на лунку (интегральная интенсивность GFP/площадь фазы), соответственно, с использованием программного обеспечения IncuCyte S3 (фирма Essen Bioscience; версия 2019B Rev2).

2.2.12 кПЦР для мРНК SARS-CoV-2 и IAV

20 Для относительного количественного определения транскриптов используют реактив PowerUp SYBR Green. Все этапы выполняют в соответствии с инструкциями производителя. RPLP0 используют в качестве гена домашнего хозяйства.

2.2.13 Содержание животных

25 Всех животных содержат, как описано в разделе 1.2.1 выше. Все процедуры одобрены местными органами по защите животных (*Regierung von Oberbayern*) под номером Az. 2532.Vet_03-17-114 и проводятся в соответствии с немецким законом о защите животных (*Tierschutzgesetz*).

2.2.14 Назальное введение в примерах 14-17

30 Животных анестезируют ингаляцией чистого кислорода со скоростью потока 2 л/мин с добавлением примерно 4% анестезирующего газа изофлурана в ингаляционной камере. мРНК hIFN λ 1 наносят двумя болюсами по 25 мкл с

помощью лабораторной пипетки в оба носовых отверстия, чтобы жидкость активно вдыхалась через нос животным во время физиологического вдоха. Во время этой процедуры животное удерживают в перпендикулярном положении, а затем помещают в лежачее положение до выхода из наркоза.

5 2.2.15 Клиническое обследование в примерах 14-17

Клиническое обследование проводят как описано в разделе 1.2.3 выше, за исключением того, что животных осматривают клинически до и через 5 ч после лечения, а также ежедневно до дня вскрытия. Кроме того, перед применением и ежедневно до последнего дня эксперимента измеряют массу тела.

10 2.2.16 Вскрытие

Запланированные сроки вскрытия установлены через 5, 24 или 48 ч после нанесения, соответственно. В A01 дополнительно проводят вскрытие в 72 ч. В A02, группа 2, проводят дополнительные вскрытия через 72 и 96 ч после нанесения мРНК hIFN λ 1. Животных вводят в полную анестезию путем
15 внутрибрюшинной инъекции фентанила/мидазолама/медетомидина (0,05/5,0/0,5 мг/кг массы тела). Капиллярную кровь берут из ретробульбарных венозных сплетений с помощью негепаринизированных капилляров диаметром 0,8 мм и собирают в пробирки с ЭДТА. Образцы крови центрифугируют в режиме 2000 g в течение 5 мин при 4°C. Впоследствии мышей умерщвляют смещением шейных
20 позвонков.

Грудную и брюшную полости вскрывают, легкое эксплантируют непромытым *in toto*, быстро замораживают на сухом льду и хранят при -80°C до дальнейшей обработки.

2.2.17 Гомогенизация легкого

25 2.2.17.1

Образцы гомогенизируют с использованием жидкого азота. Поэтому орган переносят в ступку, которую помещают в ящик со льдом. Жидкий азот добавляют в объеме, полностью покрывающем легкое. Легкое измельчают в ступке пестиком. Всегда следят за тем, чтобы орган был покрыт жидким азотом.
30 Шпатель погружают в азот и используют для разделения порошка измельченного органа на три части. Порошок органа помещают в пустую и тарированную пробирку эппендорф. Около 5 мг порошка берут для анализа методом разветвленной ДНК-гибридизации, а оставшийся порошок разделяют на

две половины, одну для ELISA, одну для количественной ПЦР. Вес каждого органа регистрируют.

Ступку, пестик и шпатель очищают этанолом после каждого образца.

2.2.17.2

5 Для метода ELISA для лизиса используют лизирующий буфер Triton X-100 (0,25 М триэтаноламина, 0,1% Triton X-100, pH 7,7). Лизис проводят на льду в течение не менее 10 мин. После каждого 6-го образца лизаты центрифугируют в режиме 14000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант собирают в свежую пробирку и хранят при -80°C до последующей обработки.

10 2.2.17.3

Для количественной ПЦР в пробирку, содержащую порошок органа, добавляют 600 мкл буфера для лизиса. Буфер для лизиса RLT входил в комплект и дополняется 40 мкл/мл DTT. Затем раствор переносят в пробирку Lysing Matrix D и проводят гомогенизацию трижды по 20 сек в гомогенизаторе тканей.

15 Лизат переносят в свежую пробирку эппендорф. Рассчитывают объем гомогената, который соответствует 10 мг легкого, переносят в свежую пробирку эппендорф и смешивают с использованием буфера для лизиса до конечного объема 350 мкл. Эти образцы используют непосредственно для выделения РНК без замораживания. Оставшиеся гомогенаты легких хранят при -80°C.

20 2.2.18 Выделение РНК и синтез кДНК для количественной ПЦР в примерах 14-17 и 18-20.

Выделение РНК из лизатов легких проводят с использованием 10 мг лизированного гомогената легких и мини-набора RNeasy mini kit от фирмы Qiagen в соответствии с протоколом производителя.

25 Синтез кДНК проводят, как описано в разделе 1.1.6.1, выше. Для двухэтапного синтеза кДНК 1 мкг суммарной РНК и 1 мкл праймеров OligoDT в общем объеме 13 мкл используют для приготовления первого этапа, который в настоящем описании называется смесью матричных праймеров.

30 2.2.19 Получение стандартной кривой для количественного определения мРНК hIFN λ 1

Для точного расчета в образцах количества мРНК, кодирующей IFN λ 1 человека, необходима стандартная кривая. Соответственно, 1 мкг мРНК hIFN λ 1 был взят. Затем производят следующие серийные разведения кДНК в воде, не

содержащей нуклеаз: $1:10^1$, $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$, $1:10^6$, $1:10^7$. Разведения готовят по отдельности. Это означает, что, например, разведение $1:10^2$ готовят не из разведения $1:10^1$, используемого в анализе, а из отдельного разведения $1:10^1$. Из каждого разведения 2 мкл добавляют к 8 мкл мастер-микса для проведения количественной ПЦР.

2.2.20 кПЦР с применением зондов UPL

Для количественного определения мРНК, кодирующей IFN λ 1 человека, включая стандартную кривую, используют зонд универсальной библиотеки зондов (UPL – universal probe library).

Следующие компоненты, показанные в табл. 14, объединяют и быстро взбалтывают. Для доведения реакционной смеси до дна пробирки и удаления пузырьков воздуха смесь кратковременно центрифугируют в режиме 3200 g в течение 2 мин.

8 мкл мастер-микс TaqMan переносят в оптический 96-луночный планшет для реакции количественной ПЦР. 2 мкл матрицы кДНК добавляют в оптический 96-луночный планшет для реакции количественной ПЦР до получения конечного объема 10 мкл. Оптический 96-луночный планшет для реакции количественной ПЦР заклеивают оптической клейкой пленкой и кратковременно центрифугируют в режиме 3200 g в течение 2 мин.

Выбирают режим «новый эксперимент на основе матрицы Roche» и «HydrolysisProbes» на LightCycler96.

Таблица 14. Мастер-микс qPCR UPL

Компонент	Объем в лунке [мкл]
Вода без нуклеаз	2,625
Праймер 1 [20 мкМ]	0,150
Праймер 2 [20 мкМ]	0,150
Универсальная библиотека зондов (UPL [фонд])	0,075
Набор Fast Start Essential DNA Probes Master	5
Всего	8

2.2.21 Расчет содержания мРНК hIFN λ 1

Количество в образце мРНК, кодирующей IFN λ 1 человека, можно определить с помощью стандартной кривой. Стандартную кривую строят, помещая $\log(\text{количество мРНК hIFN}\lambda 1)$ на ось x и значения ct на ось y от стандартной кривой.

Пример уравнения по стандартной кривой:

$$Y = -3,2449X + 9,1445$$

Исходя из этого, определяют количество мРНК IFNλ1 в образце (X: логарифм концентрации) (Y: значение ст образца).

5 Таблица 15. Пример расчета общего количества мРНК IFNλ1 на легкое

Образцы	Масса легкого (мг)	Величина Ct	Log (измеренная мРНК IFNλ1 [нг]) = X	Измеренная мРНК IFNλ1 [пг]	мРНК IFNλ1 в 30 мг ткани легкого [пг]	Общее количество мРНК IFNλ1 в легком [пг]
Образец 1	360,8	18,25	-2,81	1,56	78,14	939,77
Образец 2	270,9	16,75	-2,34	4,53	226,54	2045,62

2.2.22 CXCL9 и CXCL10 ELISA в плазме

Образцы плазмы в настоящем исследовании измеряют в соответствии с инструкциями производителя. Изменения в протоколе можно найти в таблице 16.

10

Таблица 16. Параметры протоколов ELISA CXCL9+10 в плазме, не включенные в инструкции производителя.

Тип образца	Цитокин	Блокирующий раствор	Разбавитель для антител и образцов	Время для ТМБ	Разведение образца	LLOQ
Плазма	CXCL9	Казеин	0.05% Tween-20 in 1x PBS	16 мин	1:2	40 пг/мл
	CXCL10	1% БСА в 1x ФСБ	1% БСА в 1x ФСБ	25 мин	1:20	100 пг/мл

2.2.23 ELISA CXCL9 и CXCL11 гомогената легких

Гомогенаты легких в этом исследовании измеряют в соответствии с инструкциями производителя. Изменения в протоколе можно найти в табл. 17.

15

Таблица 17. Параметры протоколов ELISA CXCL9-11 в плазме, которые не включены в инструкции производителя.

Тип образца	Цитокин	Блокирующий раствор	Разбавитель для антител и образцов	Время для ТМБ	Разведение образца	LLOQ
Гомогенат легких	CXCL9	Казеин	0.05% Tween-20 в 1x ФСБ	16 мин	1:50	100 пг/мл
	CXCL11	Казеин	0.05% Tween-20 в 1x ФСБ	16 мин	1:30	120 пг/мл

2.2.24 Интраназальное применение в примерах 18-20

Животных анестезируют ингаляцией чистого кислорода со скоростью потока 2 л/мин с добавлением примерно 3% анестезирующего газа изофлурана в ингаляционной камере. мРНК hIFN λ 1 наносят в объеме 50 мкл на кончик носа в виде одной капли и затем животные активно вдыхают препарат через обе ноздри во время следующего физиологического вдоха. Во время этой процедуры животное удерживают в перпендикулярном положении, а затем помещают в положение лежа на спине до выхода из наркоза. Обработку проводят через день, всего 3 введения препарата. Вскрытие проводили через 24 ч после последнего введения.

2.2.25 Клиническое обследование в примерах 18-20

Клиническое обследование проводят, как описано в разделе 1.2.3 выше, за исключением того, что животных осматривают клинически до и через 3 ч после первой обработки, а затем ежедневно до дня вскрытия. Кроме того, перед применением и ежедневно до последнего дня эксперимента измеряют массу тела.

2.2.26 Вскрытие в примерах 18-20

Животным вводят полную анестезию путем внутрибрюшинной инъекции фентанила/мидазолама/медетомидина (0,05/5,0/0,5 мг/кг массы тела).

Капиллярную кровь берут из ретробульбарных венозных сплетений с помощью негепаринизированных капилляров диаметром 0,8 мм и собирают в пробирки с ЭДТА. Затем мышей умерщвляют смещением шейных позвонков. Вскрывают грудную и брюшную полость и полностью эксплантируют легкое без промывания.

Правый главный бронх перевязывают, правое легкое эксплантируют, быстро замораживают на сухом льду и хранят при -80°C до дальнейшей обработки. В левое легкое вводят 0,4 мл фиксатора (4% раствор параформальдегида) через трахею. Затем левый бронх перевязывают и инсуффлированное левое легкое, включая трахею, переводят в 4% раствор параформальдегида для диффузионной фиксации в течение примерно 24 ч. По истечении времени фиксации образцы легких переносят в 70% этанол.

2.2.27 Получение плазмы

Образцы крови с ЭДТА центрифугируют в режиме 2000 x g в течение 5 мин при 4°C. Супернатант замораживают на сухом льду и впоследствии хранят при -80°C до дальнейшей обработки.

5 2.2.28 Гомогенизация легких в примерах 18-20

Гомогенизацию легких выполняли, как описано в разделе 2.2.17.3 выше.

2.2.29 Тест-система в примерах 21-24

Вид: *Mustela putorius* (хорек)

Порода: соболь

10 Поставщик: фирма Triple F Farms (Джиллет, Пенсильвания)

Хорькам в возрасте от 20 до 24 недель вводят дозы мРНК hIFN в составе LF92. В примере 24 хорькам пять месяцев на момент введения дозы мРНК hIFN в составе LF92. Животные весят от 0,7 кг до 1,1 кг за день до введения дозы (день -1). Каждое животное идентифицируют постоянной уникальной ушной биркой в NLS после получения животного.

15

2.2.30 Система контроля содержания животных в примерах 21-24

Акклиматизацию животных проводят в течение 10-12 дней до начала исследования. В течение периода акклиматизации технический персонал ежедневно оценивает состояние здоровья животных на наличие клинических проявлений и поведенческих признаков, указывающих на нормальное состояние или болезнь. Животных содержат группами по три особи в клетках из нержавеющей стали с проволочным дном во время акклиматизации и на протяжении всей фазы исследования.

20

2.2.31 Пробное дозирование в примерах 21-23

25 Животным вводят 1 мл мРНК hIFN в составе LF92 путем назальной инстилляцией с помощью пипетки (0,5 мл/ноздрю). IFN λ 1 человека или Stop-мРНК в составе LF92 применяют в концентрации мРНК 0,07 мг/мл. В примере 23 применяют концентрацию мРНК 1,25 мг/мл, что приводит к общей концентрации мРНК 2,5 мг/мл в случае комбинации IFN λ 1 человека и IFN β человека.

30

2.2.32 Пробное дозирование в примере 24

В дни исследования -1, 1 и 3 животным вводят мРНК hIFN в составе LF92 путем назальной инстилляцией с помощью пипетки (0,5 мл/ноздрю раствора

0,125 или 0,25 мг/мл). мРНК в составе LF92, кодирующую IFN λ 1 человека, IFN β человека или их комбинацию, применяют в концентрации мРНК 1,25 мг/мл, что приводит к общей концентрации мРНК 2,5 мг/мл в случае комбинации.

Разбавитель применяют в качестве контроля.

- 5 В 0-й день исследования животных всех групп заражают инстилляцией в нос 1 мл только что разбавленного вируса H1N1 A/California/04/09 до титра 2×10^2 TCID₅₀/мл. Титр вируса дополнительно подтверждают в тот же день (обратное титрование).

2.2.33 Аутопсия в примерах 21-23

- 10 Всех животных подвергают эвтаназии гуманным способом под сильным седативным действием через 6 ч после введения дозы. Образцы легочной ткани собирают из верхней, средней и нижней областей верхней левой (левая краниальная), верхней правой (правая краниальная), нижней левой (левая каудальная) и нижней правой (правая каудальная) долей легких. Образцы ткани
- 15 взвешивают, разрезают на 3 части и помещают в криопробирки, содержащие 1 мл раствора для стабилизации РНК (RNAlater), и хранят при 4°C в течение ночи, чтобы позволить RNAlater проникнуть в ткань. Раствор RNAlater удаляют из пробирок, а ткани немедленно замораживают и хранят при -80°C до отправки в ethris.

2.2.34 Гомогенизация легких в примерах 21-23

- 20 600 мкл лизирующего буфера добавляют в пробирки Lysing D и хранят на льду. Буфер для лизиса RLT входил в комплект и дополняется 40 мкл/мл DTT. Замороженный орган взвешивают и в зависимости от веса переносят в одну лизирующую пробирку или разрезают на части и переносят в несколько
- 25 лизирующих пробирок. Определено, что 300-350 мг в 600 мкл лизирующего буфера представляют собой максимальное количество ткани и объем лизирующего буфера для одной лизирующей пробирки. При дальнейшей обработке образцов органы в лизирующем буфере хранят на льду.
- 30 Гомогенизацию проводят трижды по 20 сек в гомогенизаторе тканей. Лизаты затем центрифугируют в течение 3 мин при максимальной скорости (14000 об/мин). Супернатант переносят в свежую пробирку эппендорф. Объем гомогената, соответствующий 10 мг легкого, переносят в дополнительную свежую пробирку эппендорф. В эту пробирку добавляют лизирующий буфер до

конечного объема 600 мкл. Эти образцы, а также остаточные лизаты, замораживают при -80°C перед выделением РНК.

2.2.35 Клинические наблюдения в примере 24.

Хорьков осматривают два раза в день и оценивают по клиническим признакам болезни, включая чихание, выделения из носа и активность. Отсутствие или наличие чихания или выделений из носа оценивают как 0 или 1 балл. Активность оценивают следующим образом: 0 = нормальная активность, 1 = сниженная активность и 2 = нет активности. Ежедневные баллы регистрируют для каждого отдельного хорька, демонстрирующего конкретный клинический признак в данный день. Оценку также производят по количеству хорьков в группах, демонстрирующих один или несколько признаков инфекции в данный день.

По отсутствию или наличию чихания или выделений из носа присваивают 0 или 1 балл, соответственно.

2.2.36 Масса тела и температура тела в примере 24.

Массу тела измеряют во время получения, перед первым введением мРНК hIFN в составе LF92 и в каждый последующий день исследования.

Температуру тела измеряли ежедневно с помощью транспондеров, имплантированных подкожно хорькам в день -1.

2.2.37 Титры вируса в назальных смывах

Назальные смывы собирают в 1, 2, 3, 4, 5 и 6 дни после заражения вирусом путем промывания носовых полостей 2 мл стерильного ФСБ, содержащего 0,5% бычьего сывороточного альбумина (БСА), пенициллин, стрептомицин и амфотерицин В. Смывы в 1 и 3 дни собирают перед введением мРНК hIFN в составе LF92. Назальные смывы собирают и делят на аликвоты в стерильные 1,5-мл пробирки эппендорф и немедленно замораживают на сухом льду, затем хранят при -80°C до использования для определения титра вируса с помощью TCID₅₀.

Серийные $\frac{1}{2}$ -log₁₀ разведения назальных смывов от 10^{-1} до 10^{-10} готовят в среде для выращивания вирусов (DMEM с добавлением 0,3% БСА) без ТРСК-трипсина. Двадцать пять микролитров (25 мкл) разведения $\frac{1}{2}$ -log₁₀ каждого назального смыва добавляют (четыре (4) повтора для каждого разведения) к клеткам MDCK в 96-луночный микропланшет и инкубируют при 37°C , 5% CO₂ в

течение 60 мин. После 60-минутной инкубации в каждую лунку добавляют 175 мкл (175 мкл) среды для выращивания вирусов (DMEM с добавлением 0,3% БСА с 1 мкг/мл ТРСК-трипсина). Затем клетки инкубируют 48 ч при 37°C, 5% CO₂.

Содержимое каждой лунки проверяют на гемагглютинацию путем инкубации 50 мкл супернатанта тканевой культуры с 50 мкл 0,5% эритроцитов индейки в 1хФБС в течение 30 мин при комнатной температуре. TCID₅₀ рассчитывают по методу Рида и Мюнча. Вкратце, присутствие вируса гриппа вызывает агглютинацию эритроцитов. Определяли количество положительных (лунок с гемагглютинацией) и отрицательных лунок при каждом разведении.

Рассчитывают «кумулятивный положительный результат», «кумулятивный отрицательный результат», соотношение и % положительных результатов. Затем рассчитывают «пропорциональное расстояние» между разведением, показывающим >50% положительных результатов, и разведением, показывающим <50% положительных результатов, с использованием следующего уравнения:

Пропорциональное расстояние = ((% положительного значения выше 50%) / (% положительного значения выше 50% - % положительного значения ниже 50%)) × 0,5 (поправочный коэффициент ½ log разбавления). Вирусный TCID₅₀ для каждого образца рассчитывают путем добавления пропорционального расстояния к разведению, показывающему >50% положительных результатов.

2.2.38 Аутопсия в примере 24

Животных гуманно умерщвляют на 6-й день и собирают легочную ткань из всех четырех долей легкого. Легкие фотографируют и взвешивают по отдельности. Собирают по три порции каждой доли. Две порции помещают в предварительно взвешенные пробирки, содержащие RNeasy (или эквивалент), и взвешивают, третью легочную порцию помещают в 10% забуференный формалин.

2.2.39 Подсчет РНК вируса в легких

Количественное определение вируса гриппа в тканях легких хорька определяют с помощью одностадийной реального времени количественной ПЦР (РВ-кПЦР) в термоциклере Applied Biosystems QuantStudio 6-flex (фирма Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния, США). Вирусную РНК экстрагируют из образцов ткани легкого, собранных из верхней левой доли, с использованием

набора Zymo Research Quick-RNA Miniprep Plus Kit (Санта-Ана, Калифорния), получив 60 мкл элюированной вирусной РНК, которую делят на аликвоты и хранят при -80°C до использования для подсчета. Пять микролитров (5 мкл) экстрагированной РНК используют для программирования 20 мкл

5 одностадийных реакций РВ-кПЦР (RT-qPCR), содержащих qScript XLT One-Step RT-qPCR ToughMix plus Rox (фирма QuantBio) и 0,2 мкМ праймеров M+24 F (5'-AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG-3') и Rev-mod (5'-TGC AAA GAC ACT TTC CAG TCT CTG-3') и зонд TaqMan M+64 (5'-FAM/TC AGG CCC C/ ZEN/C TCA AAG CCG A-3'BkFQ) для амплификации последовательностей на сегменте

10 7 вирусного гена, кодирующего белок вирусного матрикса. Амплификацию проводят в 96-луночном планшете с одним циклом при 50°C в течение 10 мин для обратной транскрипции, затем 3 мин при 95°C и 45 циклов при 95°C в течение 10 секунд, 60°C в течение 30 секунд для амплификации ДНК.

Количество вирусной РНК в каждом образце интерполируют из стандартной

15 кривой, полученной путем амплификации серийных разведений вирусной РНК, экстрагированной из концентрата клеточной культуры (8×10^6 БОЕ/мл) вируса гриппа A/California/04/2009 pdmH1N1. Суммарную вирусную РНК в каждом образце нормализуют к относительному количеству GAPDH РНК хорька в одном миллиграмме суммарной РНК. Три микролитра (3 мкл) экстрагированной РНК

20 используют для программирования 20 мкл одноэтапных реакций RT-qPCR, содержащих qScript XLT One-Step RT-qPCR ToughMix plus Rox (фирма QuantBio) и 0,2 мкМ праймеров Fer_GAPDH FWD (5'-CAA CGG). ATT TGG CCG TAT TG-3') и Fer_GAPDH REV (5'-CTG GAA CAT GTA GAC CAT GTA GT -3') и зонд TaqMan Fer_GAPDH PRB

25 (5Cy5/AGGGTCATT/TAO/GATGGCGACAATATCCAC/3IAbRQSp/) для амплификации последовательностей GAPDH. Амплификацию проводят с помощью одного цикла при 50°C в течение 10 мин для обратной транскрипции, затем 3 мин при 95°C и 45 циклов при 95°C в течение 10 секунд, 60°C в течение 30 секунд для амплификации ДНК. Количество GAPDH в образцах

30 интерполируют по стандартной кривой, полученной путем амплификации серийных разведений объединенной экстрагированной РНК легких хорька (250 нг/мкл). Результаты обрабатывают программным модулем 21 CFR Part 11 для

систем QuantStudio™ 6 и 7, а данные анализа RT-qPCR импортируют в программное обеспечение GraphPad Prism для анализа.

2.2.40 Количественная оценка репродукции вируса в примере 25

2.2.40.1 Утверждение исследования

5 Все эксперименты с участием животных были предварительно одобрены Комитетом по этике животных при Датском управлении ветеринарии и пищевых продуктов (Stationsparken 31-33, 2600 Glostrup, Дания) и проводились в соответствии с законом Дании о защите животных и их использовании для научных целей.

10 2.2.40.2 Биобезопасность

Все задачи, решаемые в настоящем исследовании, одобрены Датским управлением по рабочей среде, Landskronagade 33, 2100 Copenhagen Ø, до начала исследования. Работу с SARS-CoV-2 проводят в лаборатории уровня биобезопасности 2+ персоналом, оснащенным респираторами с принудительной
15 подачей воздуха.

2.2.40.3 Размножение SARS-CoV-2

В.1.1.7 SARS-CoV2 (выделен в Кенте, Великобритания) предоставлен в рамках МТА профессором Arvind Patel из Университета Глазго. Используемые вирусы являются клиническими изолятами. Вариант В.1.1.7 находится в базе
20 данных как MZ314997. Вирусы размножают в клетках VeroE6, экспрессирующих TMPRSS2 человека (VeroE6-hTMPRSS2) (любезно предоставлено профессором Stefan Pöhlmann, Геттингенский университет) (Hoffmann с соавт., 2020). Вкратце, клетки VeroE6-hTMPRSS2 инфицируют с множественностью заражения (MOI) 0,05 в среде DMEM (Gibco) + 2% ФБС (фирма Sigma-Aldrich) +
25 1% пенициллин/стрептомицин (фирма Gibco) + L-глутамин (фирма Sigma-Aldrich) (отсюда полная среда). Собирают супернатант через 72 ч после инфицирования, содержащий новое потомство вируса, и концентрируют на ультрафильтрационных колонках Amicon 100 кДа (фирма Merck) путем центрифугирования в режиме 4000 g в течение 30 мин. Титр вируса определяют
30 с помощью анализа TCID₅₀% и рассчитывают по методу Рида-Мюнха. Чтобы преобразовать в среднее число бляшкообразующие единицы (БОЕ)/мл, TCID₅₀/мл умножают на коэффициент 0,7 (АТСС – конверсия TCID₅₀] в бляшкообразующие единицы (БОЕ)).

2.2.40.4 Содержание животных

Мышей K18-hACE c57BL/6J (штамм: 2B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/J) получают от фирмы The Jackson Laboratory. Гемизиготное потомство используют для эксперимента. Мыши-самцы и самки совпадают по возрасту, их кормят по стандартной диете и содержат в помещении, свободном от патогенов. Мышей взвешивают каждый день в одно и то же время дня до 3-го дня после заражения (и животных умерщвляют при 20% потере массы тела или когда они достигают конечного состояния, при котором это гуманно).

2.2.40.5 Обработка мышей

Мышей обрабатывают интраназально под анестезией изофлураном 15 мкл инокулята мРНК IFN λ 1 человека (7,5 мкг мРНК соответствует отложению 3 мкг в легких) за день до и через день после заражения.

2.2.40.6 Заражение мышей

Заражение SARS-CoV-2 проводят так же, как и введение мРНК (интраназальное введение аликвоты 15 мкл под ингаляционной анестезией изофлураном).

2.2.40.7 Выделение РНК, кПЦР реального времени

Легкие гомогенизируют со стальными гранулами (фирма Qiagen) в TissueLyser (II) (фирма Qiagen) в ФСБ и немедленно применяют для выделения РНК. РНК выделяют с использованием набора High Pure RNA Isolation Kit (фирма Roche) и равное количество РНК используют для стандартной одностадийной ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) (набор Applied Biosystems TaqMan RNA to CT One Step Kit). Для количественной ПЦР гена N SARS-CoV-2 используют праймеры AAATTTTGGGGACCAGGAAC и TGGCACCTGTGTAGGTCAAC и зонд FAM-ATGTCGCGCATTTGGCATGGA-BHQ. Для IFN- β , Mx1 и β -актина использовали анализы экспрессии генов Taqman (фирма Applied Biosystems). Уровни РНК гена N SARS-CoV-2, IFN β или Mx1 нормализуют относительно гена домашнего хозяйства мыши β -актина с использованием формулы $2^{-(Ct(18S-pРНК)-Ct(РНК\ Sars-CoV-2))}$.

2.2.40.8 Анализ TCID₅₀

Для определения количества инфекционного вируса в супернатанте клеточной культуры или в полученных запасах вируса проводят анализ предельного разведения. 2×10^4 клеток VeroE6-TMPRRS2 высевает в 90 мкл

DMEM5 в 96-луночный планшет. На следующий день образцы размораживают и разбавляют в 10 раз с последующим 10-кратным серийным разведением с использованием DMEM, и по 10 мкл каждого разведения добавляют к клеткам в восьми повторностях. Клетки инкубируют в течение 72 ч во влажном CO₂-инкубаторе при 37°C с 5% CO₂. Цитопатический эффект (ЦПЭ) оценивают после фиксации 5% формалином (фирма Sigma-Aldrich) и окрашивания кристаллическим фиолетовым (фирма Sigma-Aldrich) с использованием светового микроскопа (Leica DMi1), инфекционную дозу для культуры ткани 50/мл (TCID₅₀/мл – tissue culture infectious dose 50) рассчитывают по методу Рида и Мюнха.

ПЕРВОНАЧАЛЬНАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая мРНК, кодирующую полипептид IFN-λ, для применения в лечении или предупреждении заболевания, вызванного вирусом.

2. Фармацевтическая композиция для применения по п. 1, в которой указанное заболевание, вызванное вирусом, представляет собой респираторное заболевание, вызванное вирусом.

3. Фармацевтическая композиция для применения по п. 2, в которой вирус, вызывающий указанное индуцированное вирусом респираторное заболевание, выбран из группы, состоящей из риновируса, вируса гриппа, вируса парагриппа, метапневмовируса, респираторно-синцитиального вируса, аденовируса и коронавируса.

4. Фармацевтическая композиция для применения по п.п. 2 или 3, в которой вирус, вызывающий указанное вызванное вирусом респираторное заболевание, представляет собой вирус, который проникает в клетки через рецептор ACE2.

5. Фармацевтическая композиция для применения по п. 4, в которой указанным вирусом является SARS-CoV, SARS-CoV-2 или HCoV-NL63.

6. Фармацевтическая композиция для применения по любому из п.п. 2-5, в которой мРНК следует вводить путем доставки в дыхательную систему.

7. Фармацевтическая композиция для применения по п. 6, в котором указанная доставка в дыхательную систему является ингаляцией.

8. Фармацевтическая композиция для применения по п. 7, в котором указанная ингаляция представляет собой ингаляцию аэрозоля, содержащего указанную мРНК.

9. Фармацевтическая композиция для применения по любому из п.п. 1-8, в которых мРНК содержит комбинацию немодифицированных и модифицированных нуклеотидов, в которой от 5 до 50% уридиновых нуклеотидов и от 5 до 50% цитидиновых нуклеотидов представляют собой модифицированные уридиновые нуклеотиды и модифицированные цитидиновые нуклеотиды, соответственно, причем предпочтительно модифицированные уридиновые нуклеотиды представляют собой 2-тиуридин, а модифицированные цитидиновые нуклеотиды представляют собой 5-метилцитидин.

10. Фармацевтическая композиция для применения по любому из п.п. 1-9, в которой указанный полипептид IFN- λ выбран из группы, состоящей из IFN λ 1, IFN λ 2 и IFN λ 3 или их комбинации.

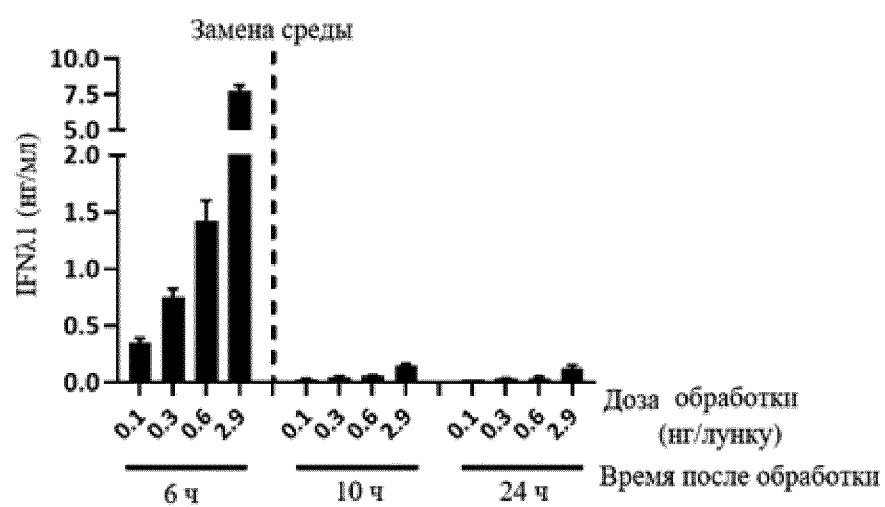
11. Фармацевтическая композиция для применения по п. 10, в которой кодирующая область мРНК, кодирующая IFN λ 1, как показано в SEQ ID NO: 1, где кодирующая область мРНК, кодирующая IFN λ 2, как показано в SEQ ID NO: 3 или где кодирующая область мРНК, кодирующая IFN λ 3, как показано в SEQ ID NO: 5.

12. Фармацевтическая композиция для применения по п.п. 10 или 11, в которой мРНК, кодирующая IFN λ 1, имеет последовательность, как показано в SEQ ID NO: 13, где мРНК, кодирующая IFN λ 2, имеет последовательность, как показано в SEQ ID NO: 14, или где мРНК, кодирующая IFN λ 3, имеет последовательность, как показано в SEQ ID NO: 15.

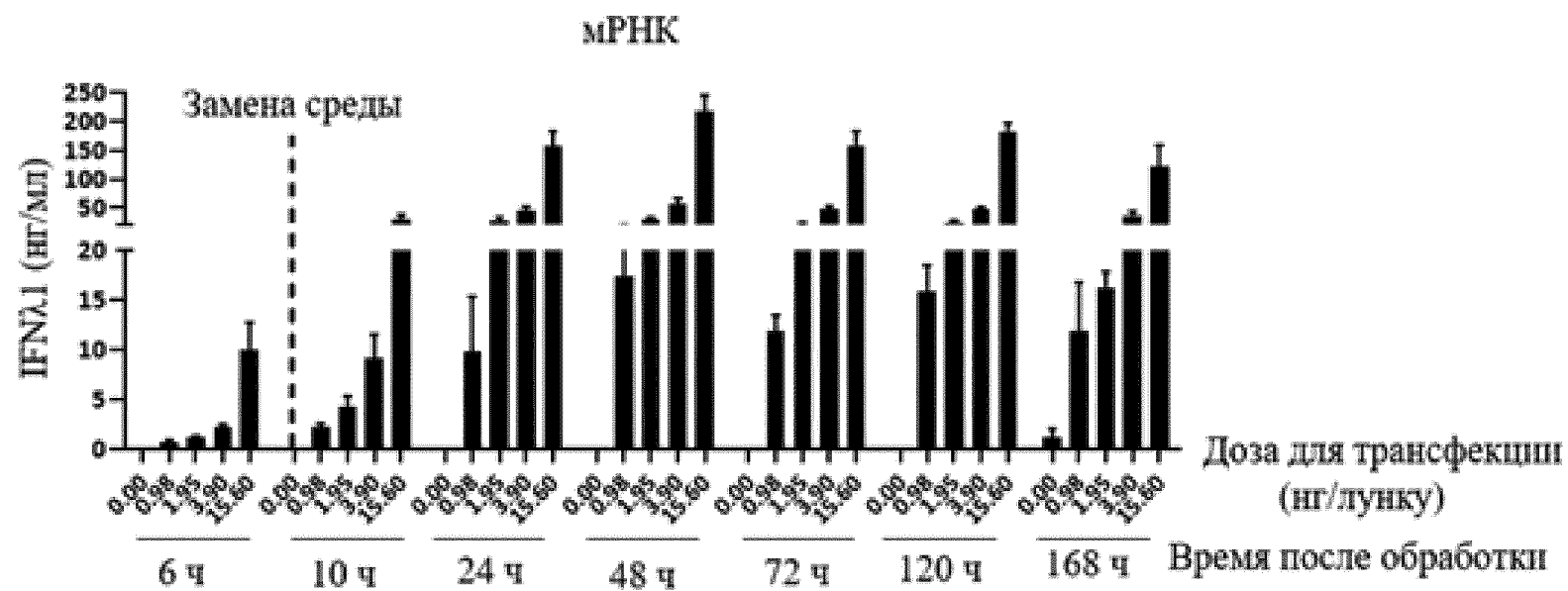
13. Фармацевтическая композиция для применения по любому из п.п. 1-12, дополнительно содержащая мРНК, кодирующую интерферон I типа, и/или мРНК, кодирующую интерферон II типа.

14. Фармацевтическая композиция для применения по п. 13, в которой интерферон I типа выбран из группы, состоящей из IFN- α , предпочтительно IFN- α 16, и IFN- β , и где интерферон II типа представляет собой IFN γ .

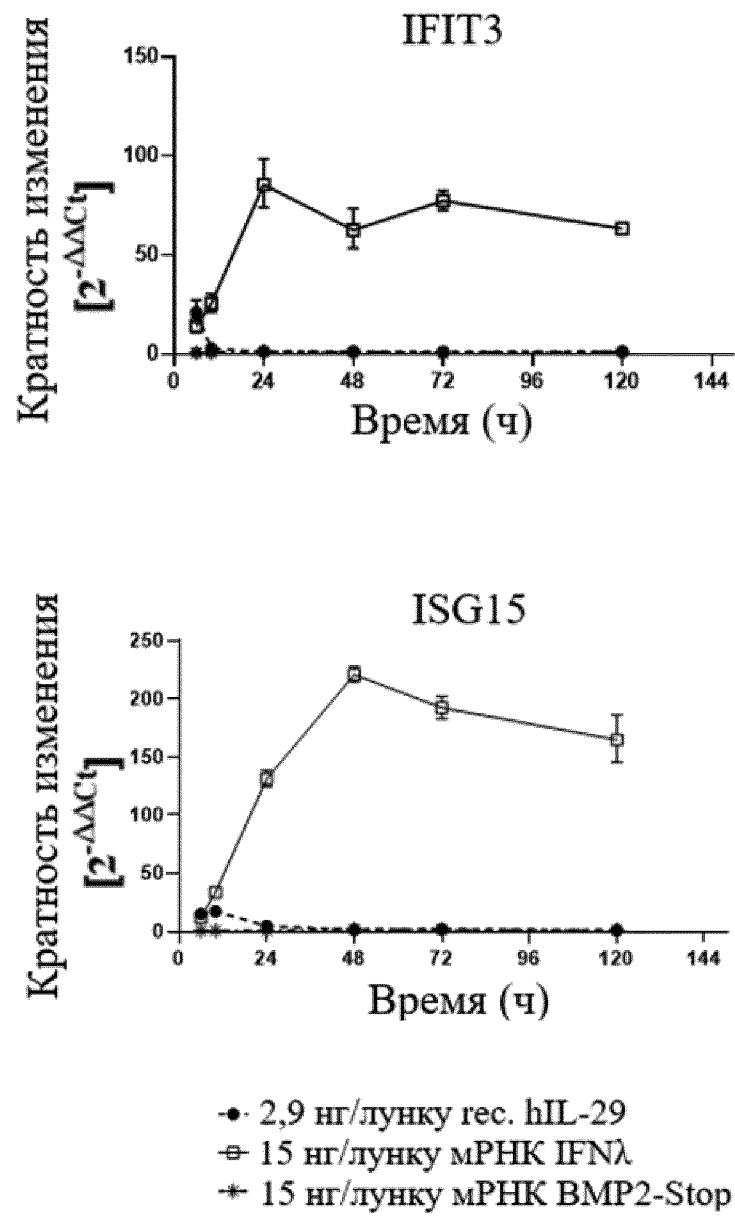
15. Молекула ДНК, имеющая последовательность, как показано в любой из
SEQ ID NO: 10-12.



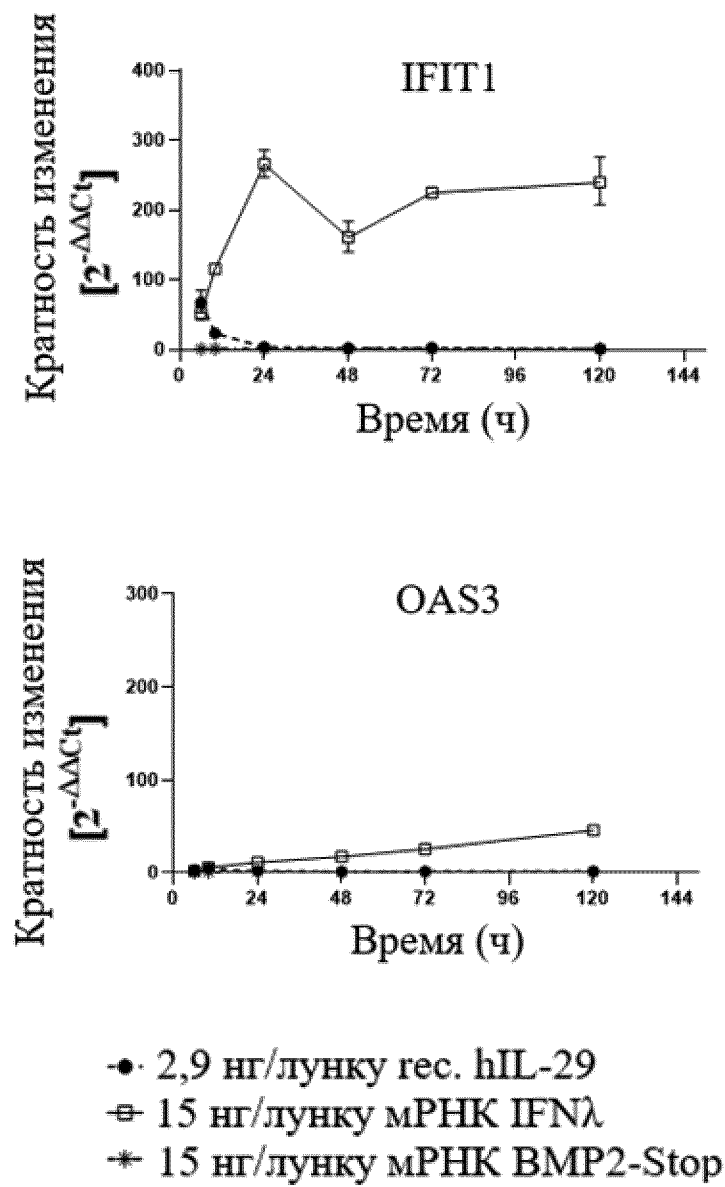
Фигура 1.



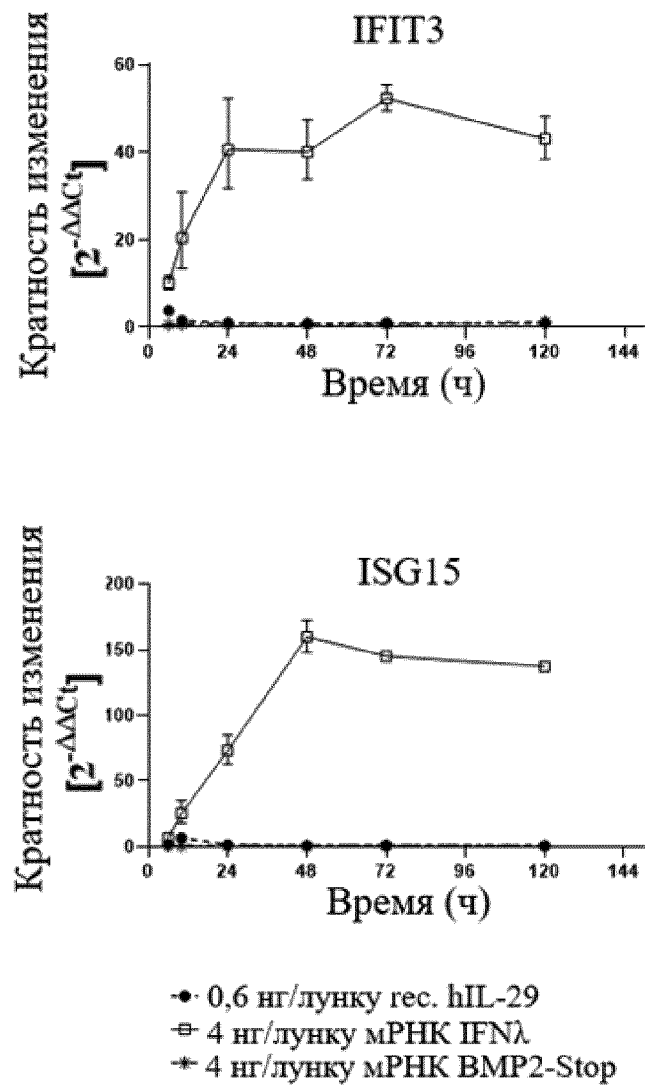
Фигура 2.



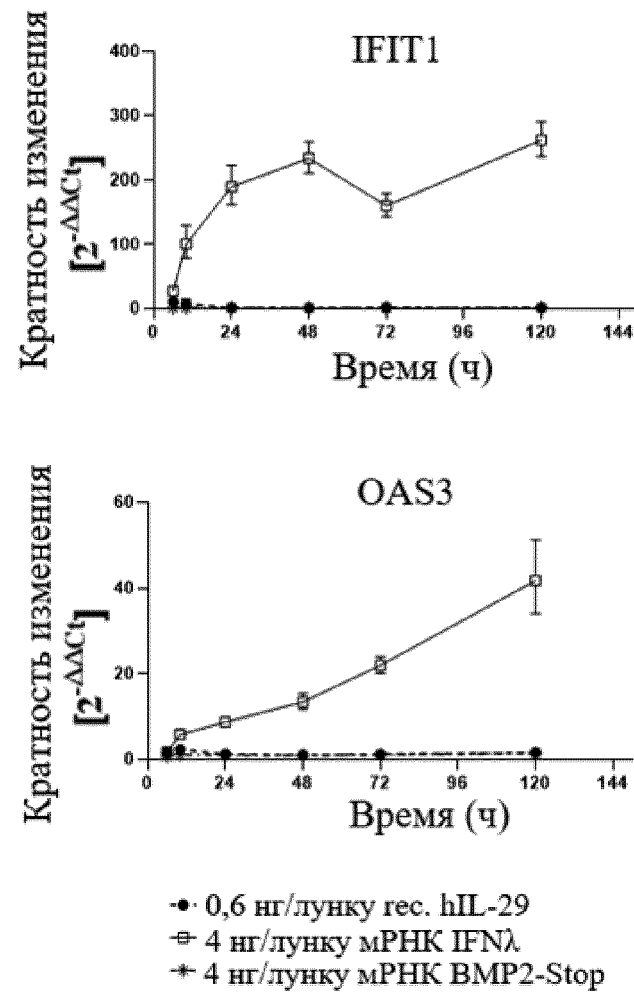
Фигура 3.



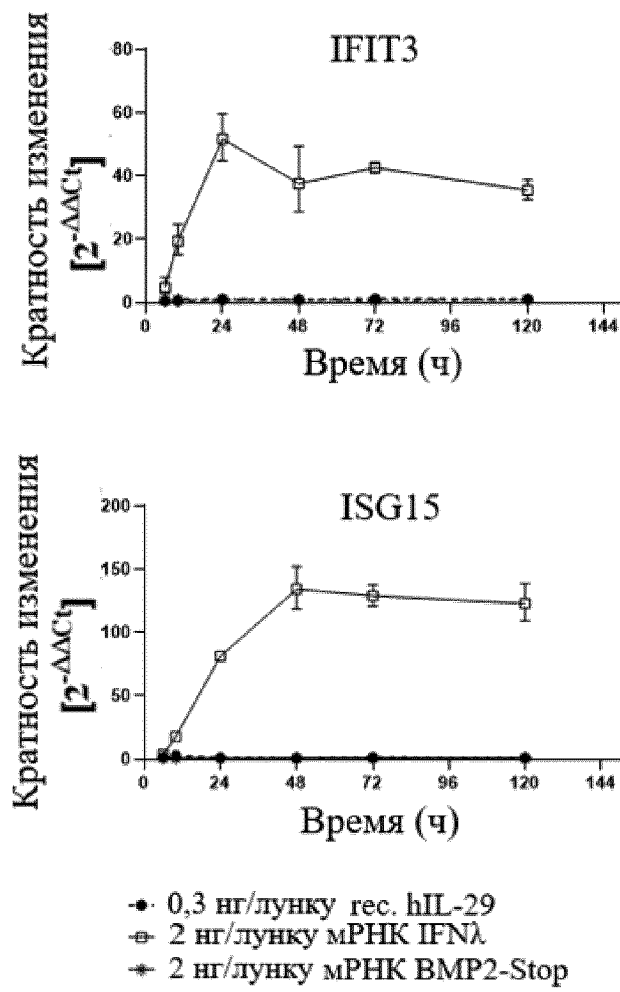
Фигура 3 (продолжение).



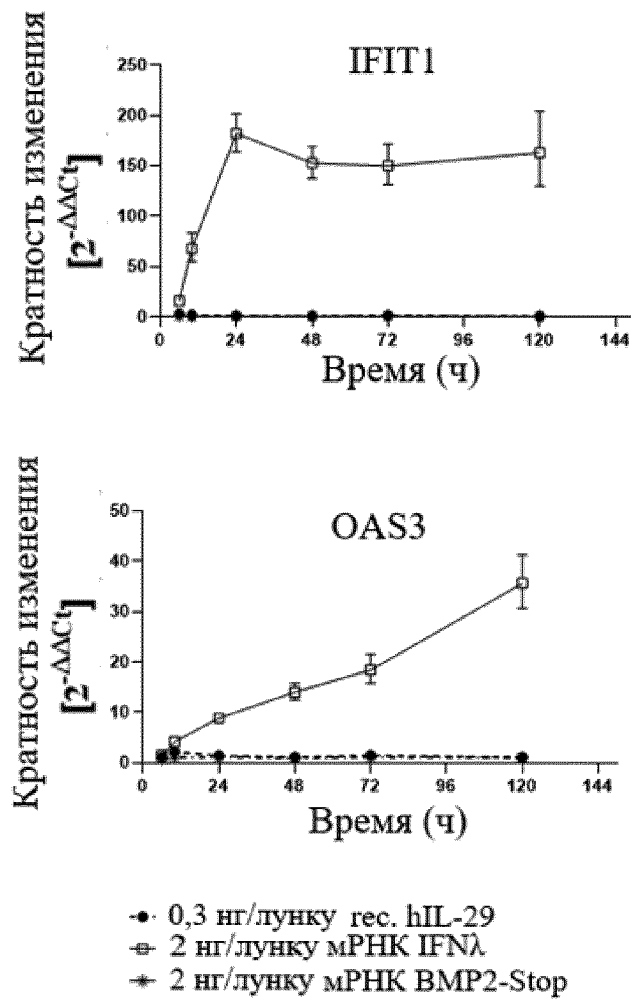
Фигура 4.



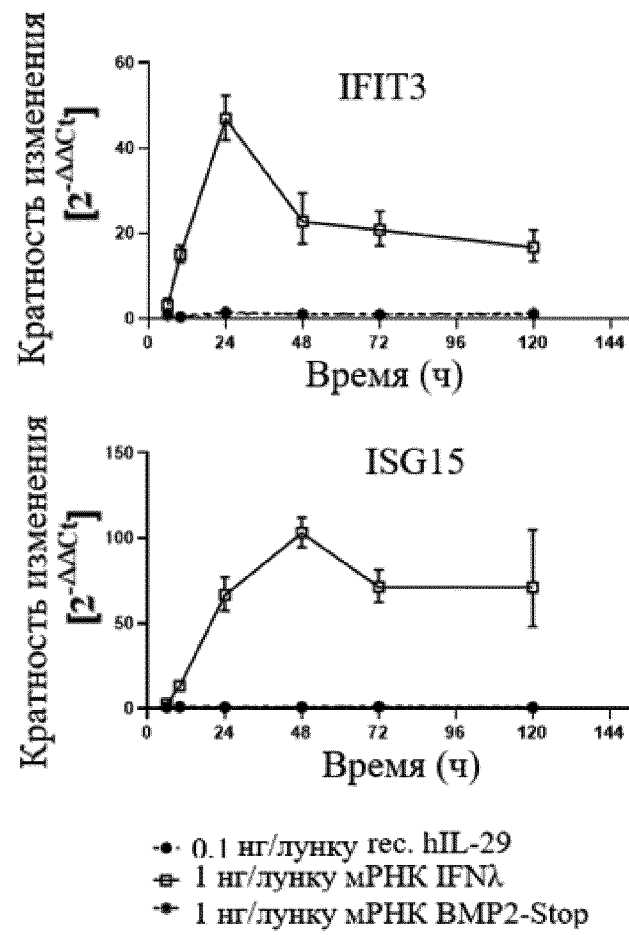
Фигура 4 (продолжение).



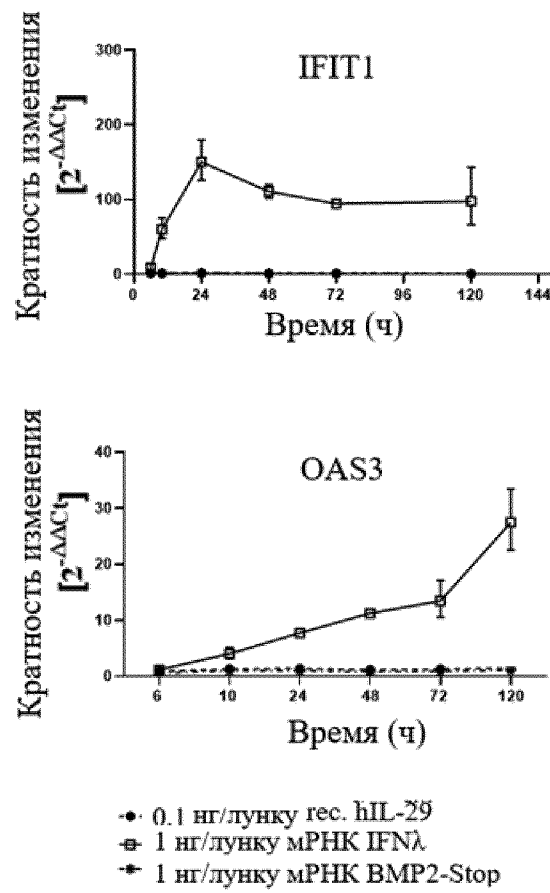
Фигура 5.



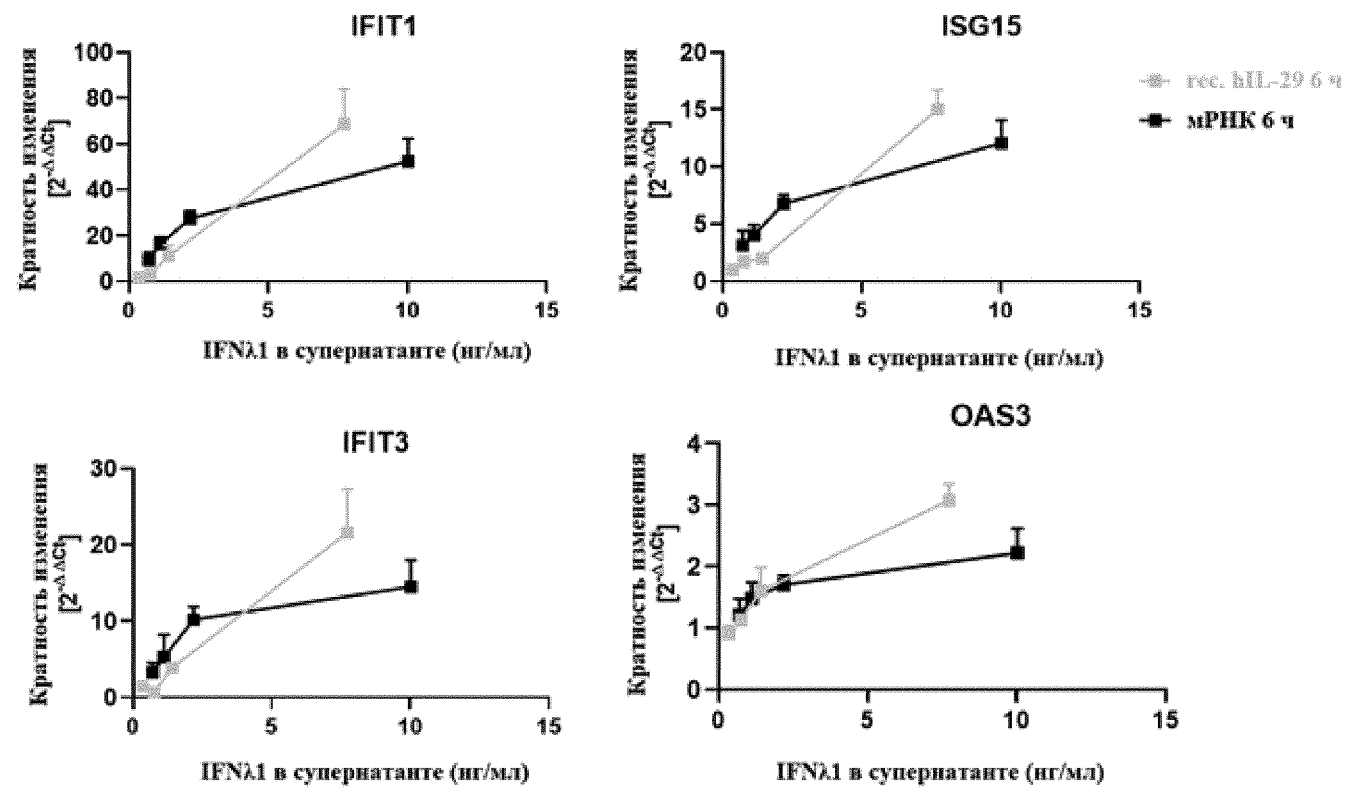
Фигура 5 (продолжение).



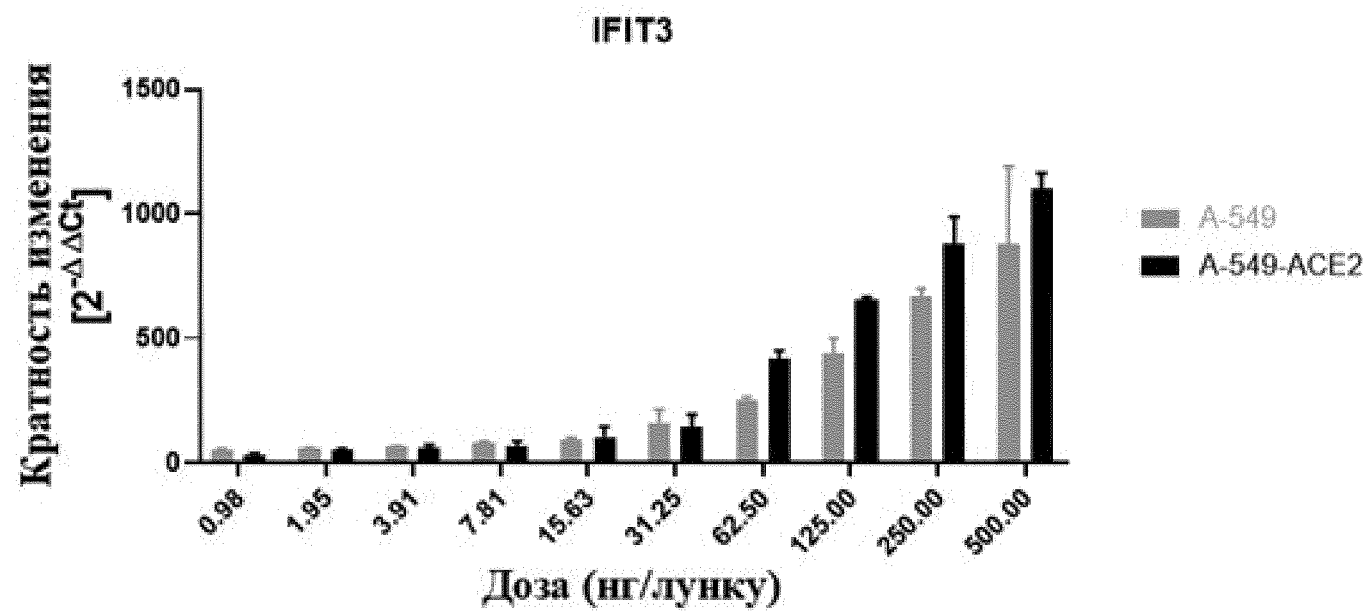
Фигура 6.



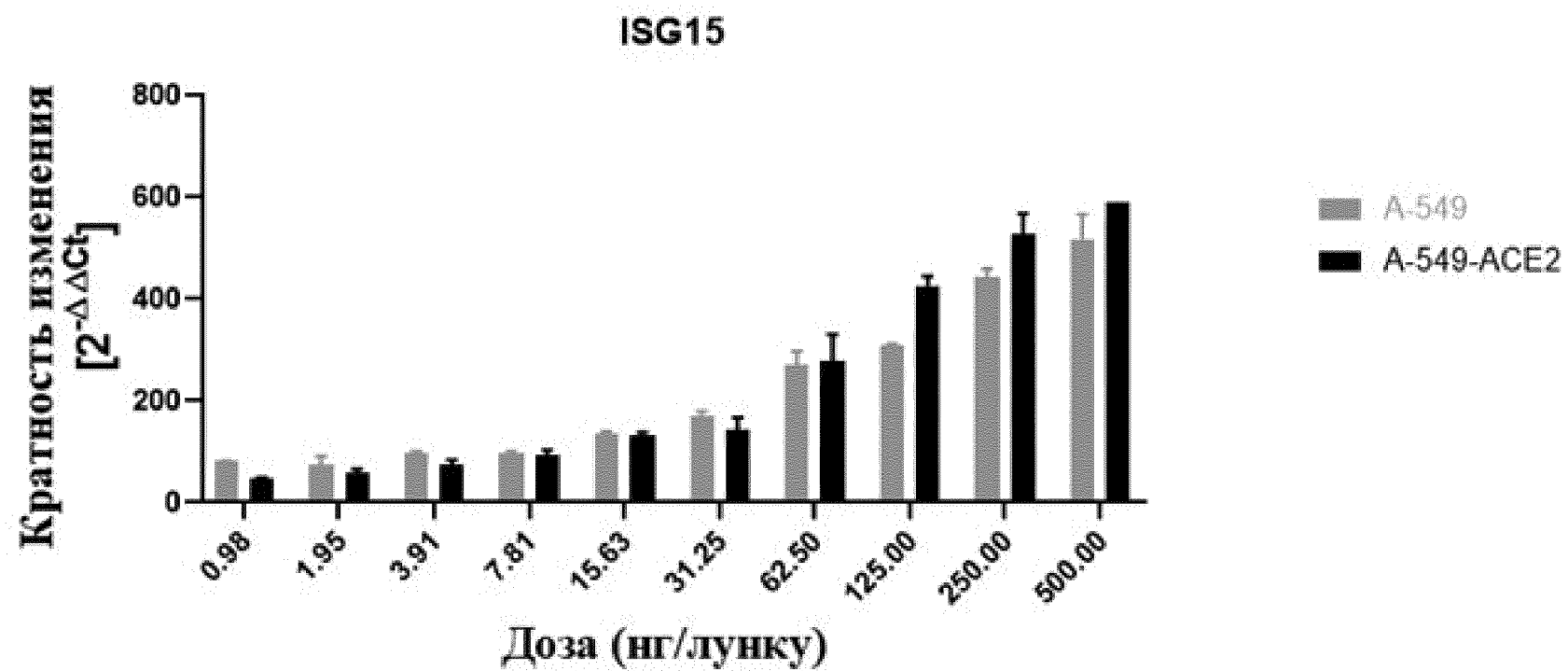
Фигура 6 (продолжение).



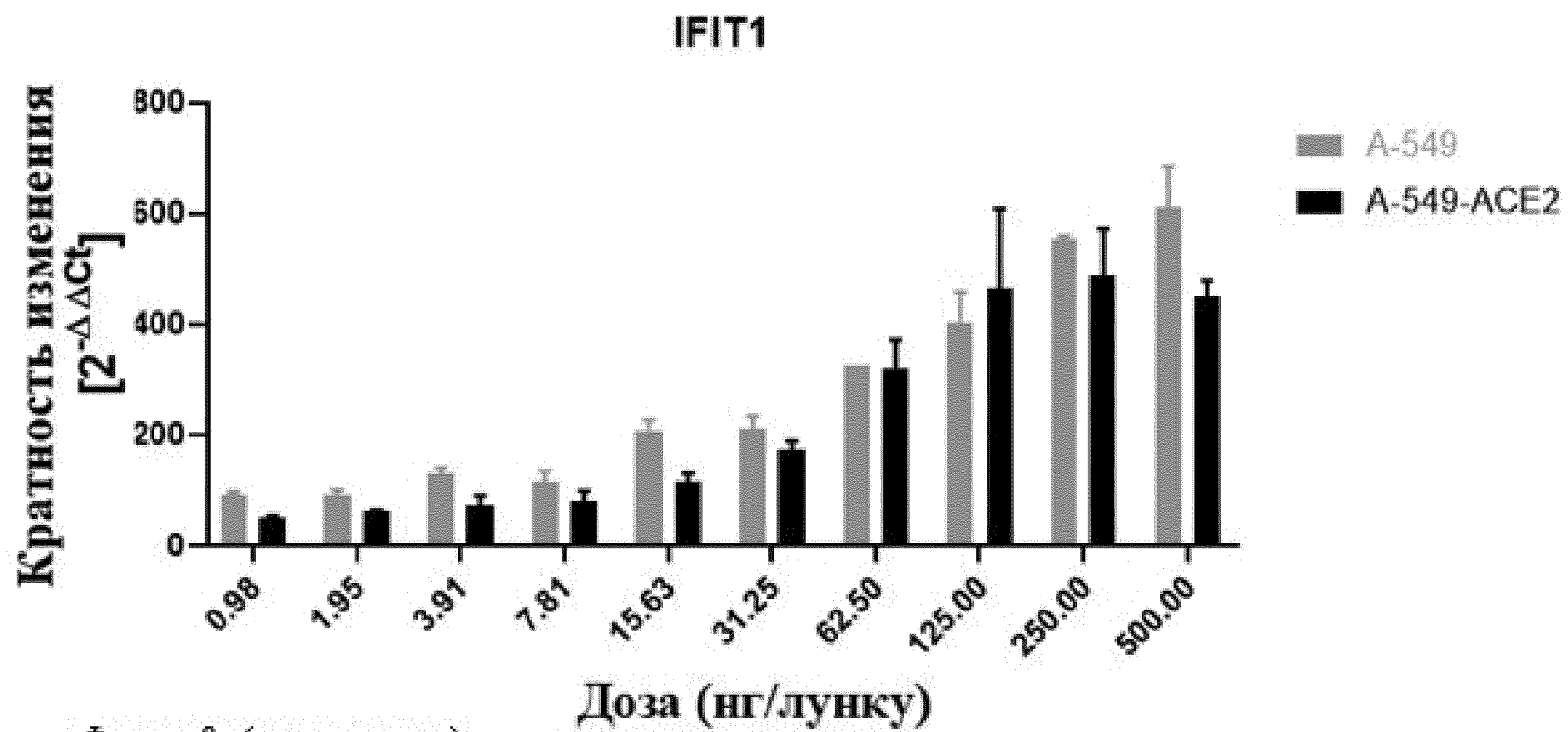
Фигура 7.



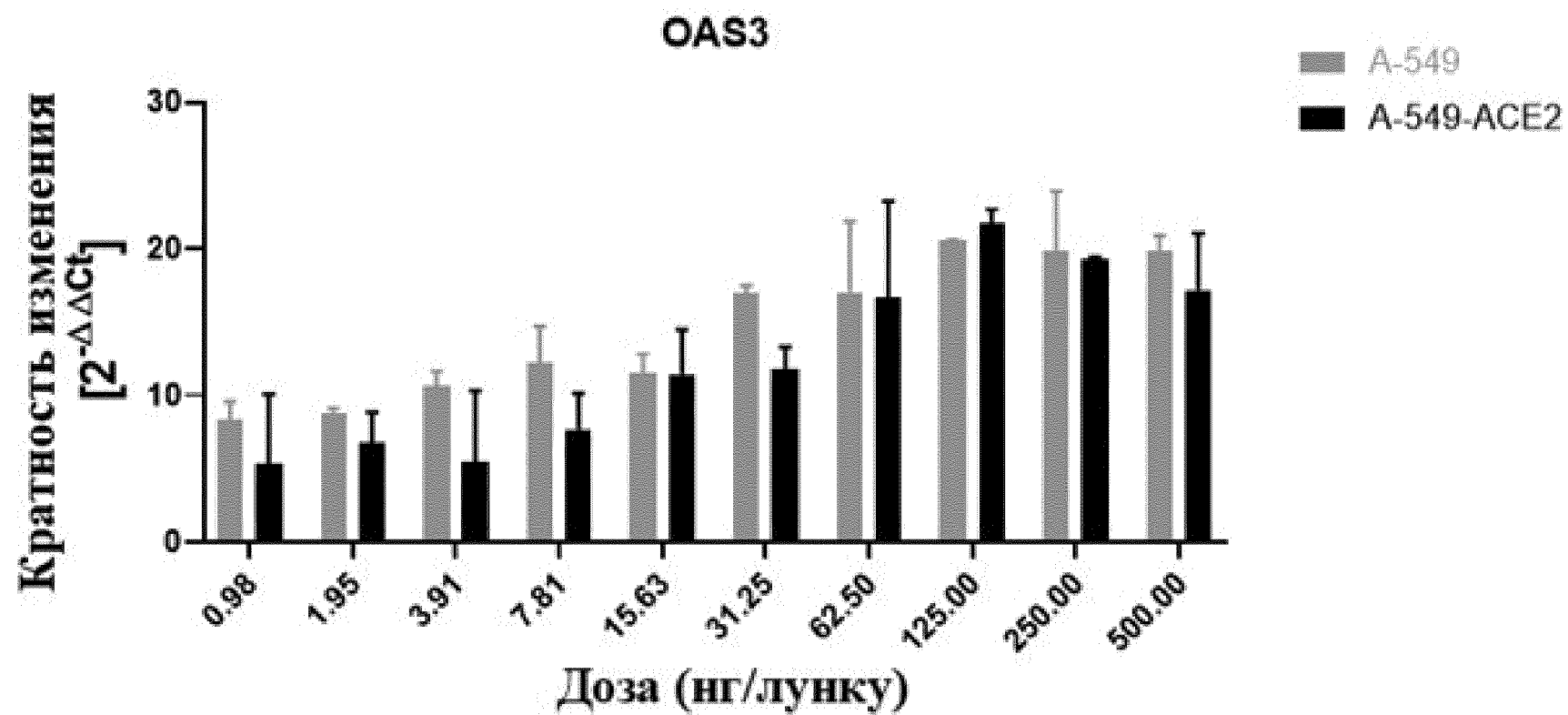
Фигура 8а.



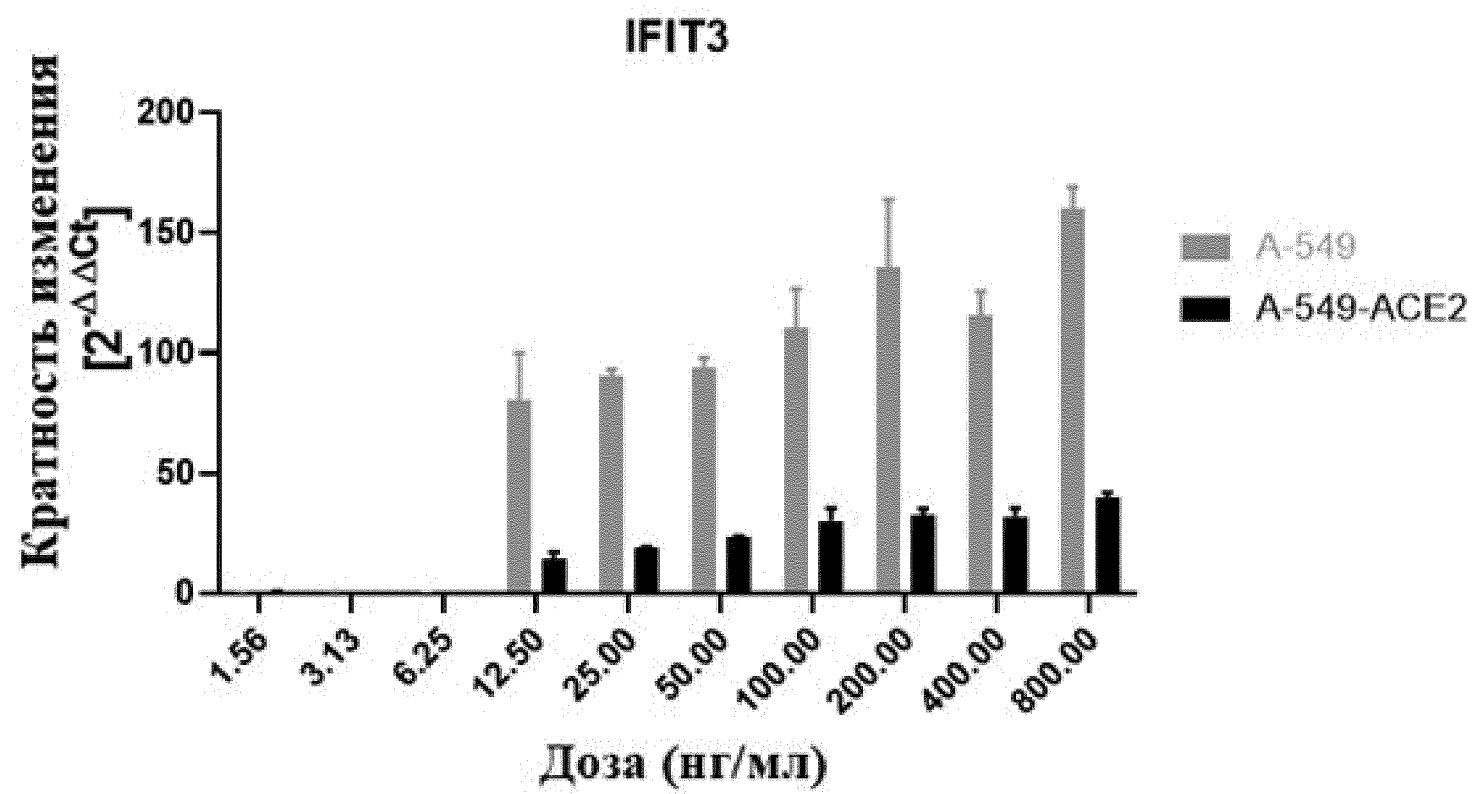
Фигура 8а (продолжение).



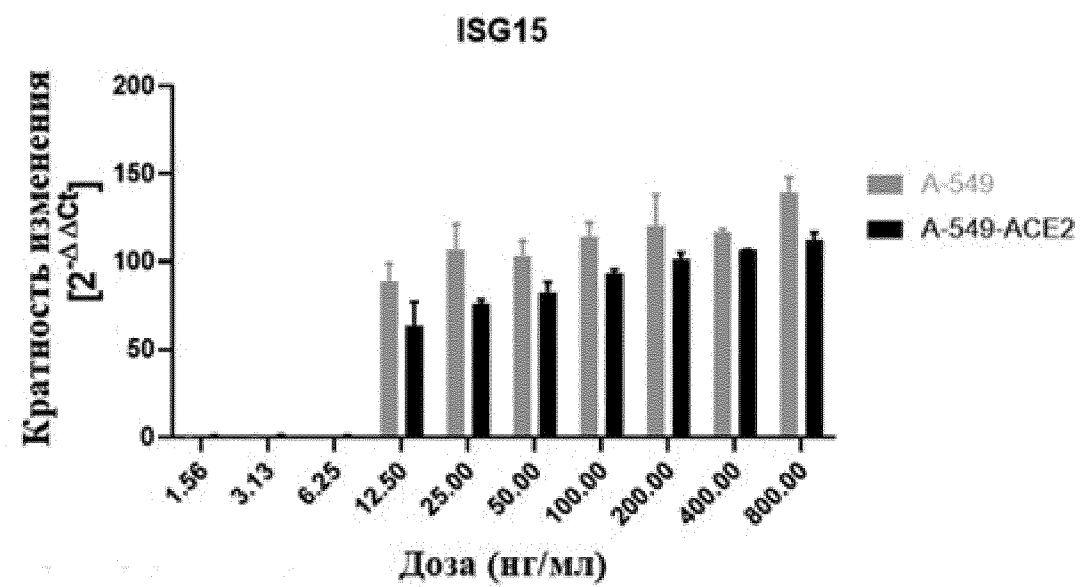
Фигура 8а (продолжение).



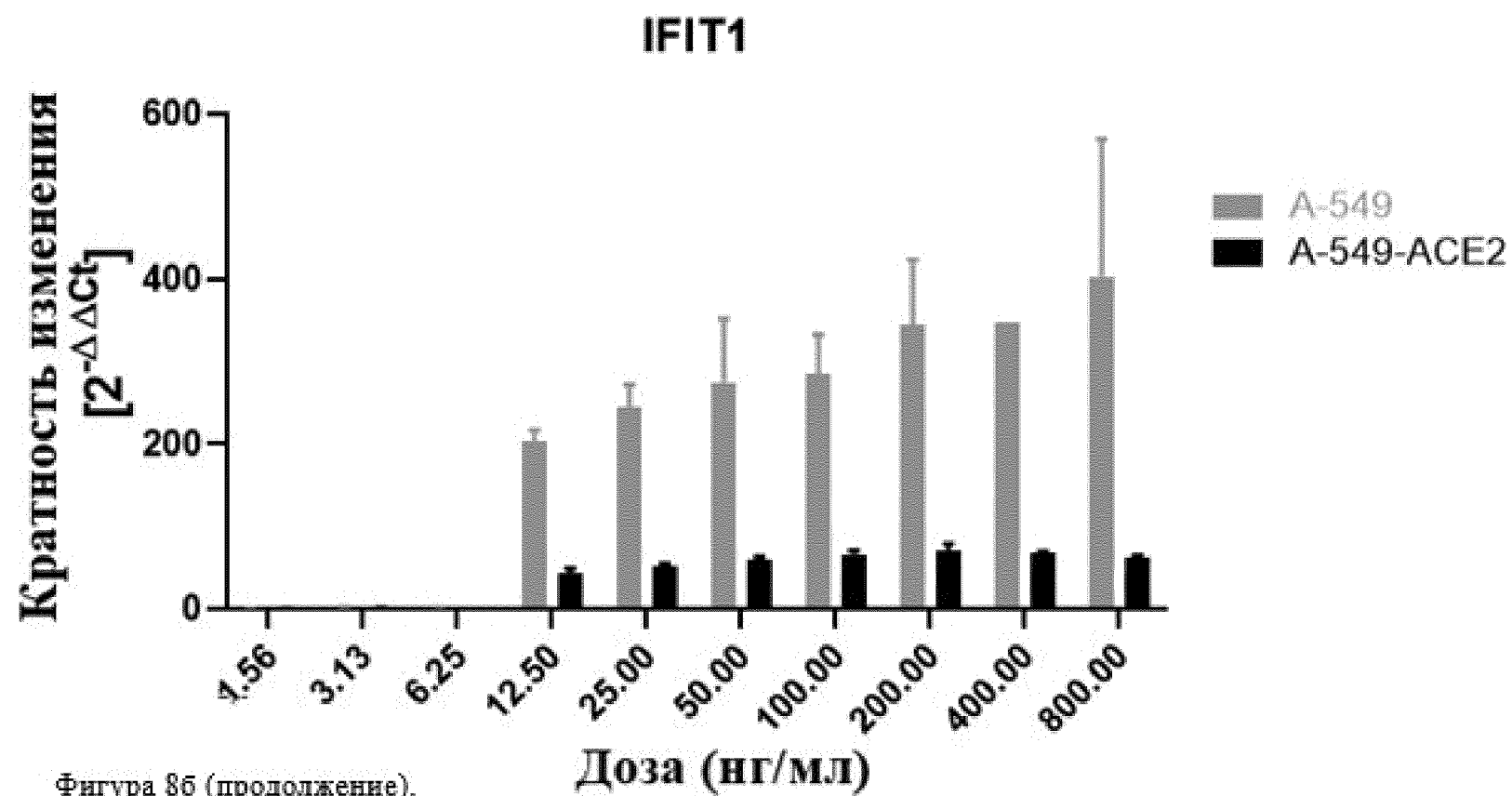
Фигура 8а (продолжение).



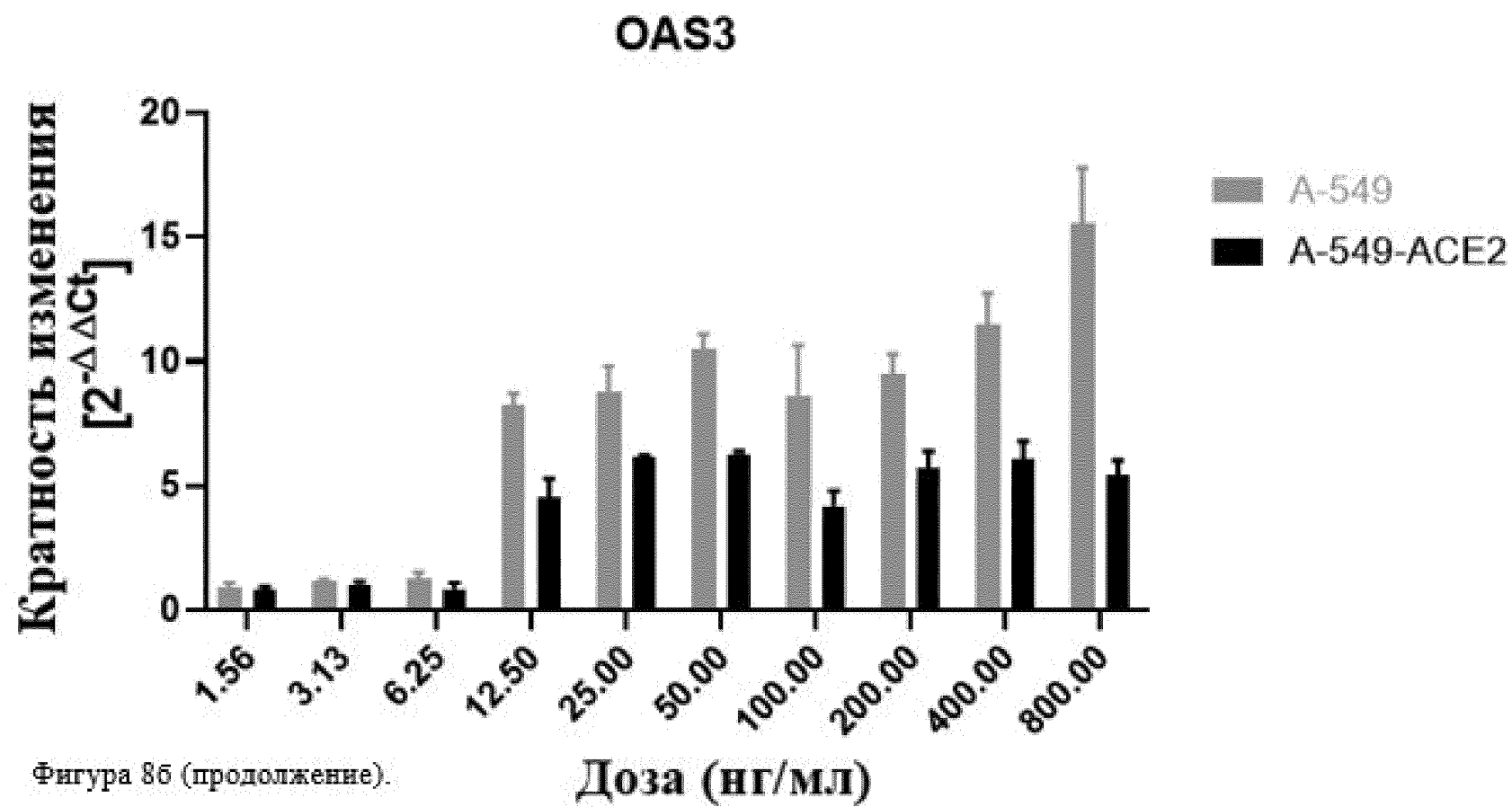
Фигура 8б.



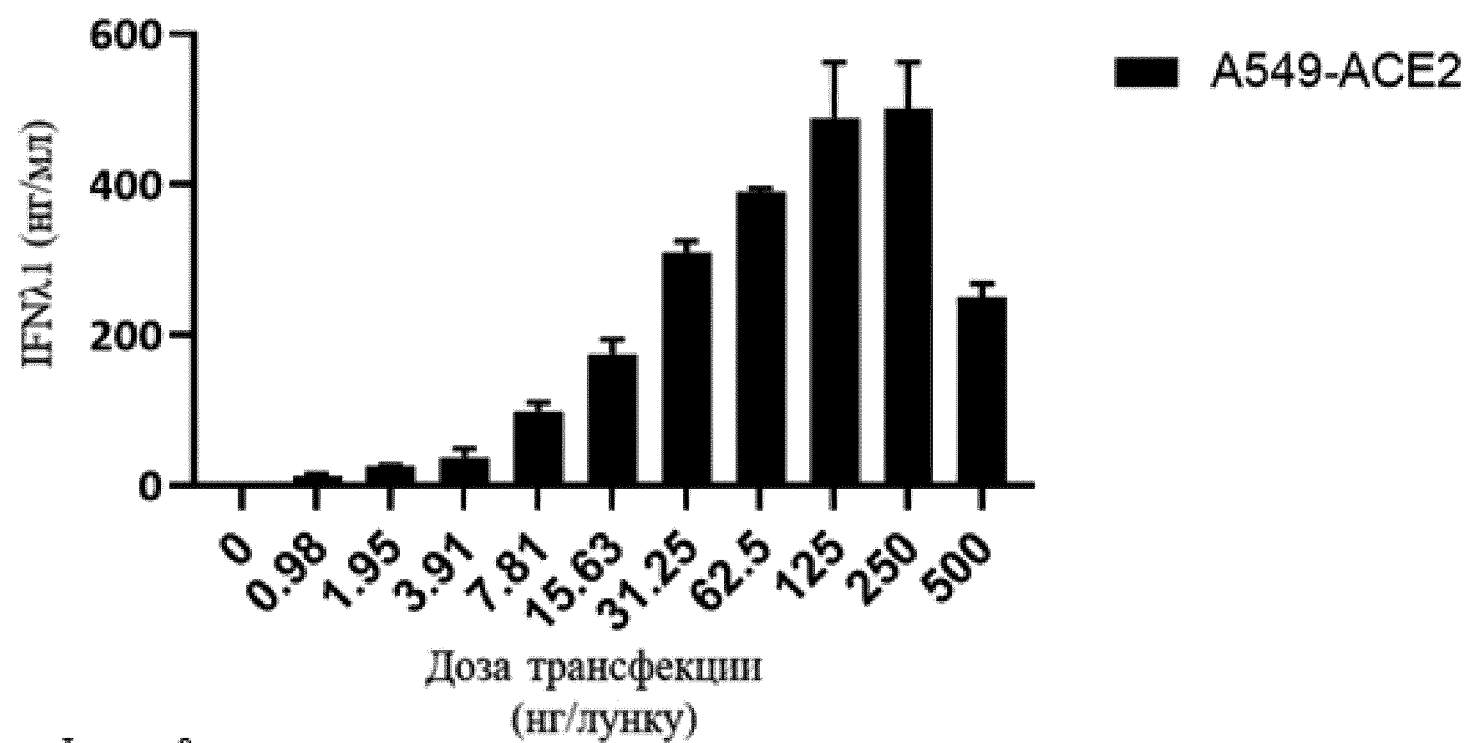
Фигура 86 (продолжение).



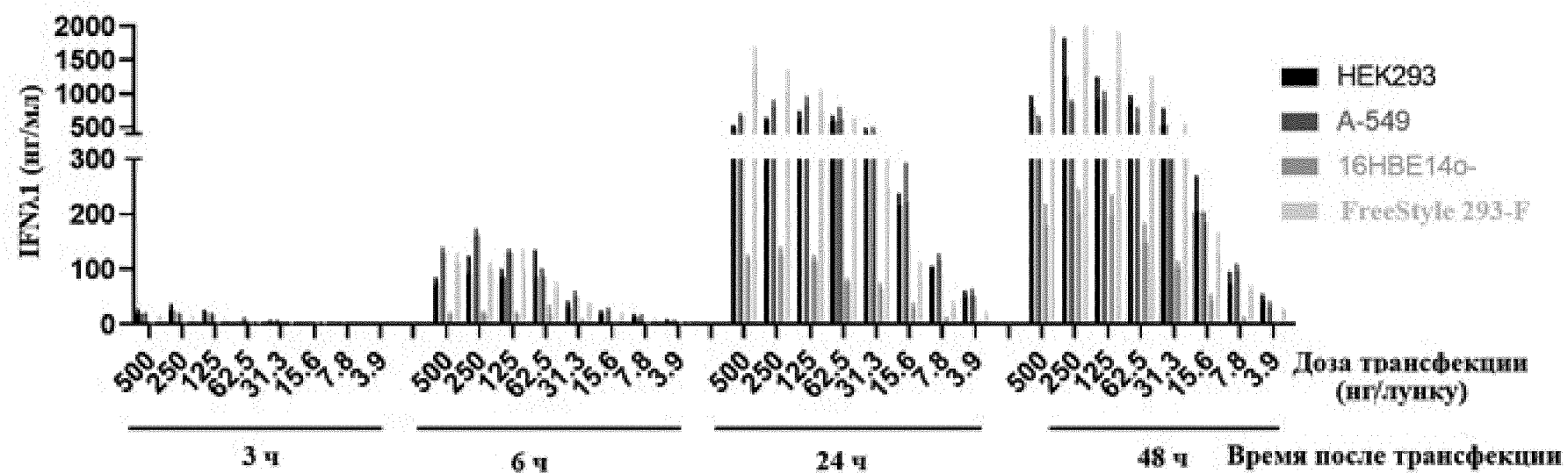
Фигура 86 (продолжение).



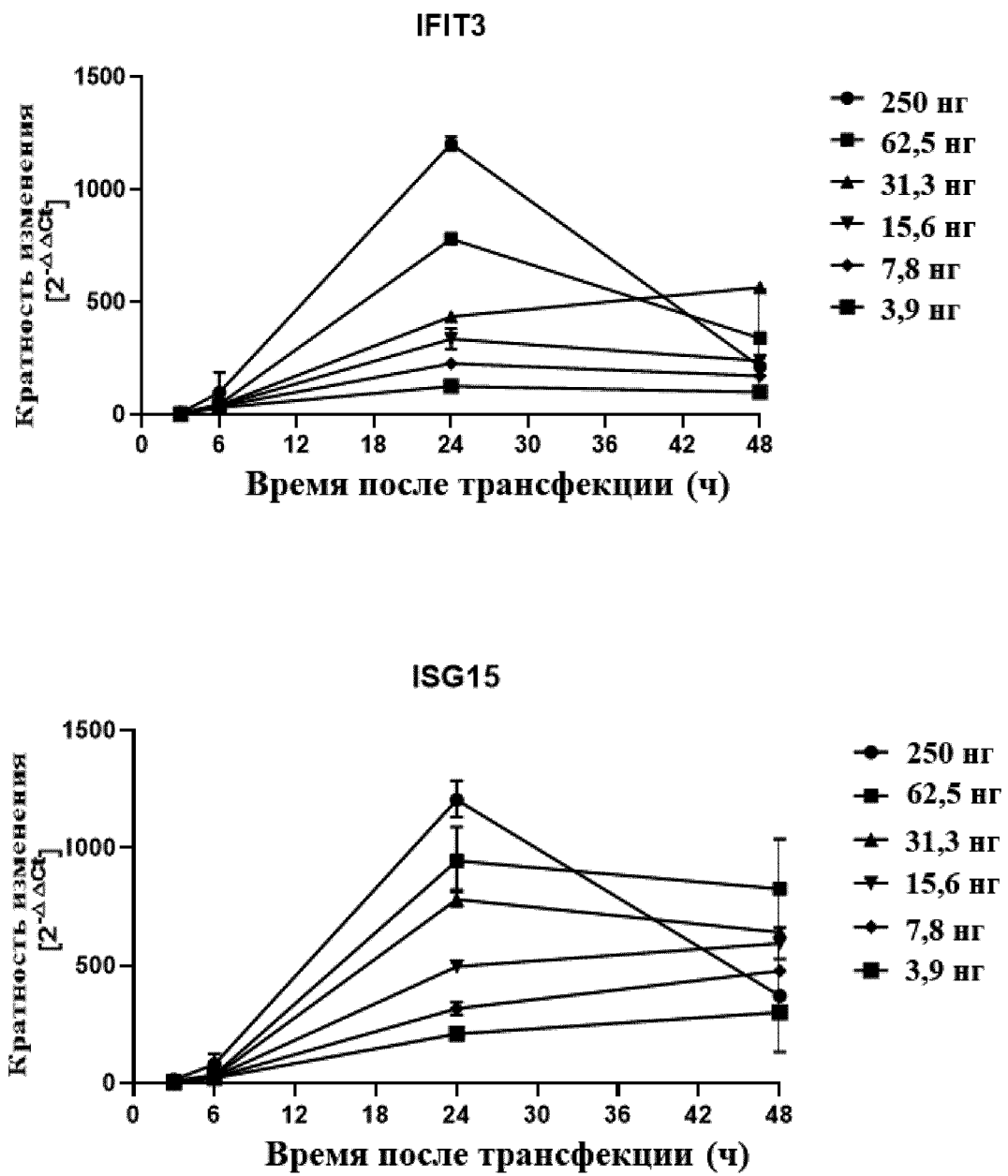
Фигура 86 (продолжение).



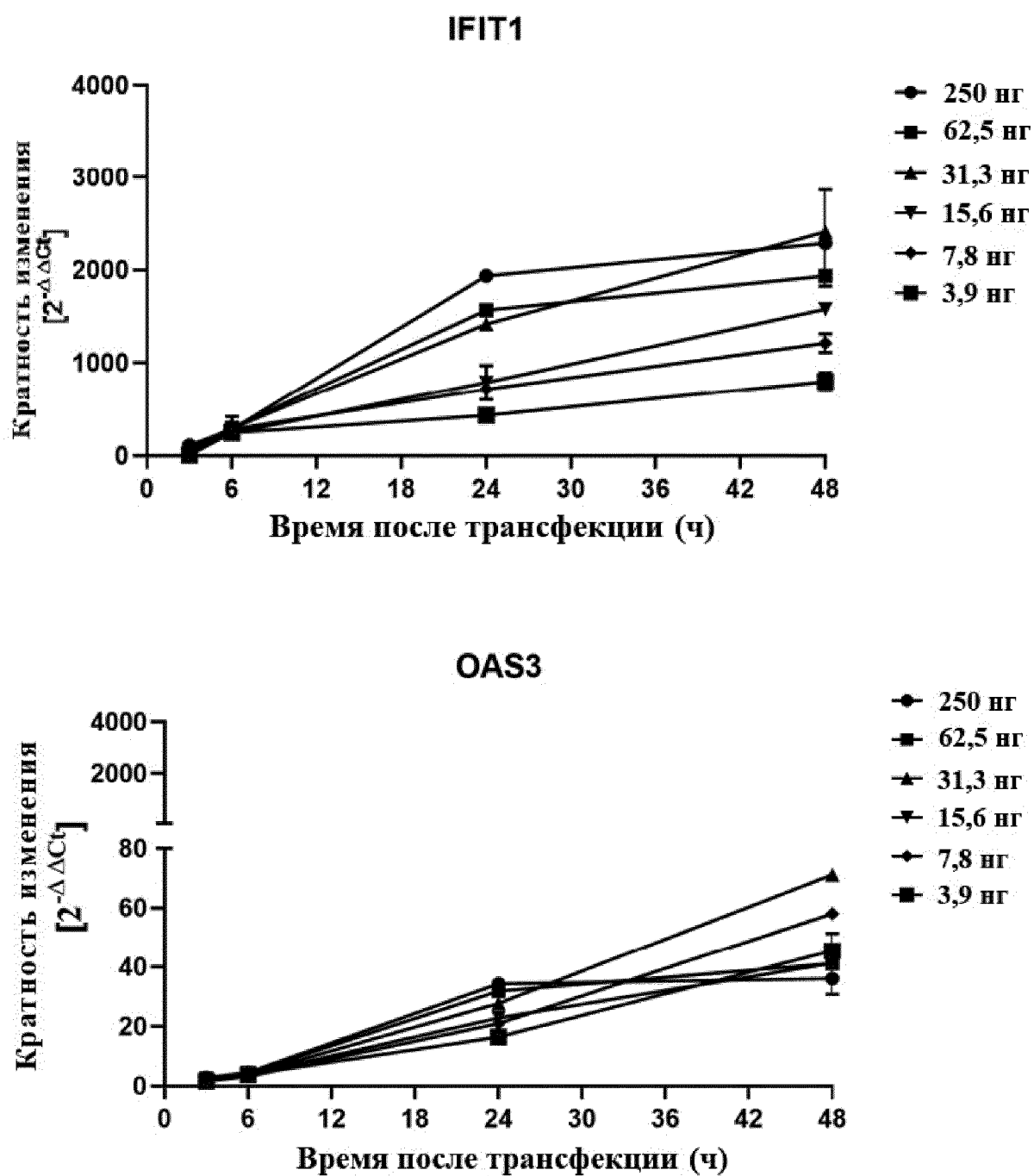
Фигура 8в.



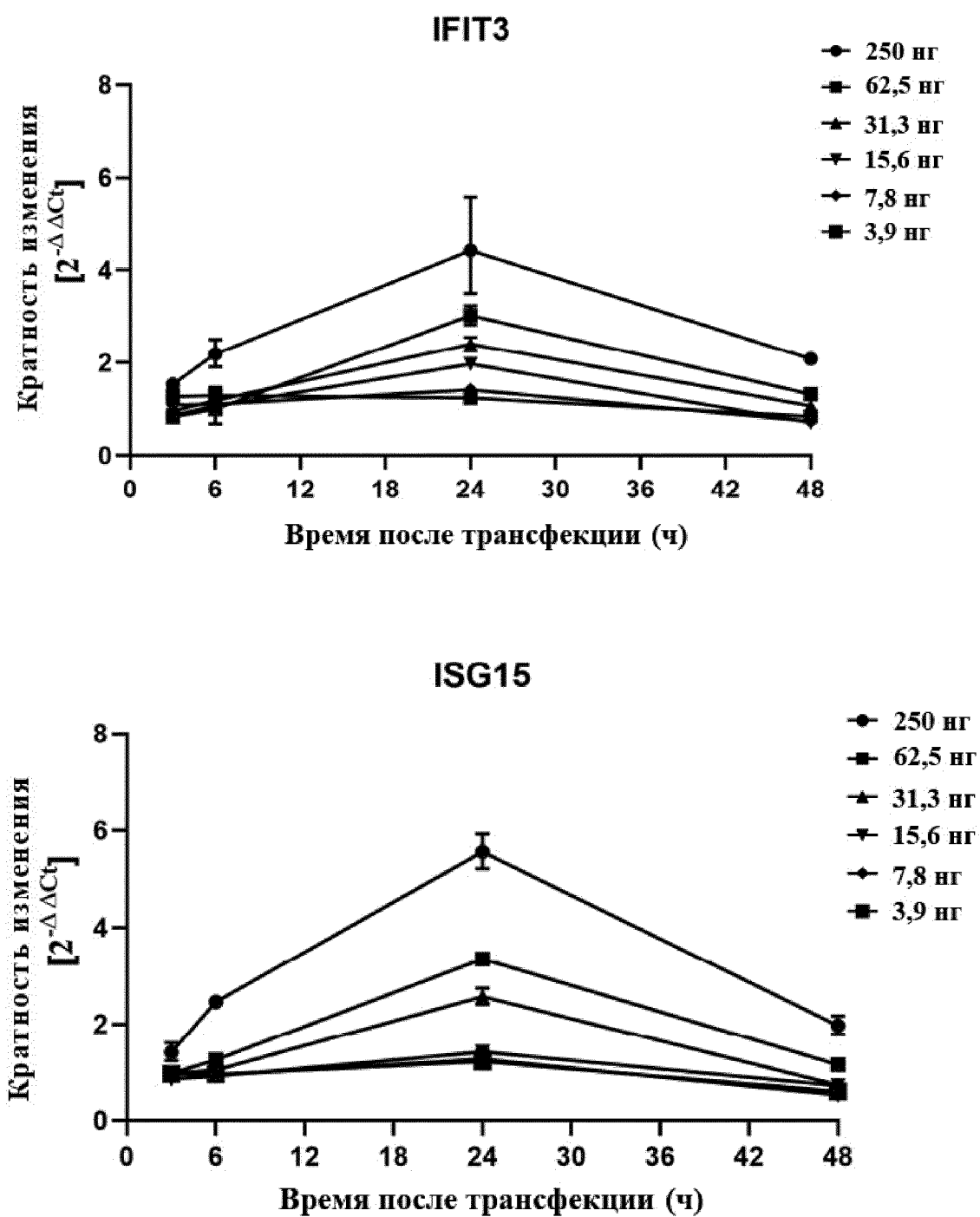
Фигура 9.



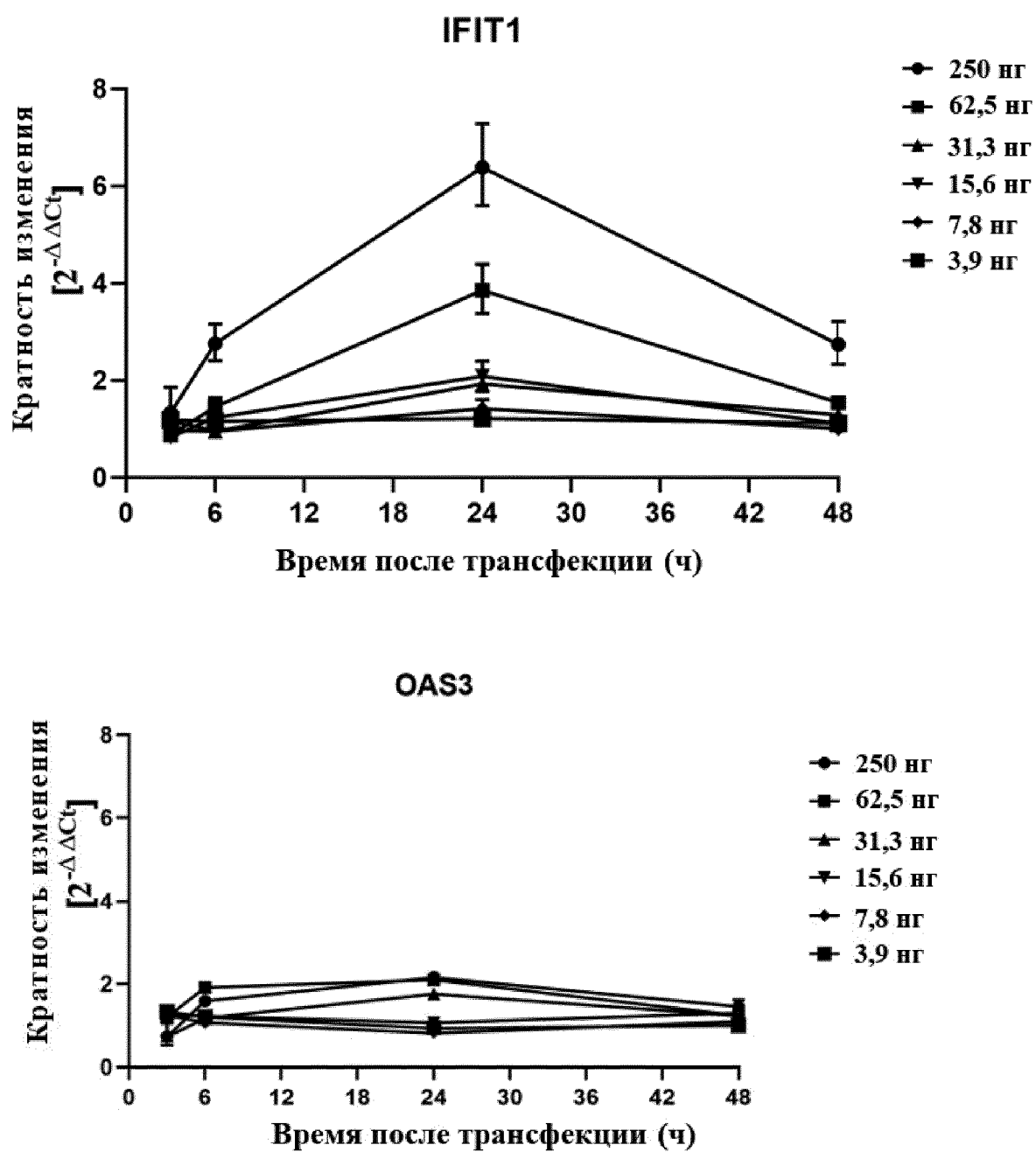
Фигура 10а.



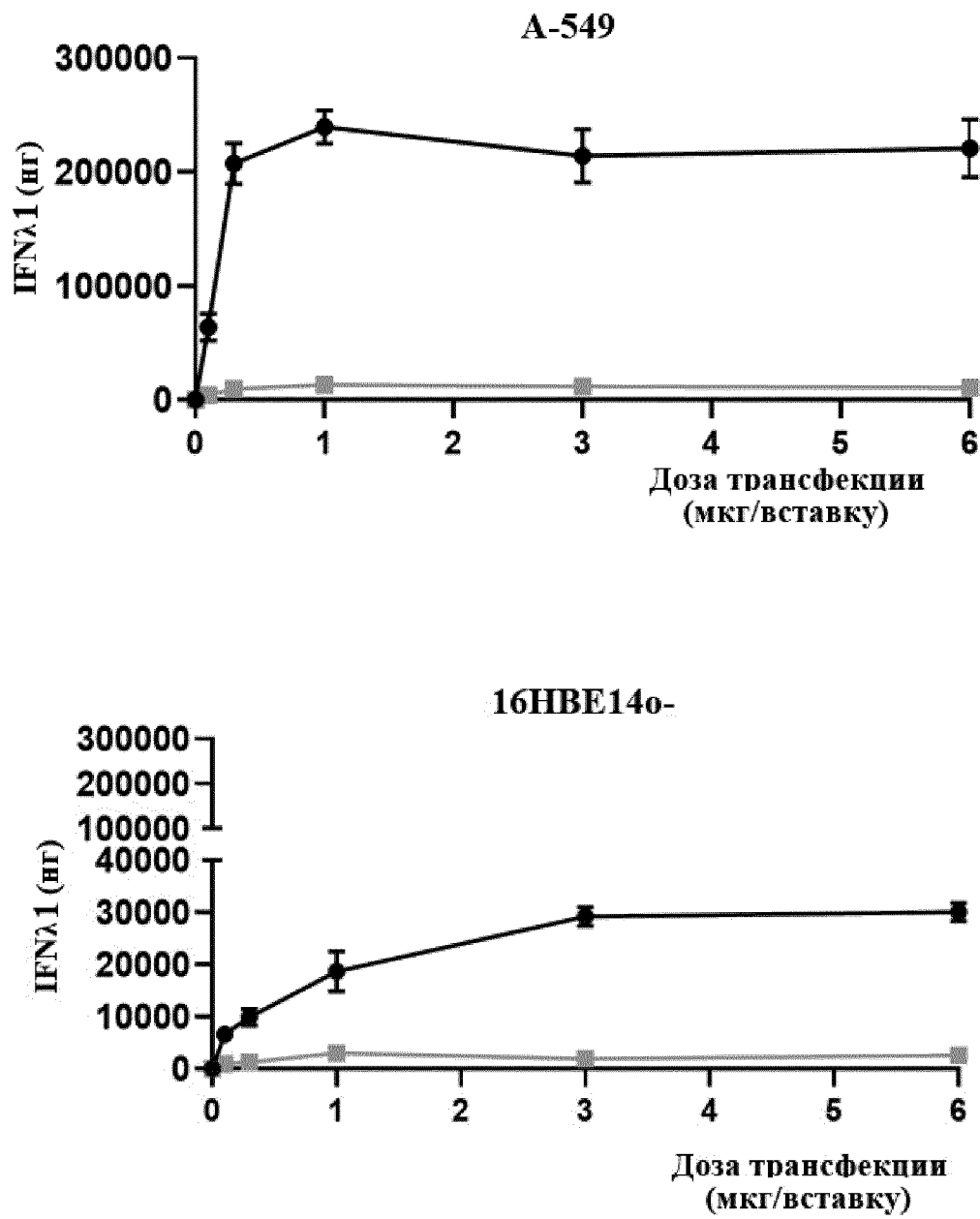
Фигура 10а (продолжение).



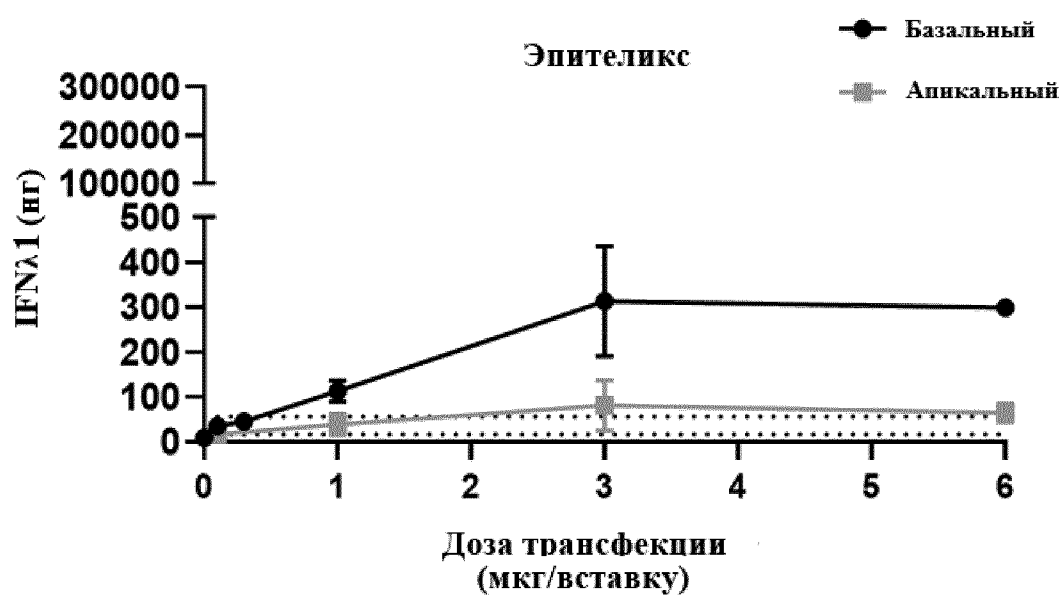
Фигура 106.



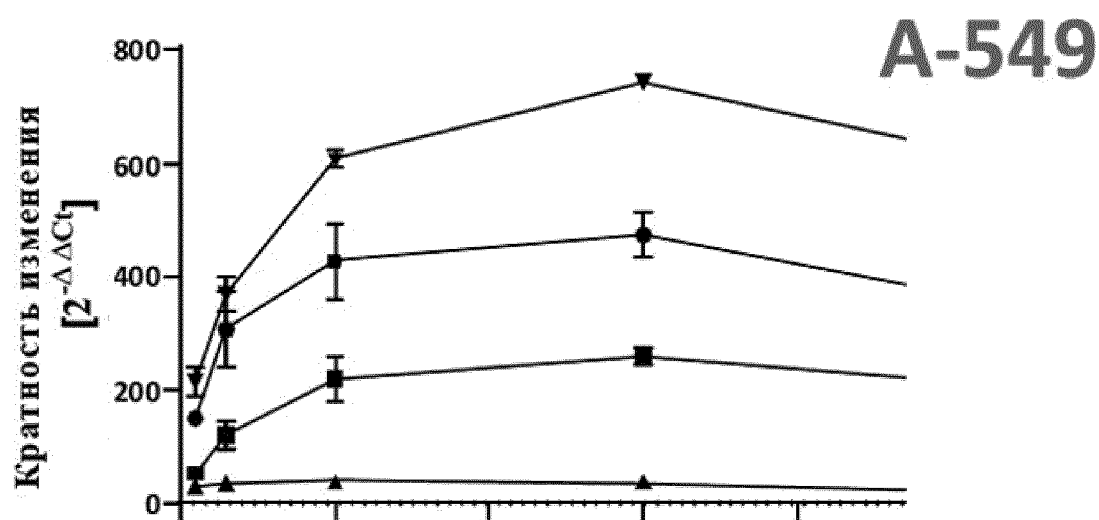
Фигура 10б (продолжение).



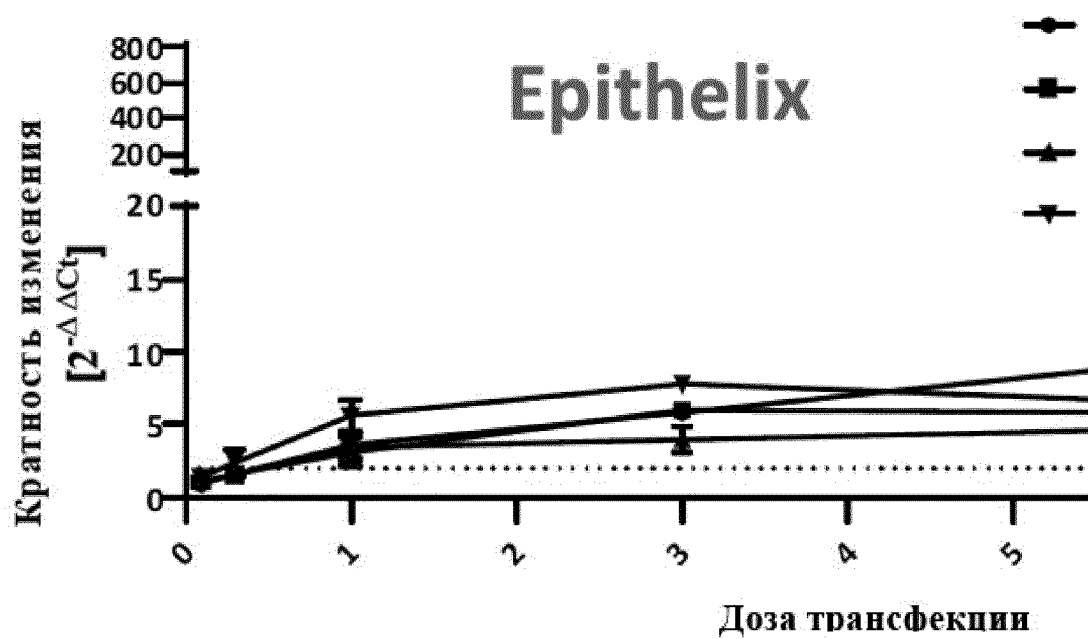
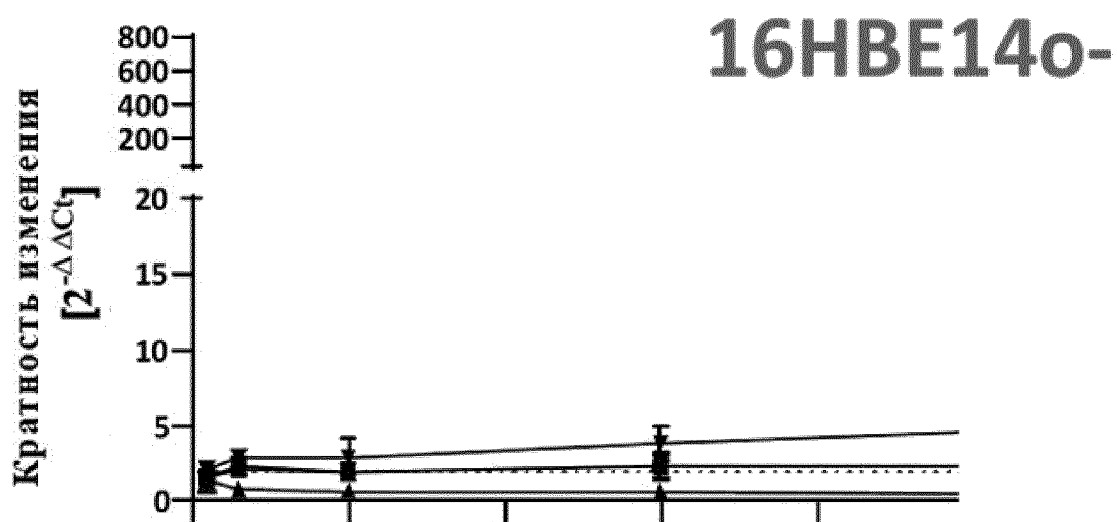
Фигура 11а.



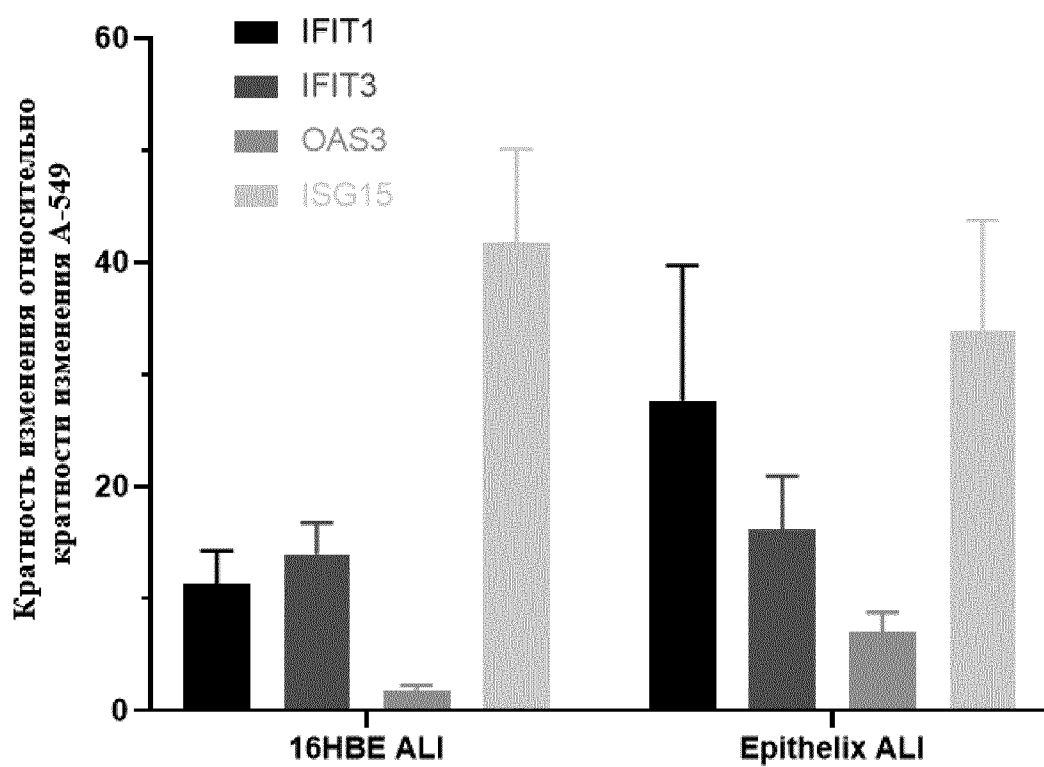
Фигура 11а (продолжение).



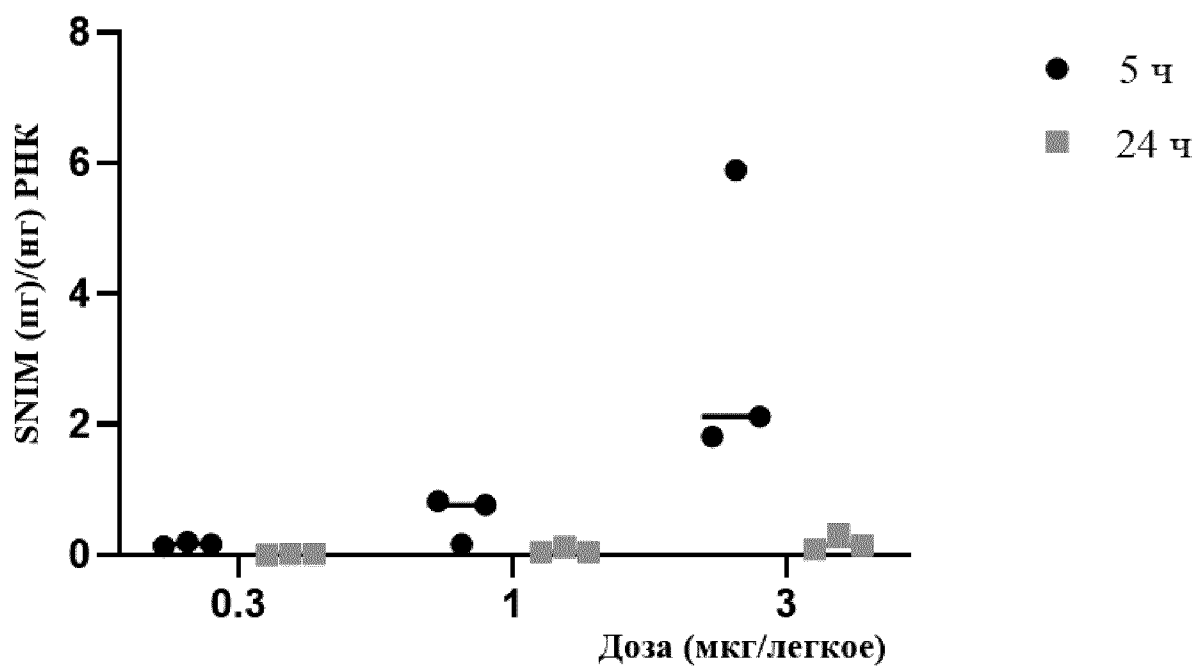
Фигура 11б.



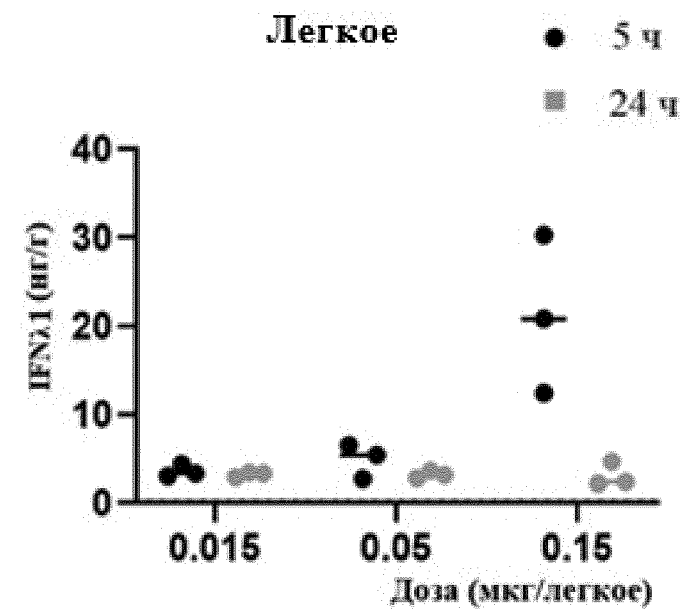
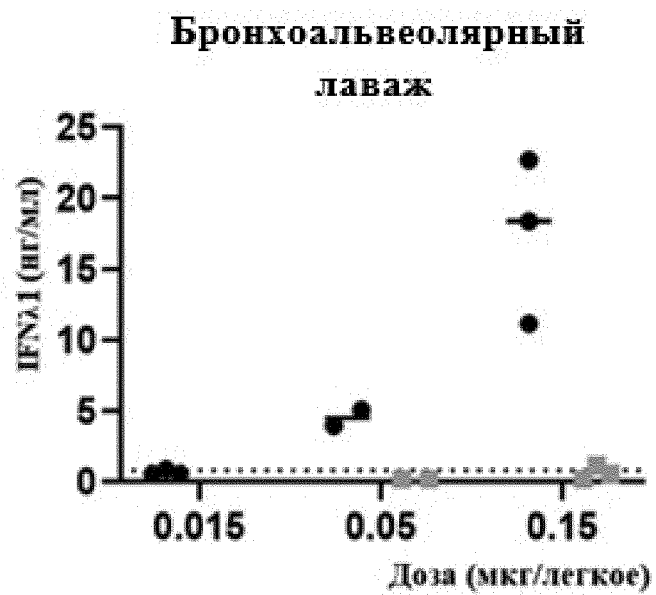
Фигура 11б (продолжение).



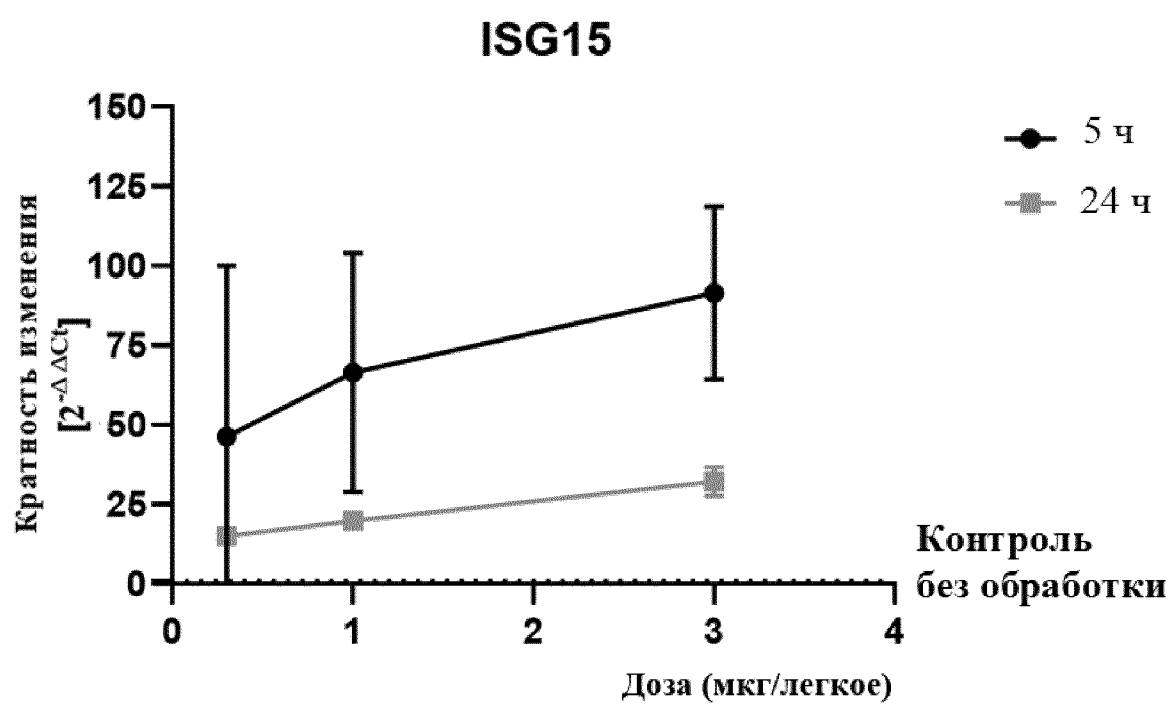
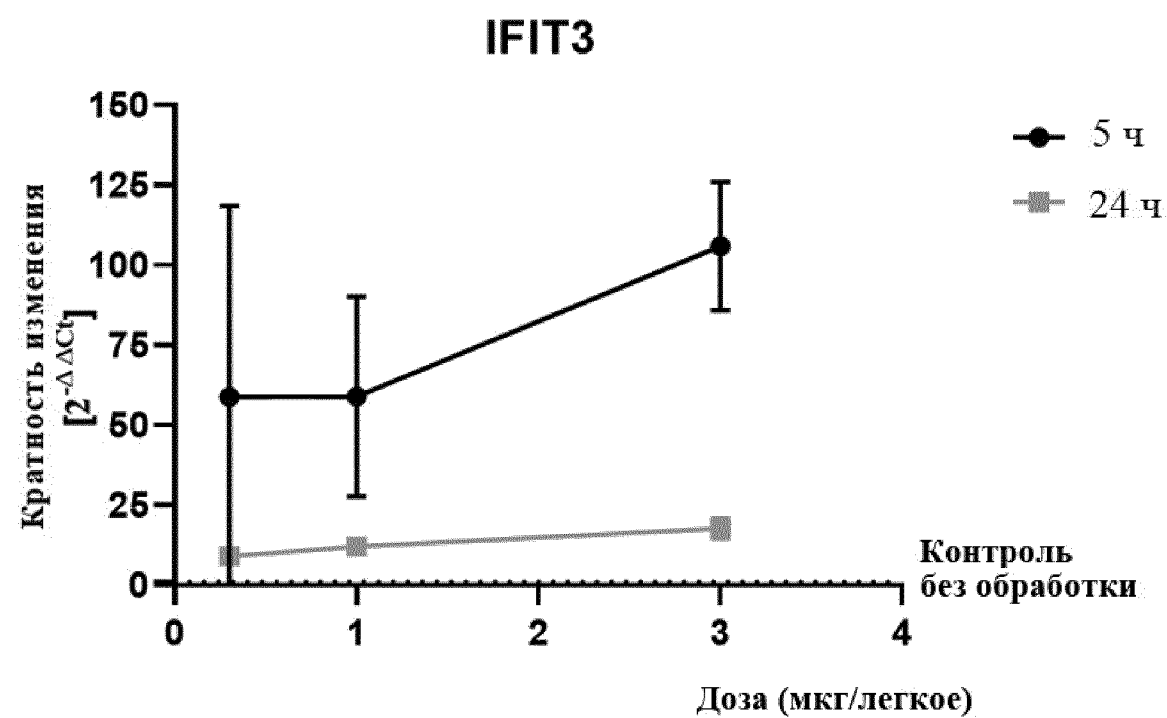
Фигура 11в.



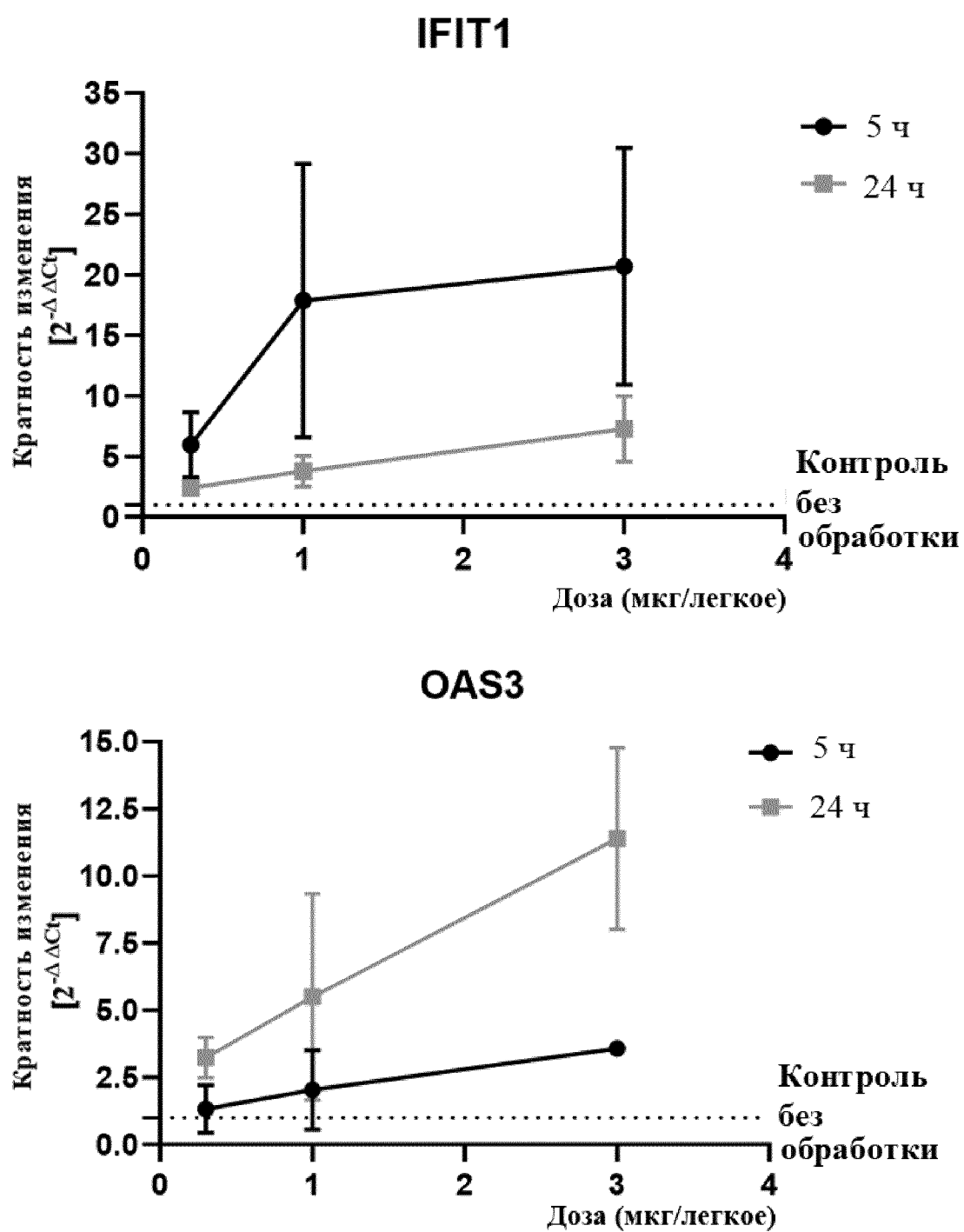
Фигура 12а.



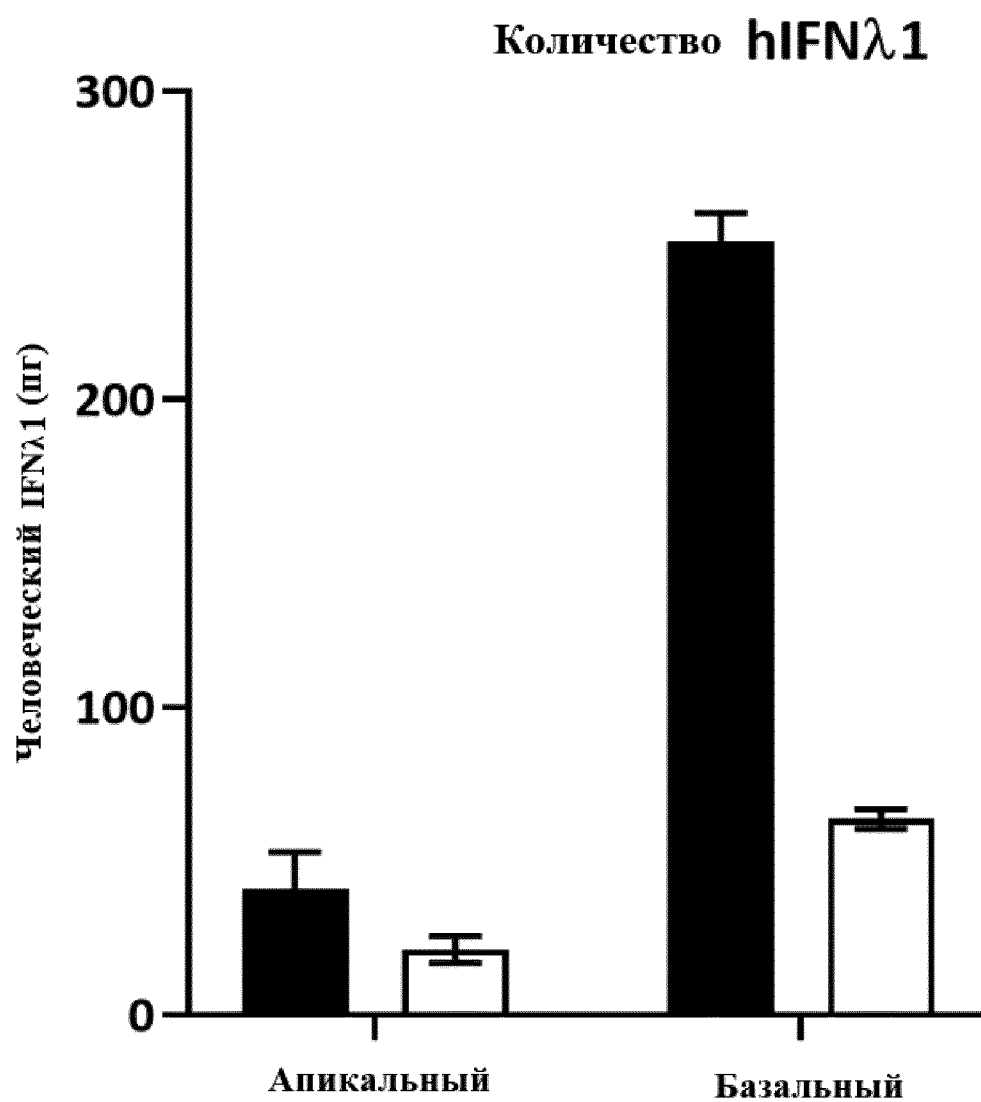
Фигура 126.



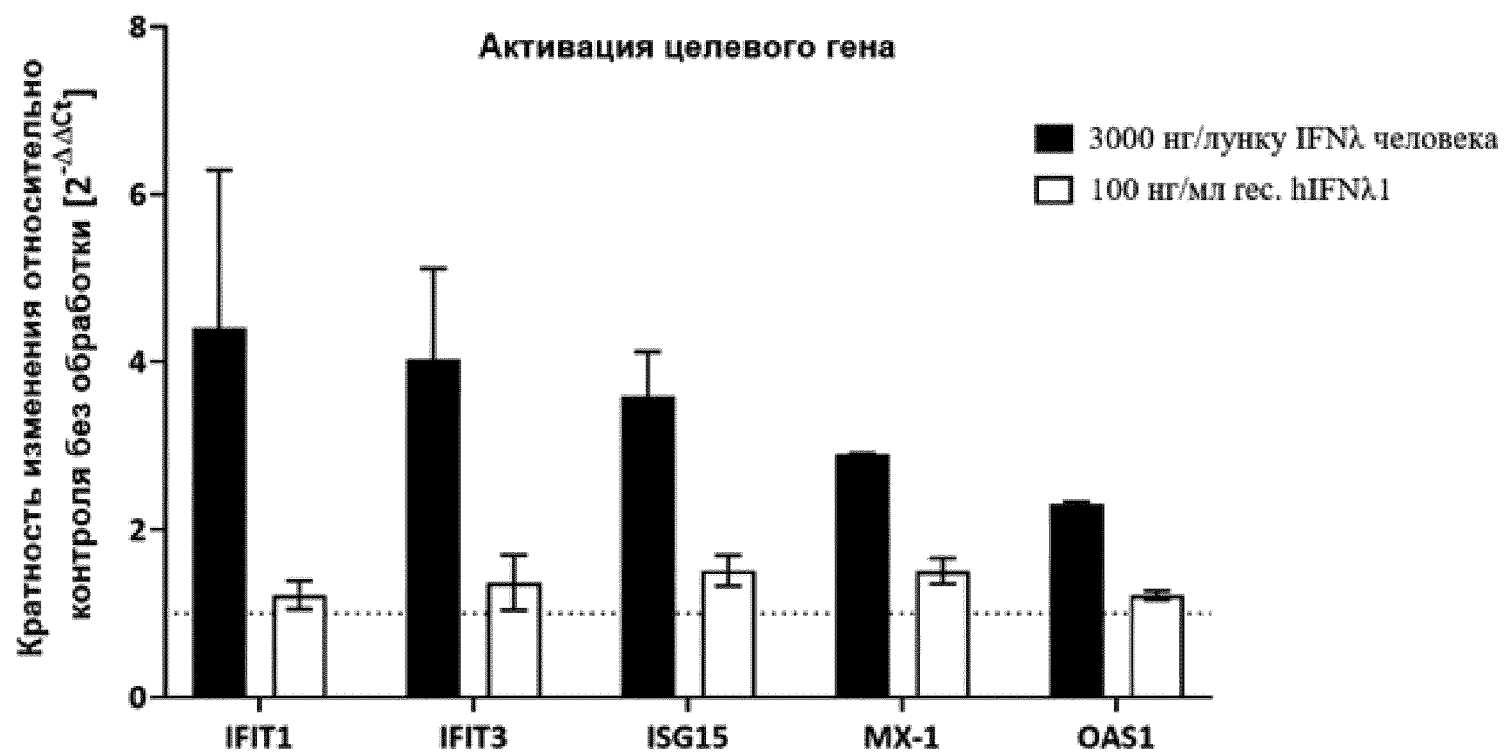
Фигура 12в.



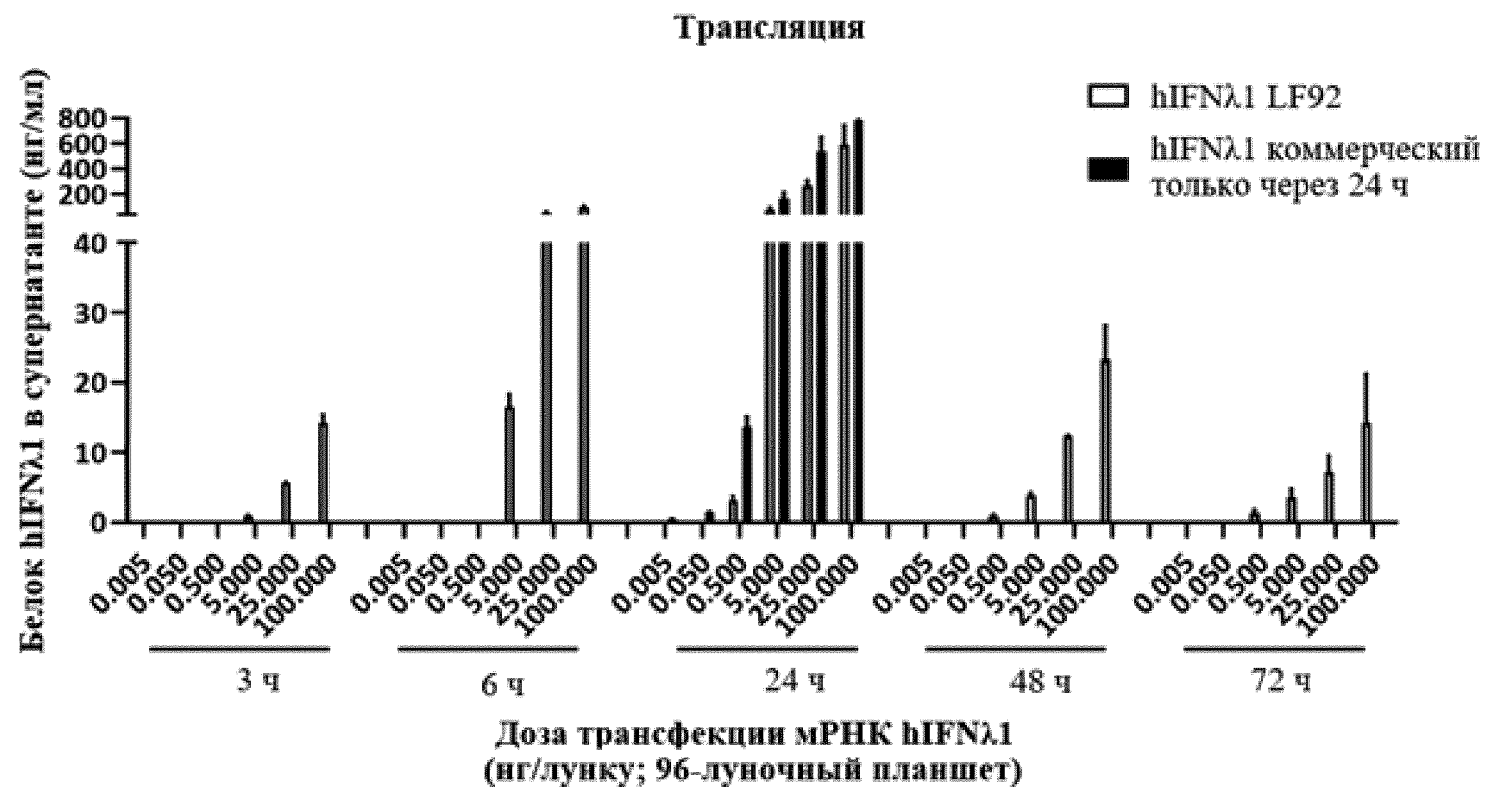
Фигура 12в (продолжение).



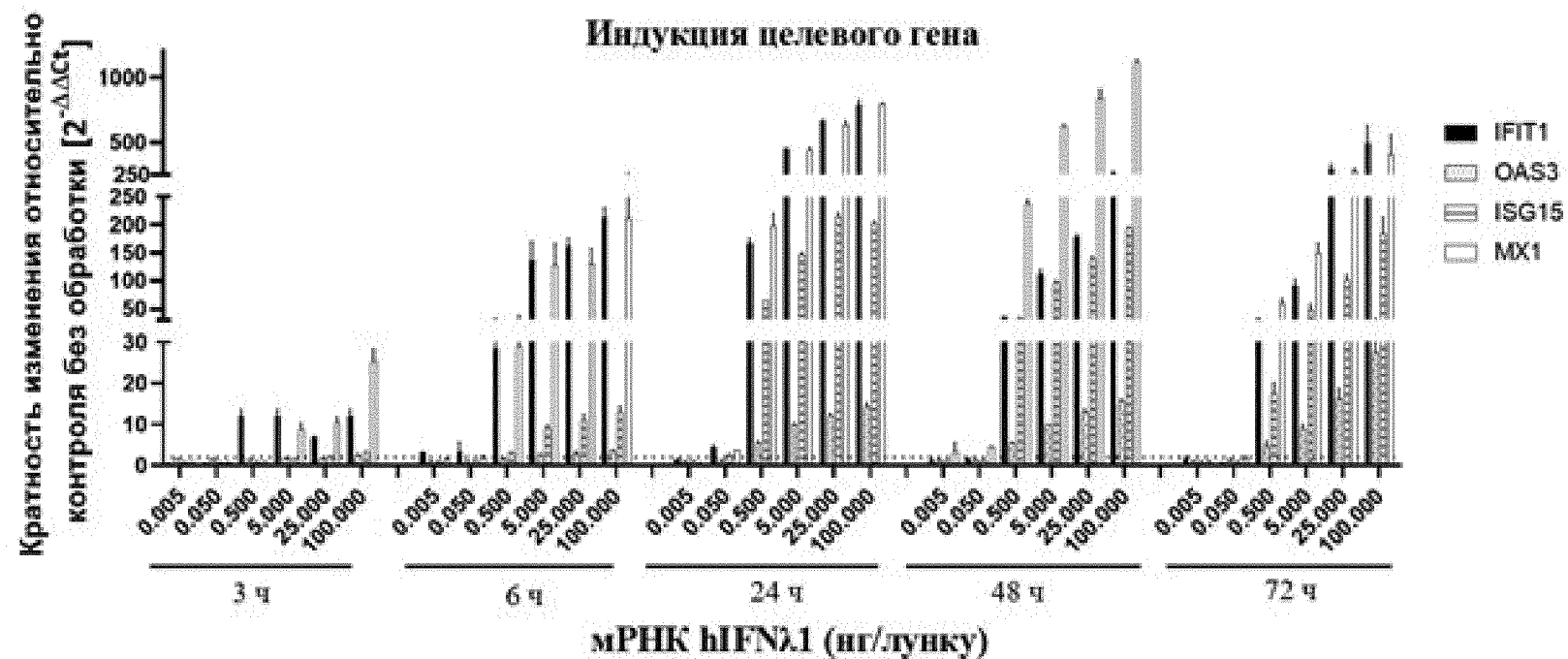
Фигура 13а.



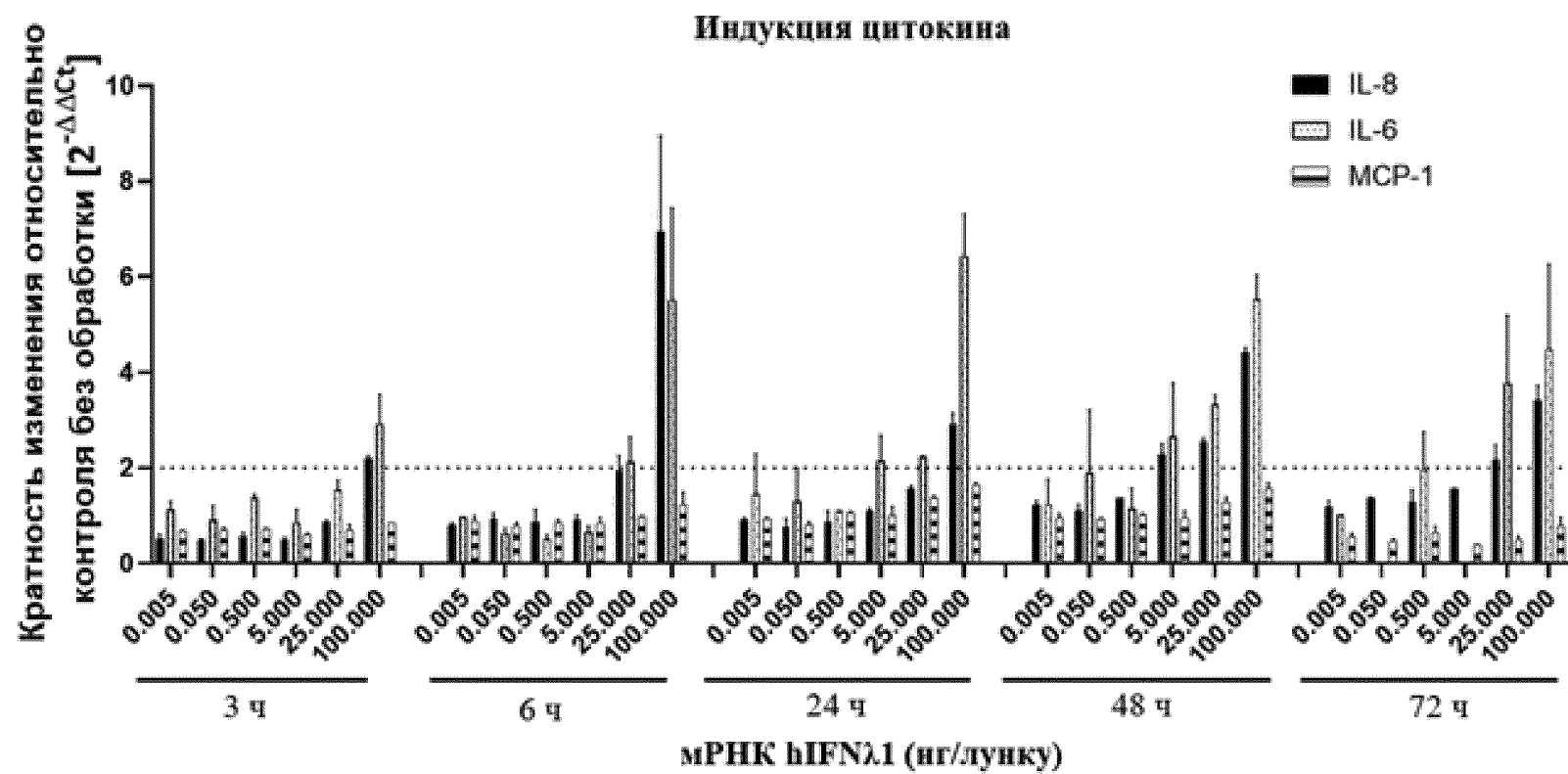
Фигура 136.



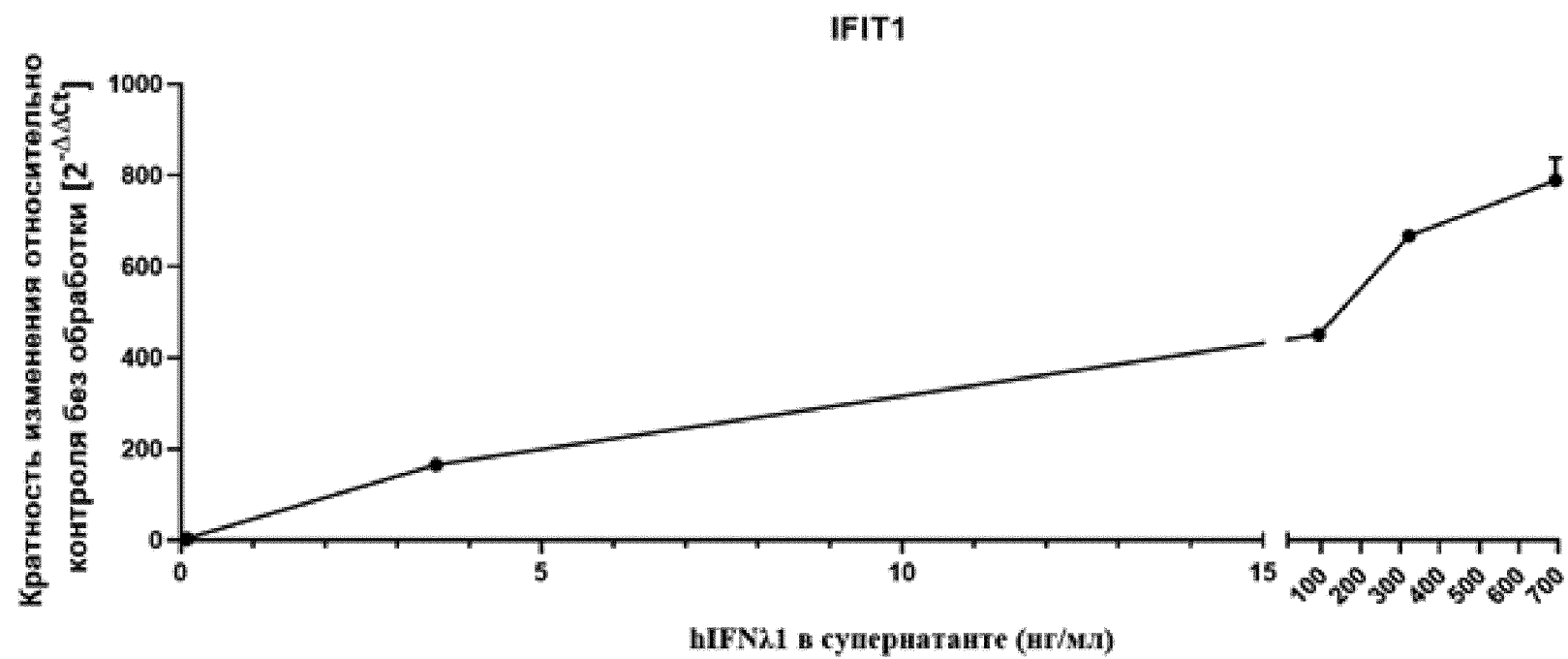
Фигура 14.



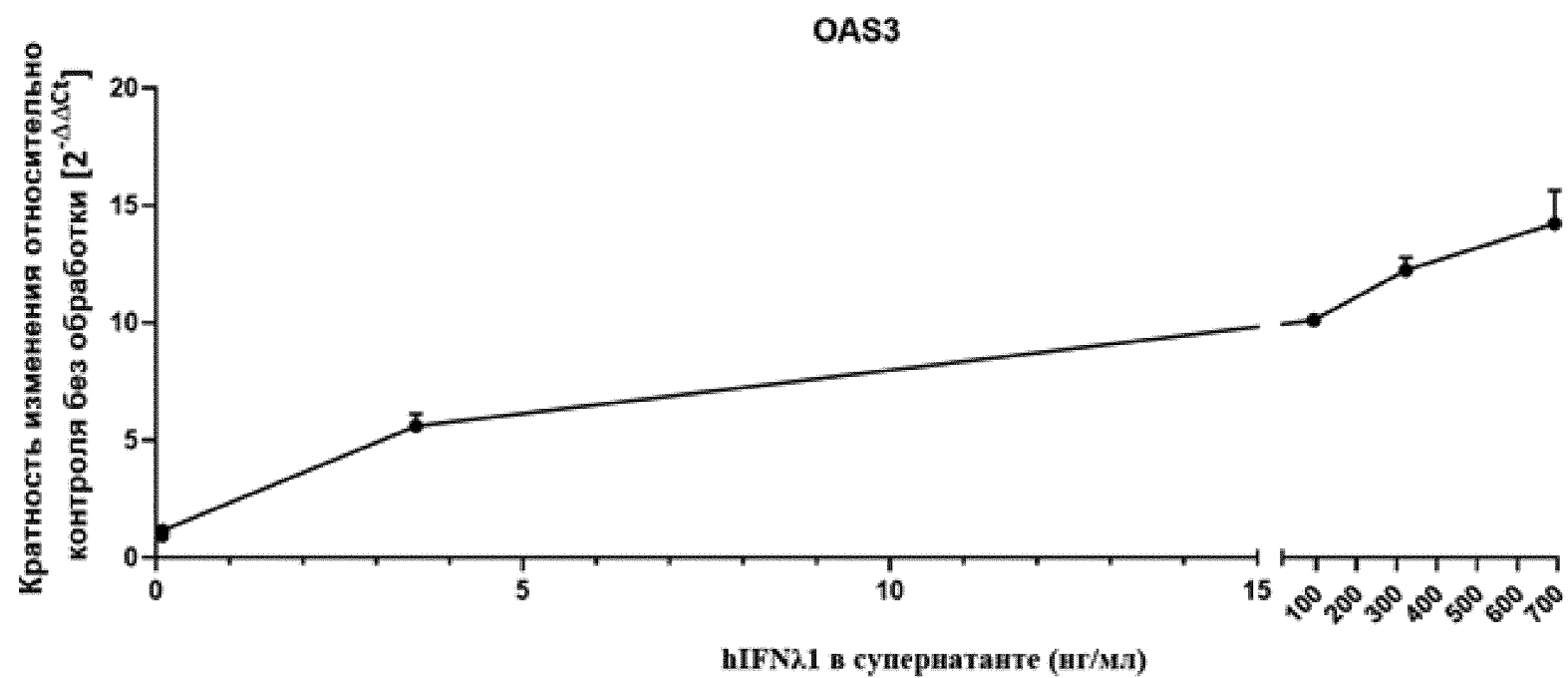
Фигура 15.



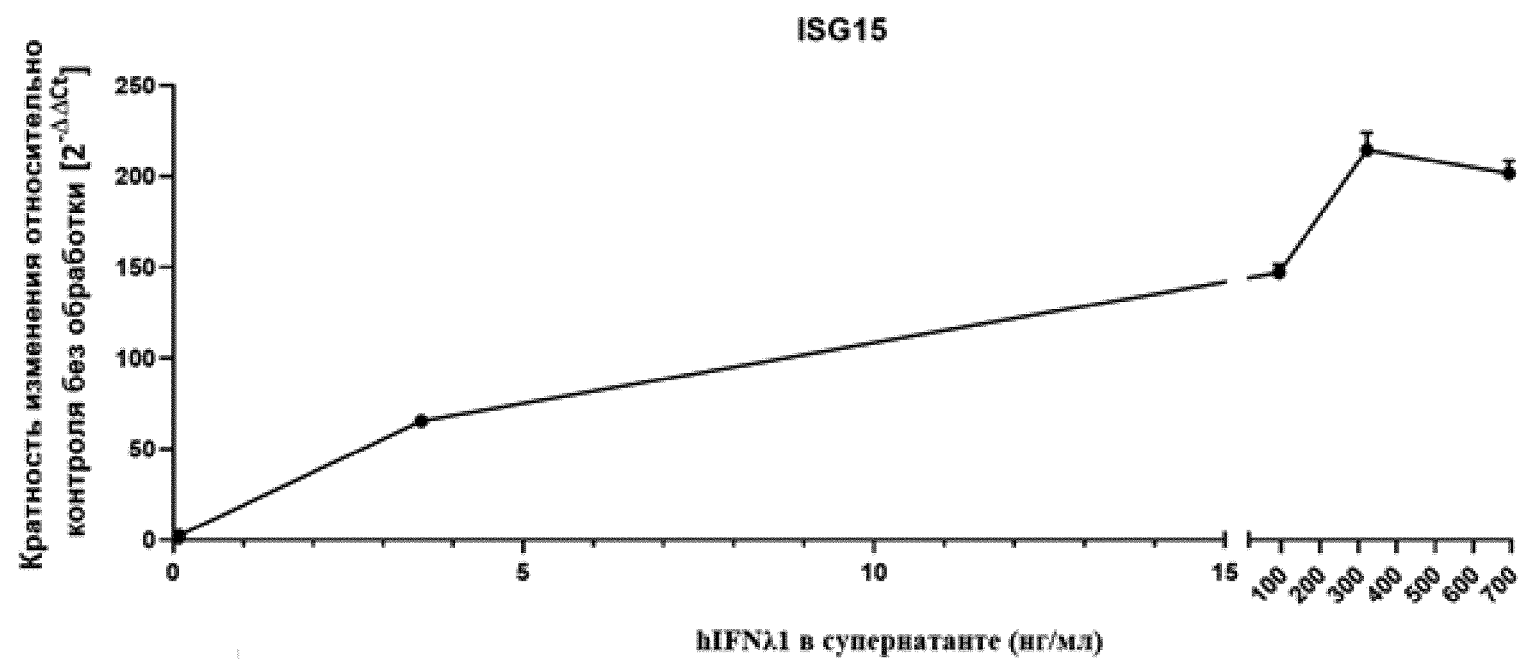
Фигура 16.



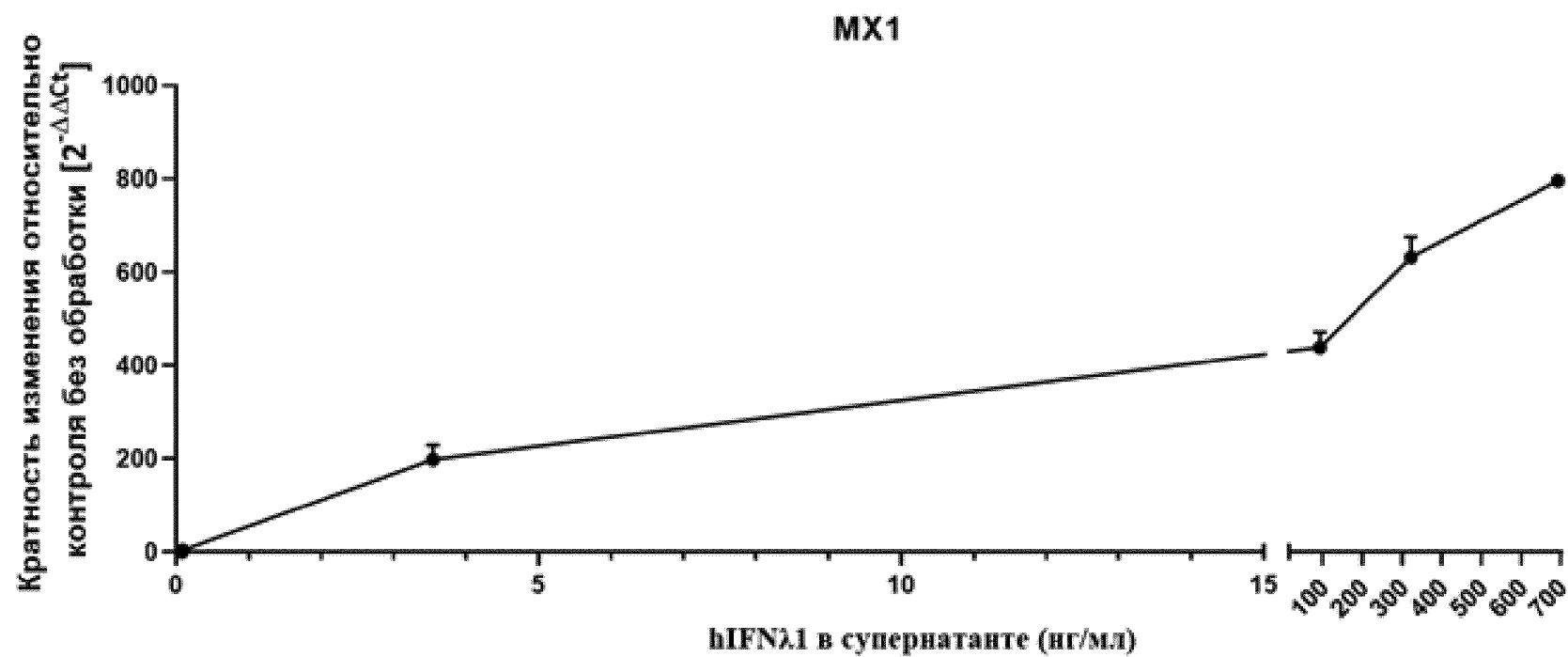
Фигура 17а.



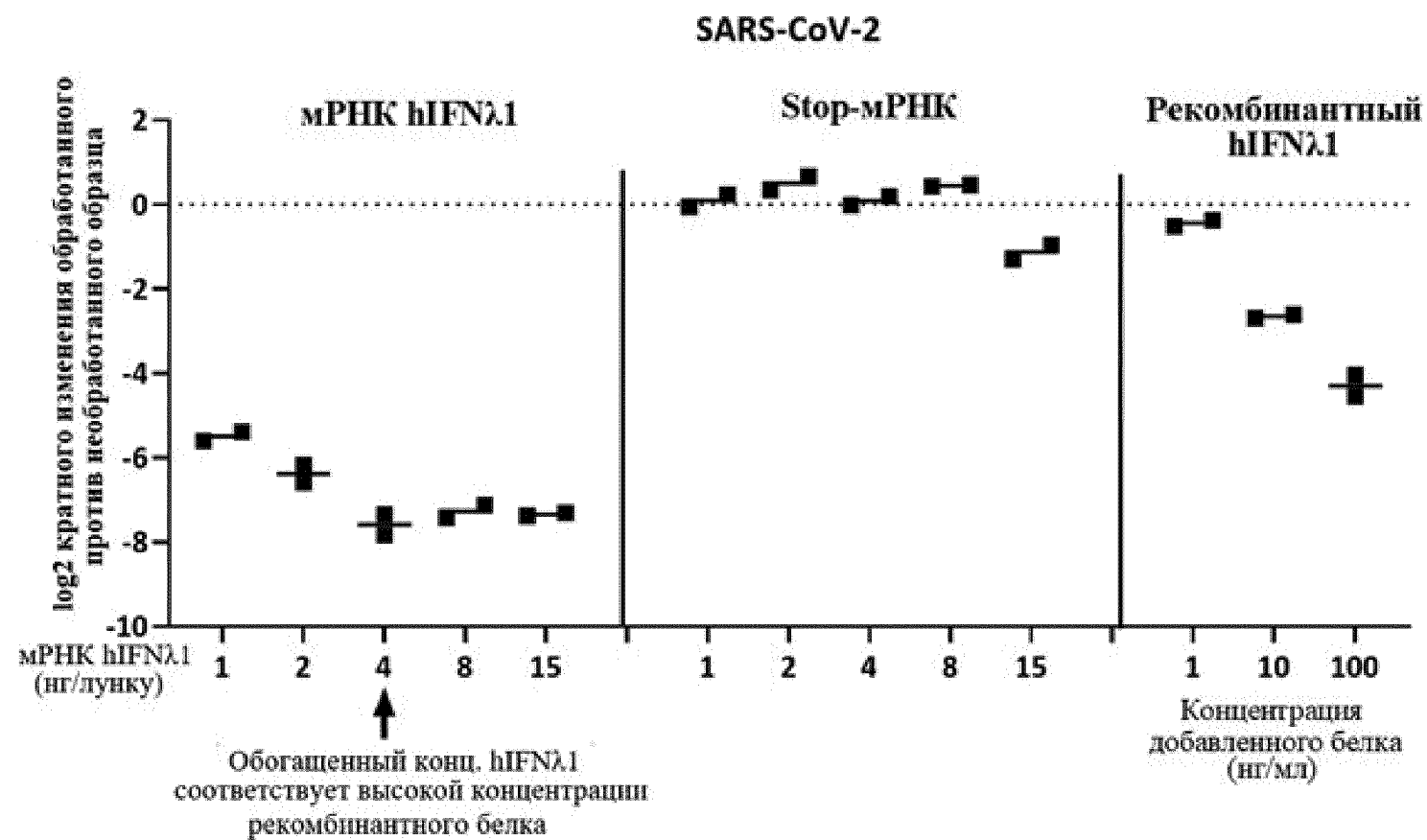
Фигура 176.



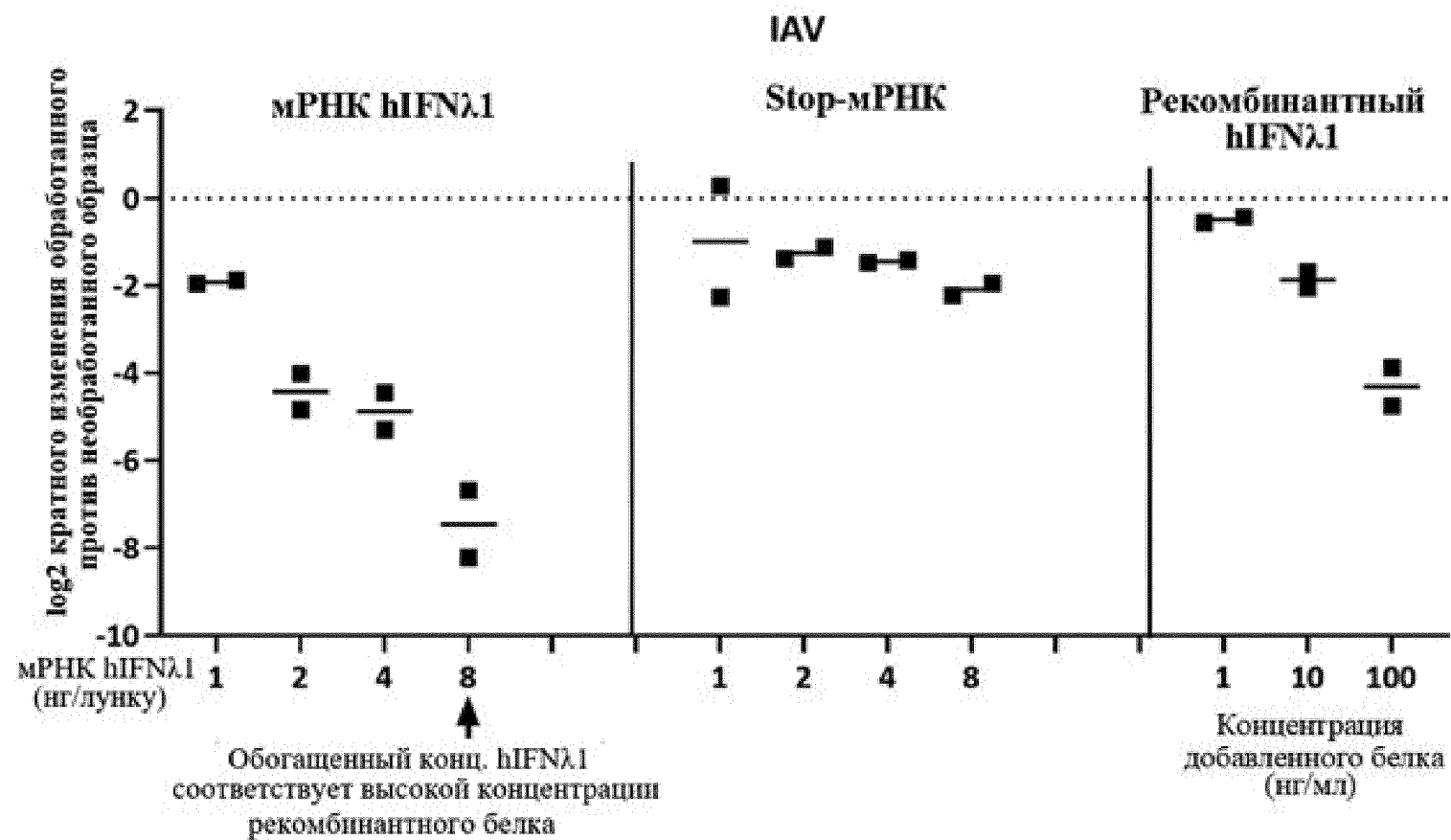
Фигура 17в.



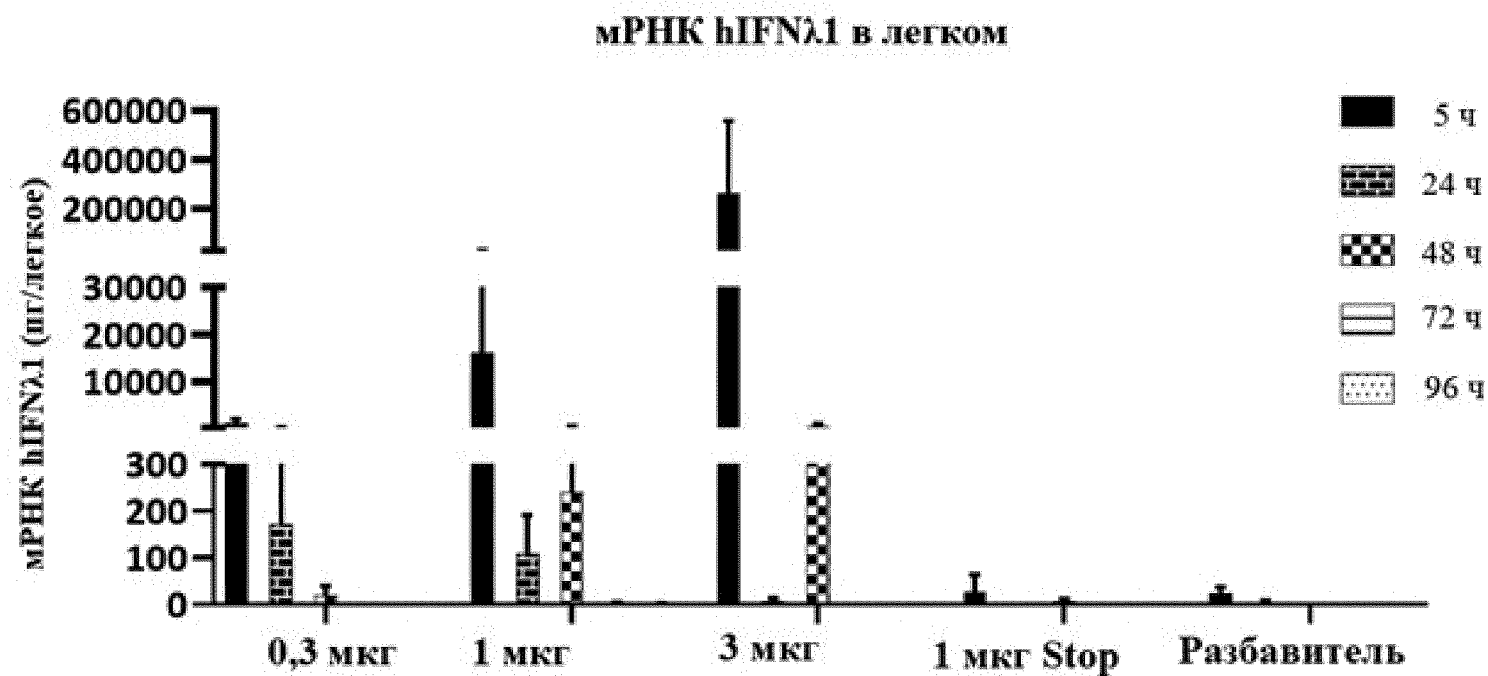
Фигура 17г.



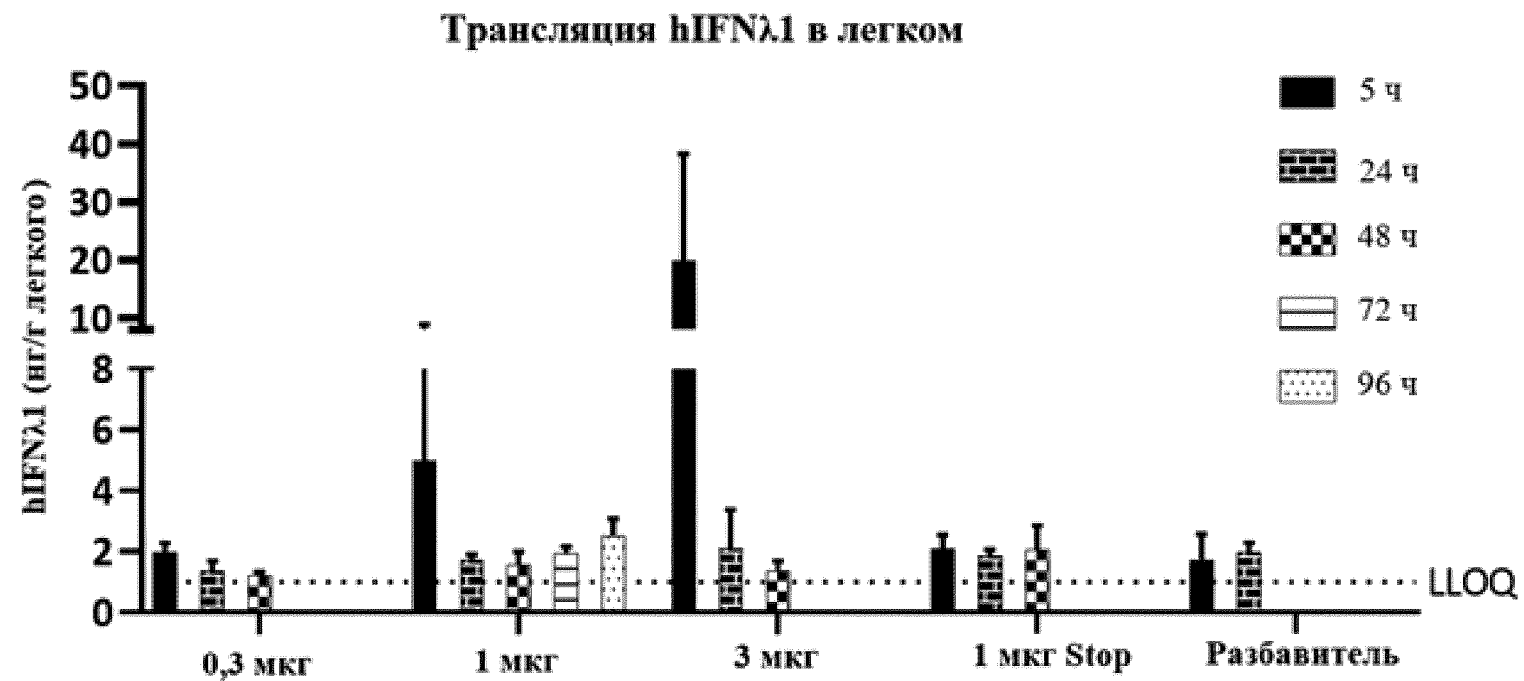
Фигура 18.



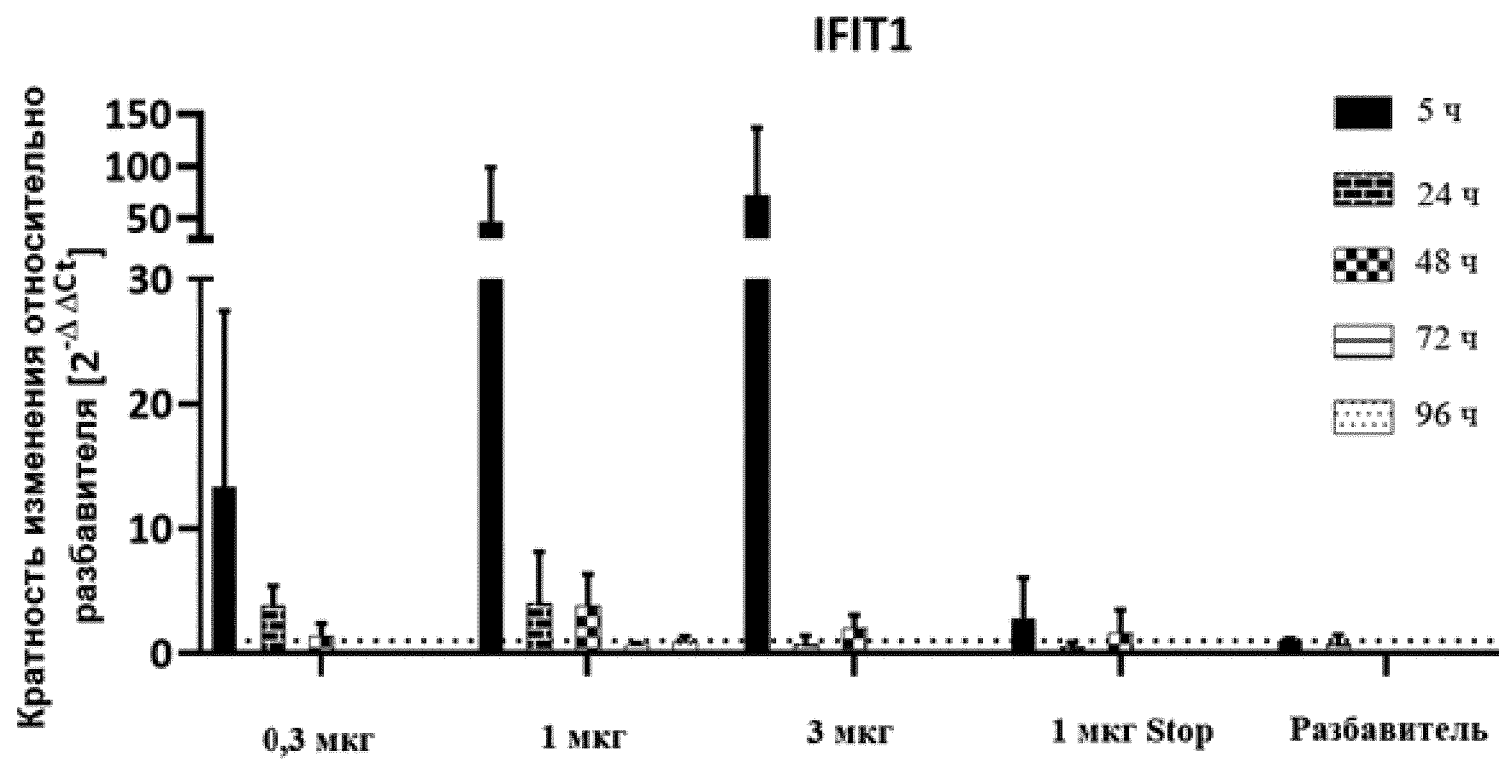
Фигура 18 (продолжение).



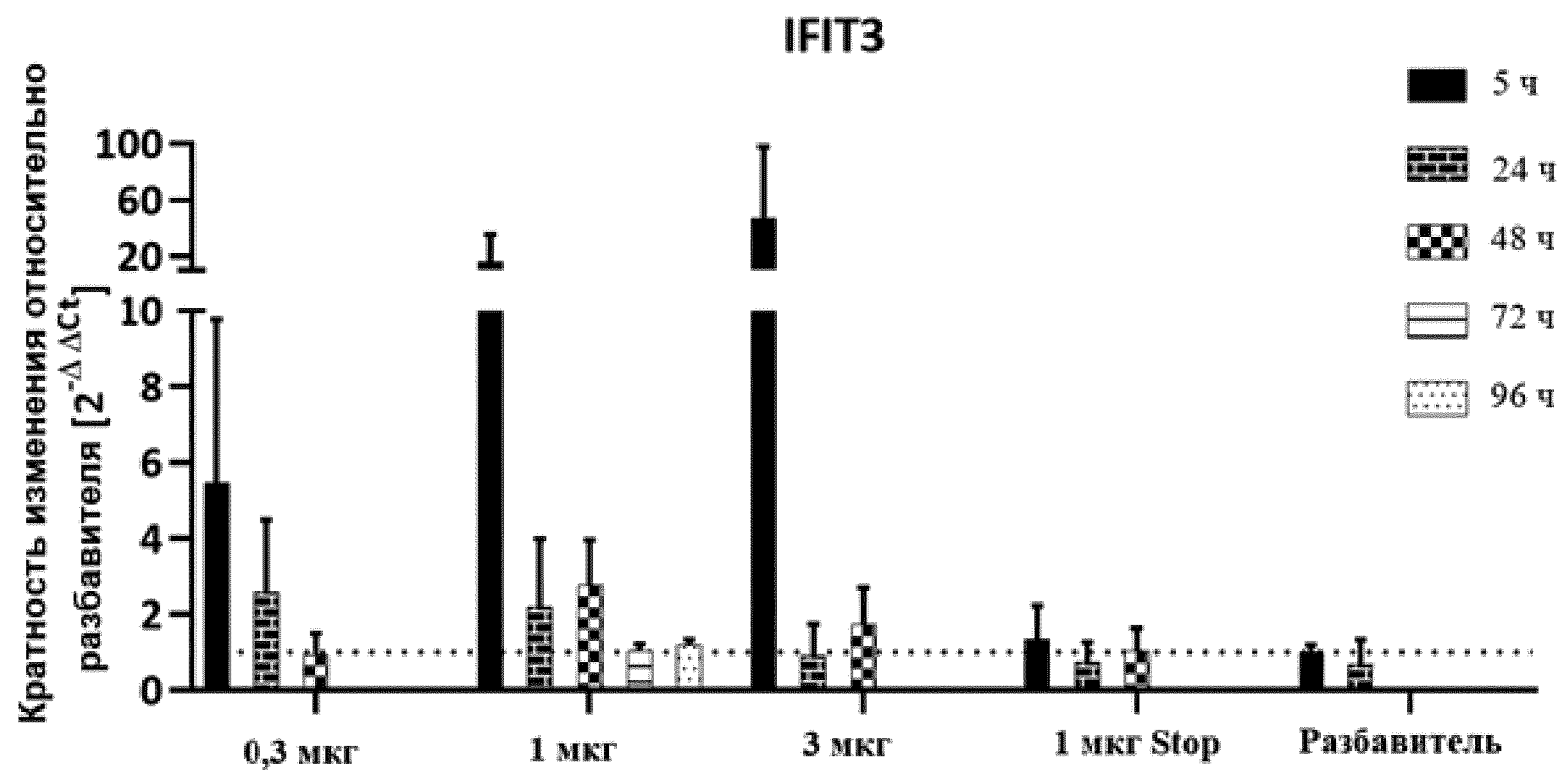
Фигура 19.



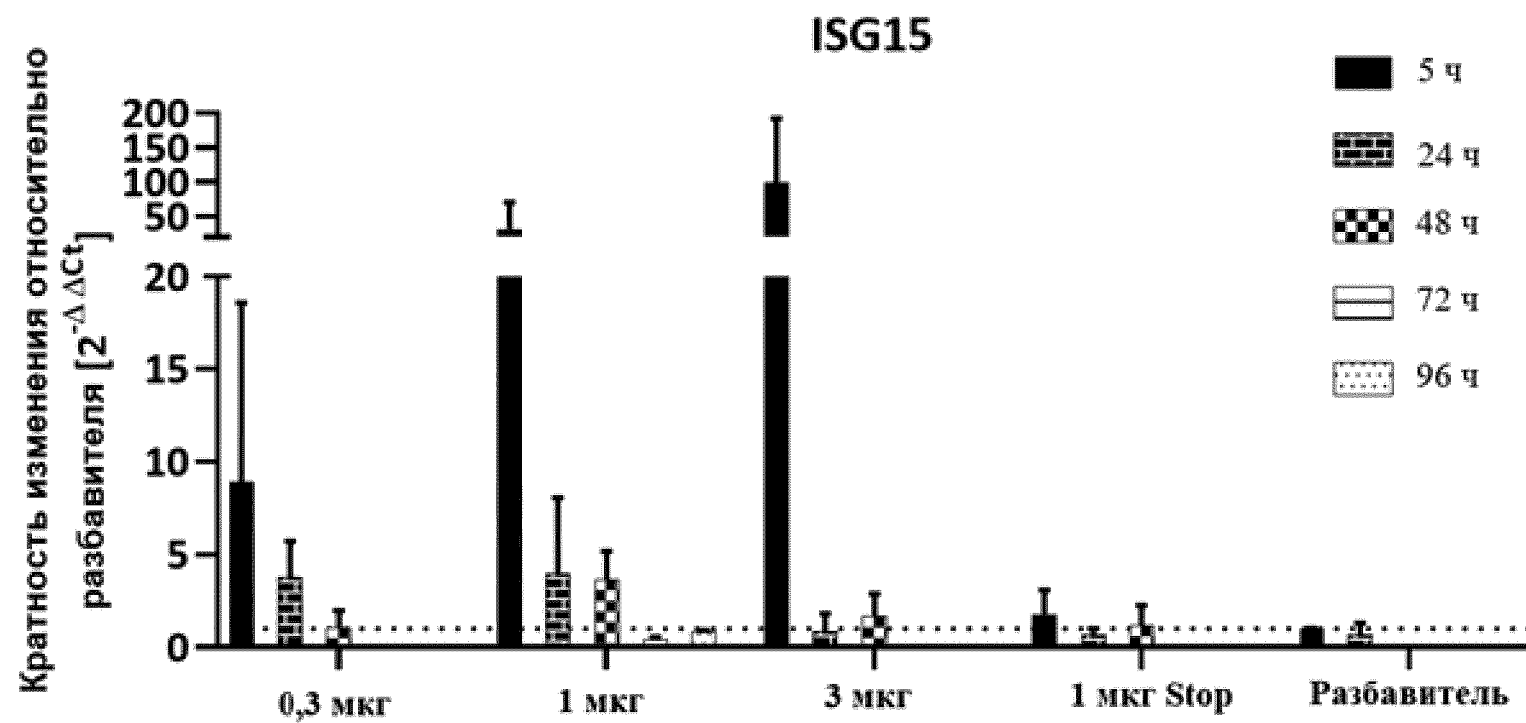
Фигура 20.



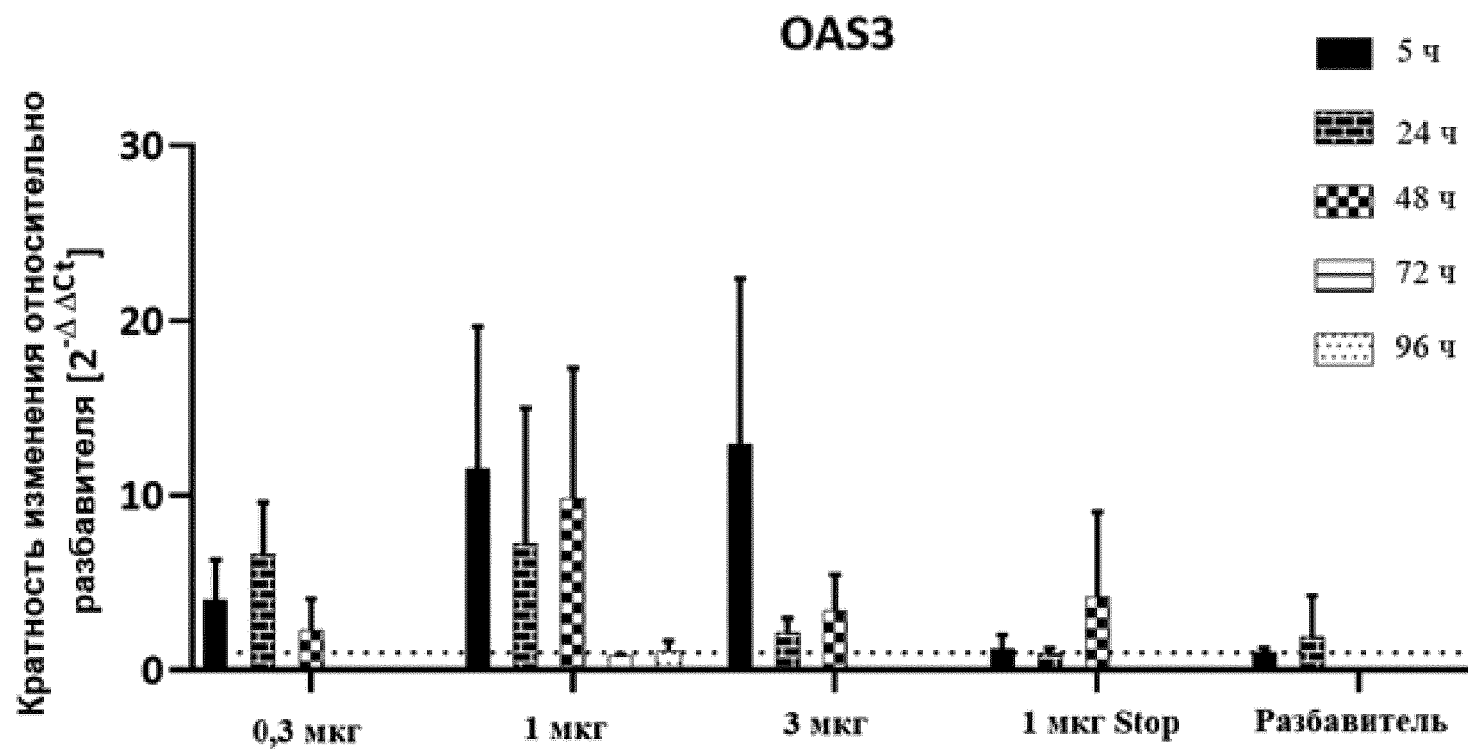
Фигура 21а.



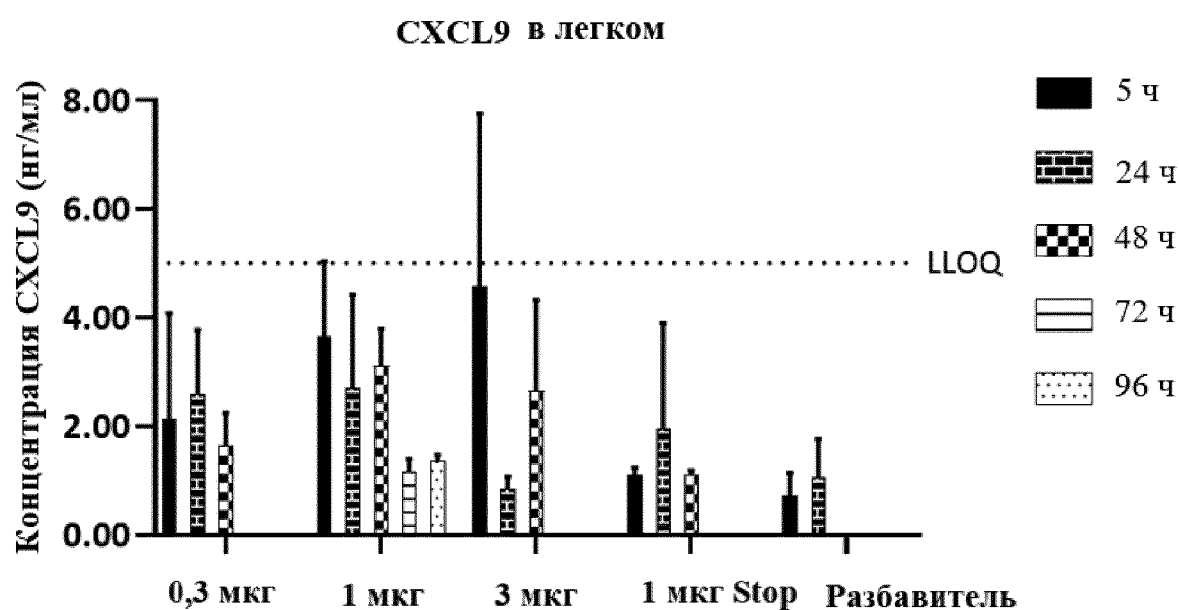
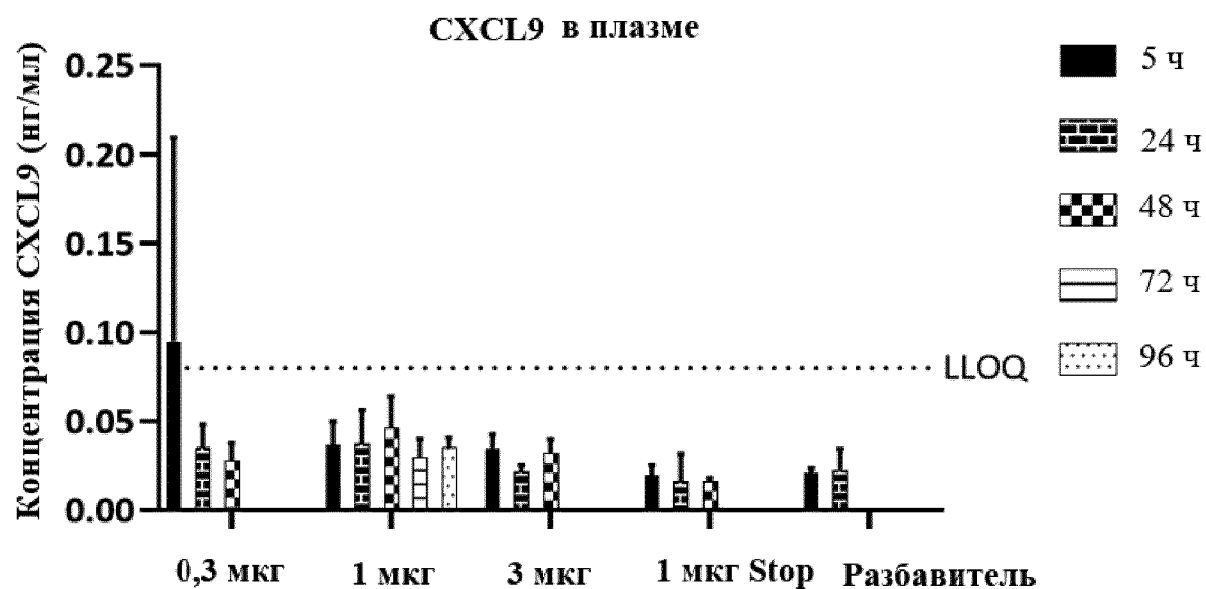
Фигура 216.



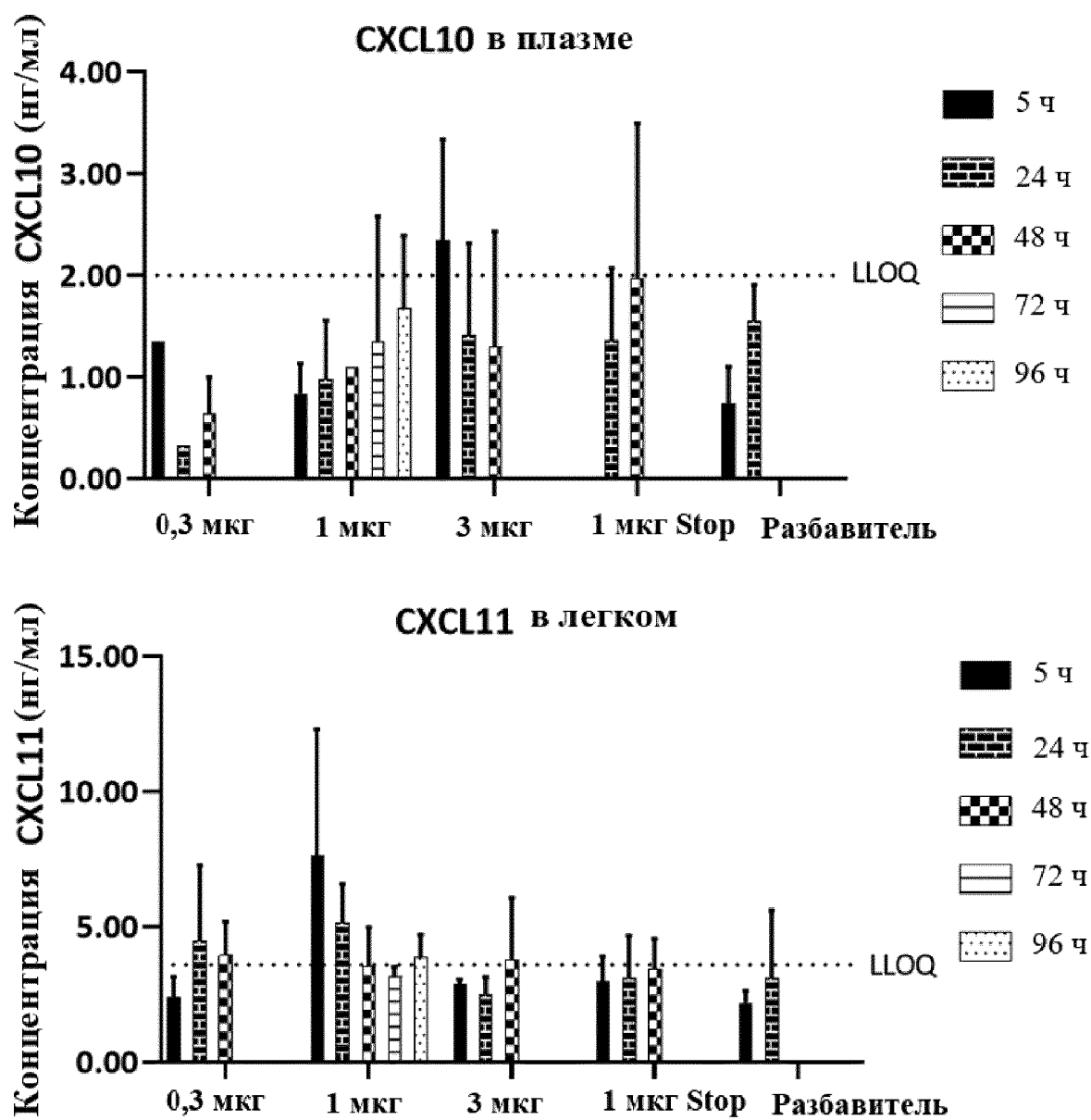
Фигура 21в.



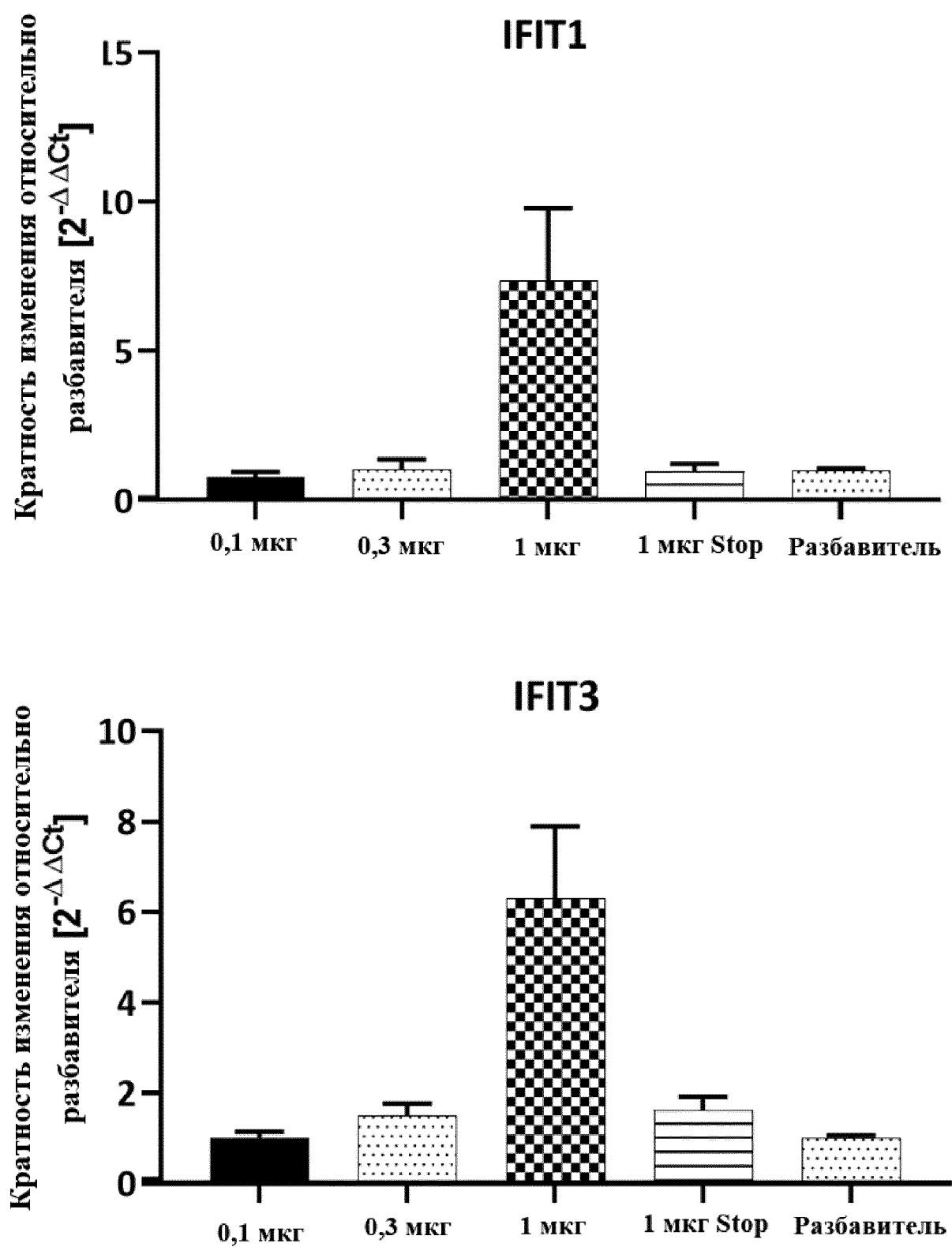
Фигура 21г.



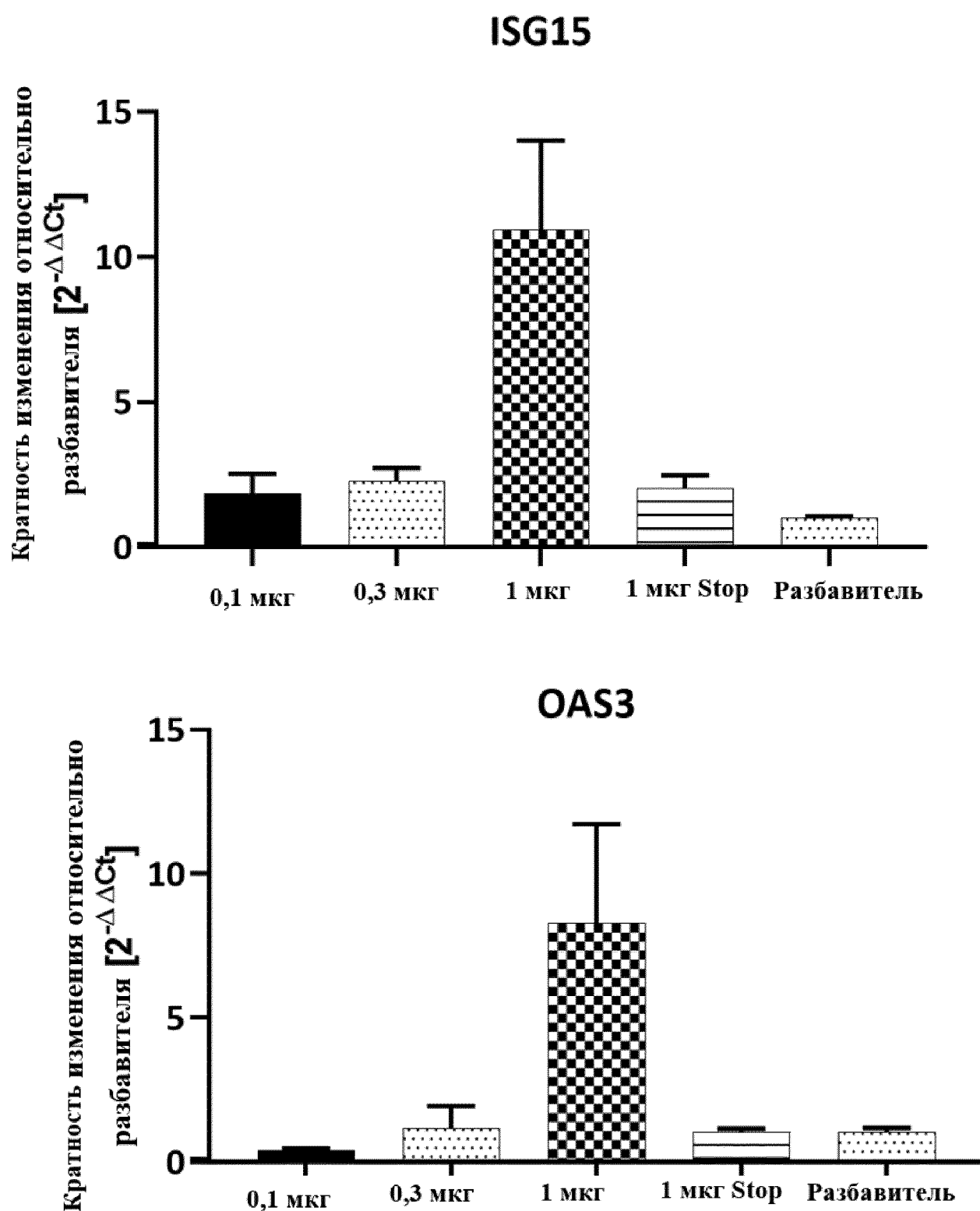
Фигура 22.



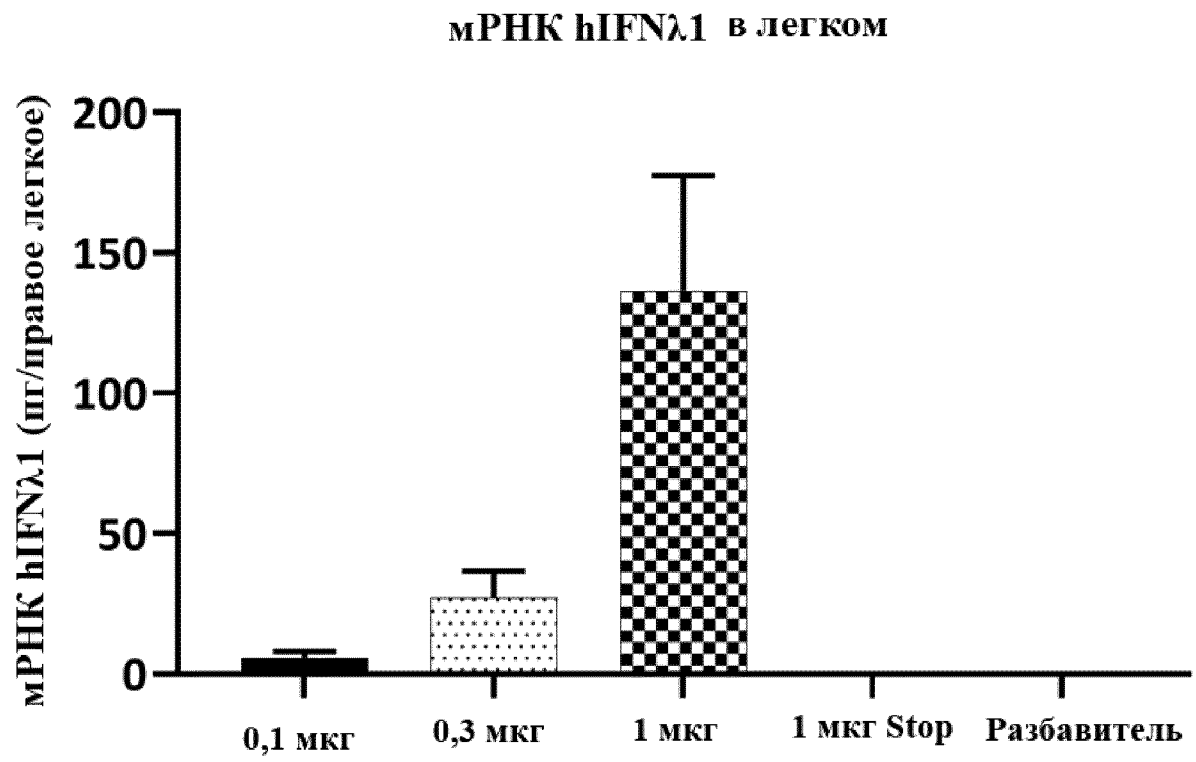
Фигура 22 (продолжение).



Фигура 23.



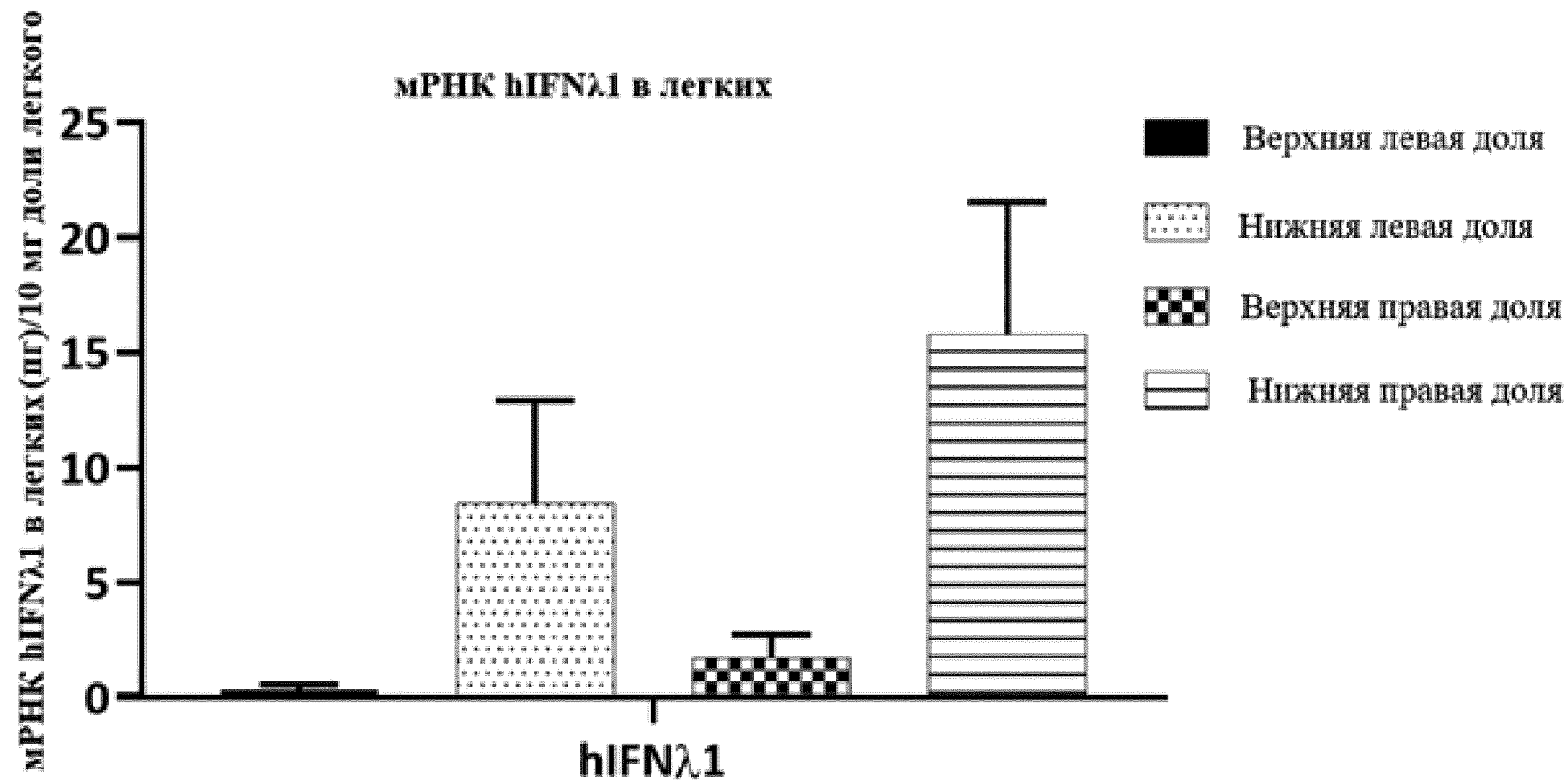
Фигура 23 (продолжение).



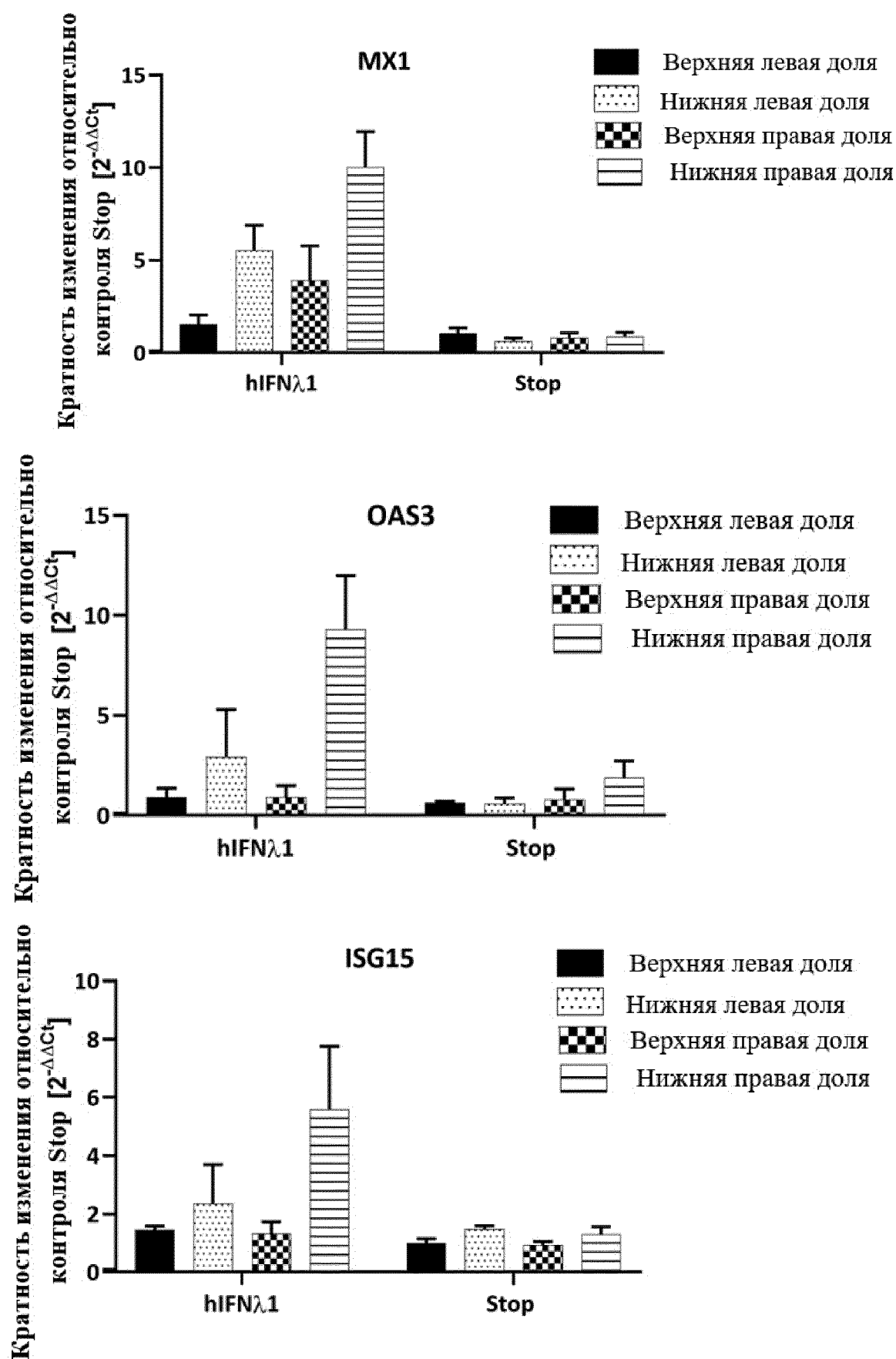
Фигура 24.

Группа	№№ животных	Сутки исследования					
		1	2	3	4	5	6
		Изменение массы тела относительно 1-го дня исследования (%)					
мРНК hIFN λ 1 1 мкг	1.1	0,0	-0,5	1,0	0,0	1,0	3,1
	1.2	0,0	0,6	1,1	-0,6	-3,4	-1,1
	1.3	0,0	-0,5	3,1	2,1	0,5	1,0
	1.4	0,0	0,0	-0,5	0,5	2,1	1,6
	1.5	0,0	2,5	5,0	5,0	5,9	4,5
	1.6	0,0	0,6	4,4	3,9	3,9	2,2
мРНК hIFN λ 1 0,3 мкг	2.1	0,0	-1,5	-1,0	-1,9	1,5	3,4
	2.2	0,0	-1,5	-2,5	-3,9	-2,5	1,5
	2.3	0,0	-0,9	-1,9	-5,1	-3,7	-2,3
	2.4	0,0	-1,0	-0,5	-1,0	-1,5	-1,5
	2.5	0,0	0,5	2,7	2,2	-0,5	-1,1
	2.6	0,0	2,5	4,5	3,0	1,5	3,0
мРНК hIFN λ 1 1 мкг	3.1	0,0	0,0	4,0	3,5	4,5	4,5
	3.2	0,0	0,0	0,5	1,6	2,1	0,5
	3.3	0,0	0,5	0,5	0,0	-0,5	-0,9
	3.4	0,0	-1,0	2,6	2,6	1,6	1,6
	3.5	0,0	-0,5	-1,0	-1,5	-1,0	1,0
	3.6	0,0	0,5	2,7	2,2	1,6	6,5
Stop-мРНК	4.1	0,0	-0,6	-2,8	-2,8	-4,0	0,0
	4.2	0,0	-0,5	-0,5	-1,1	-1,6	4,3
	4.3	0,0	1,0	2,6	3,6	2,1	1,6
	4.4	0,0	-0,5	-1,6	-1,1	0,0	0,0
	4.5	0,0	2,5	6,5	6,0	5,5	6,0
	4.6	0,0	1,0	3,5	0,5	-1,5	1,0
Разбавитель	5.1	0,0	1,7	5,0	4,5	2,2	2,2
	5.2	0,0	-1,9	-5,6	-6,5	-6,5	-5,1
	5.3	0,0	-0,5	-0,5	-0,5	-1,0	2,0
	5.4	0,0	1,0	2,5	4,1	0,5	2,0
	5.5	0,0	-0,5	0,0	-1,5	-0,5	0,0
	5.6	0,0	-0,6	-1,1	-1,7	-1,1	-0,6

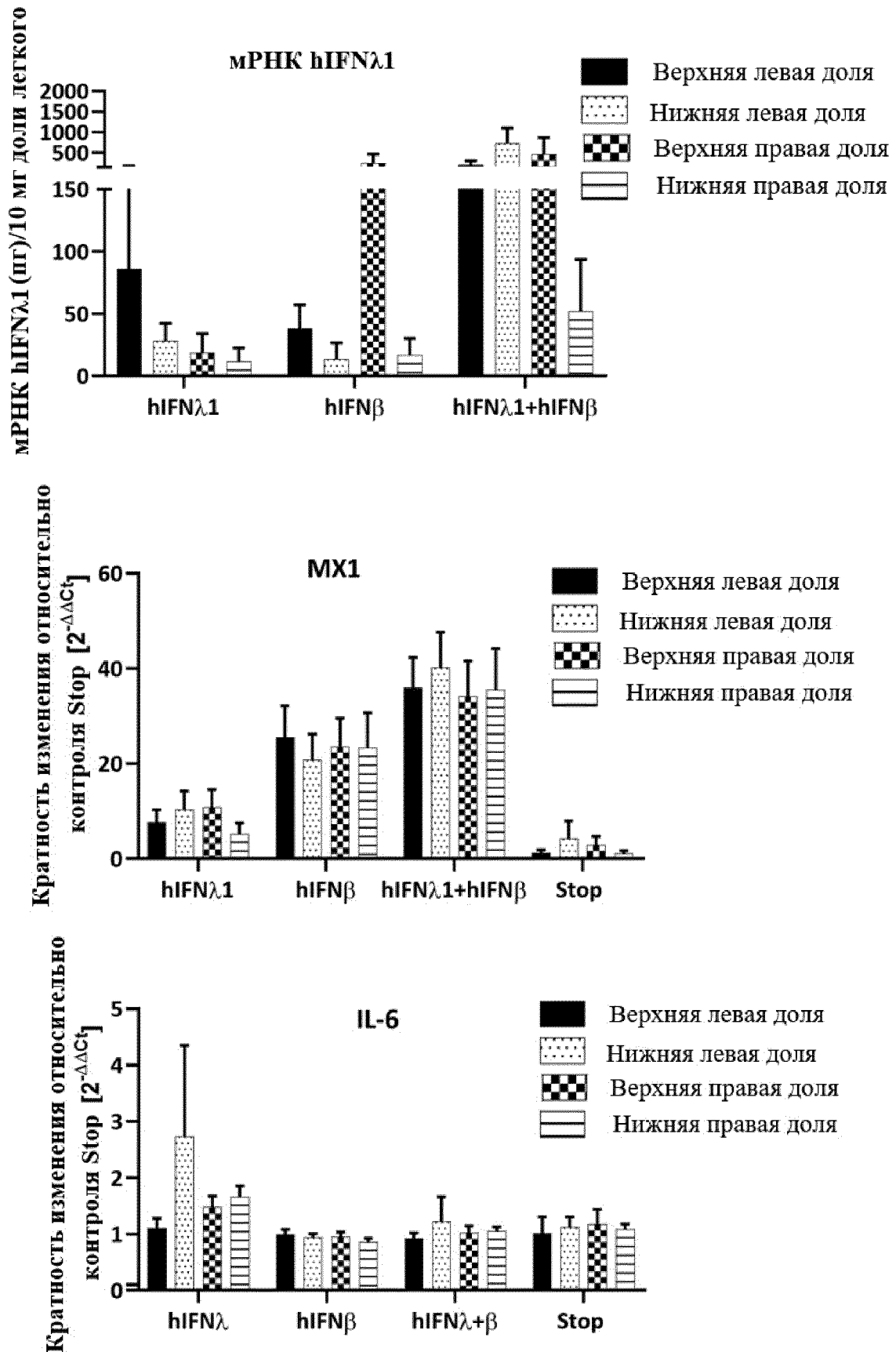
Фигура 25.



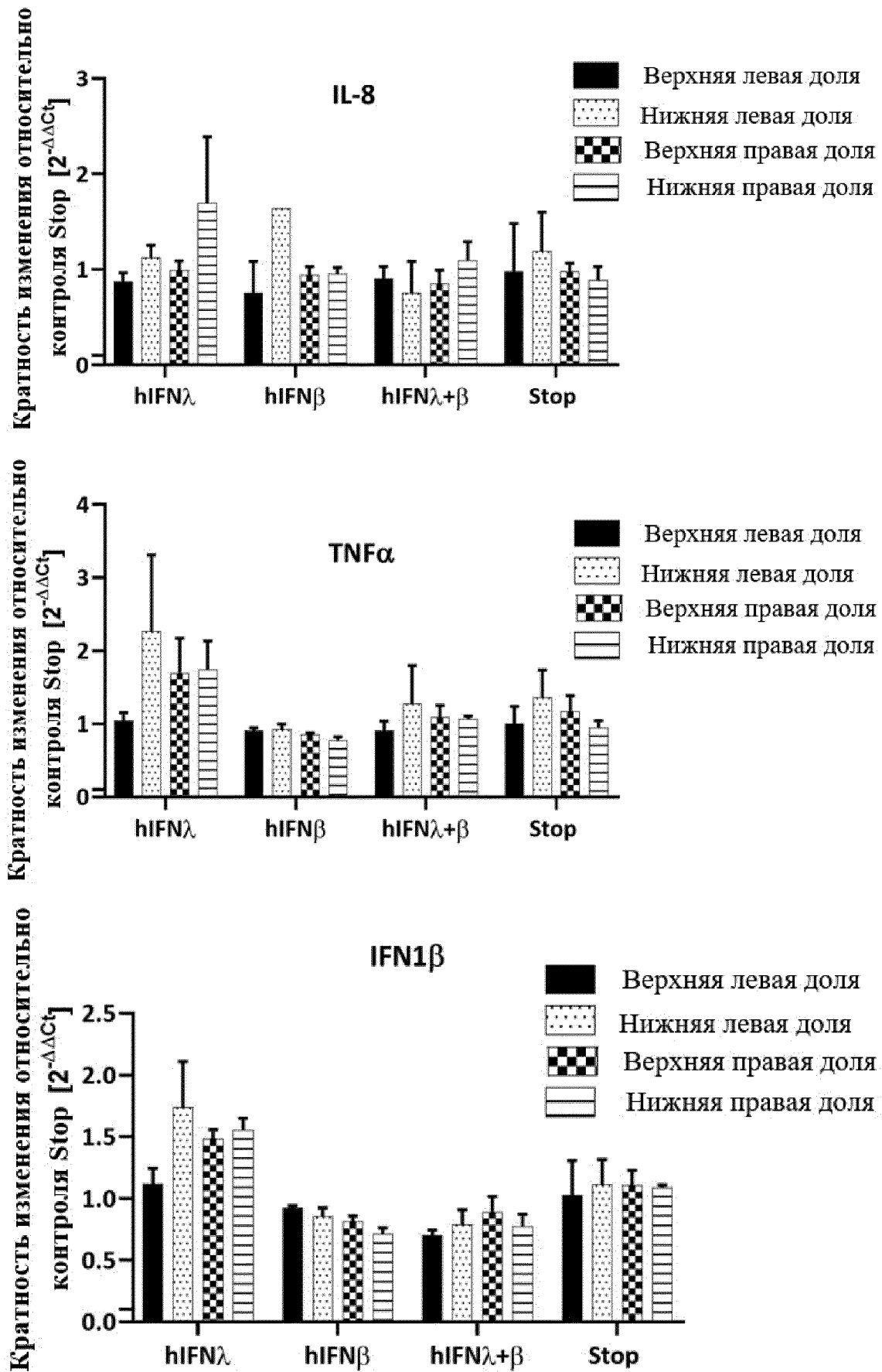
Фигура 26.



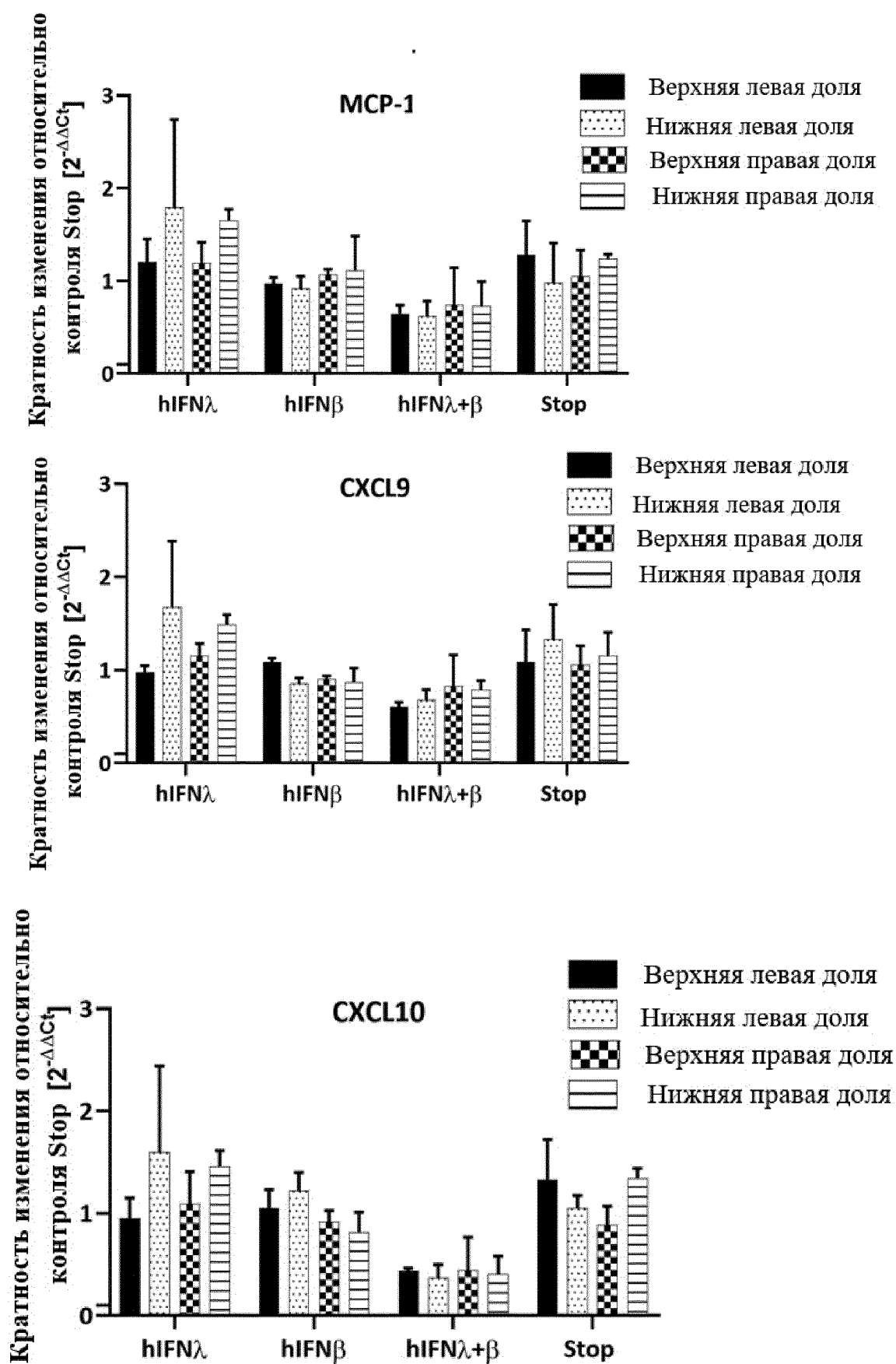
Фигура 27.



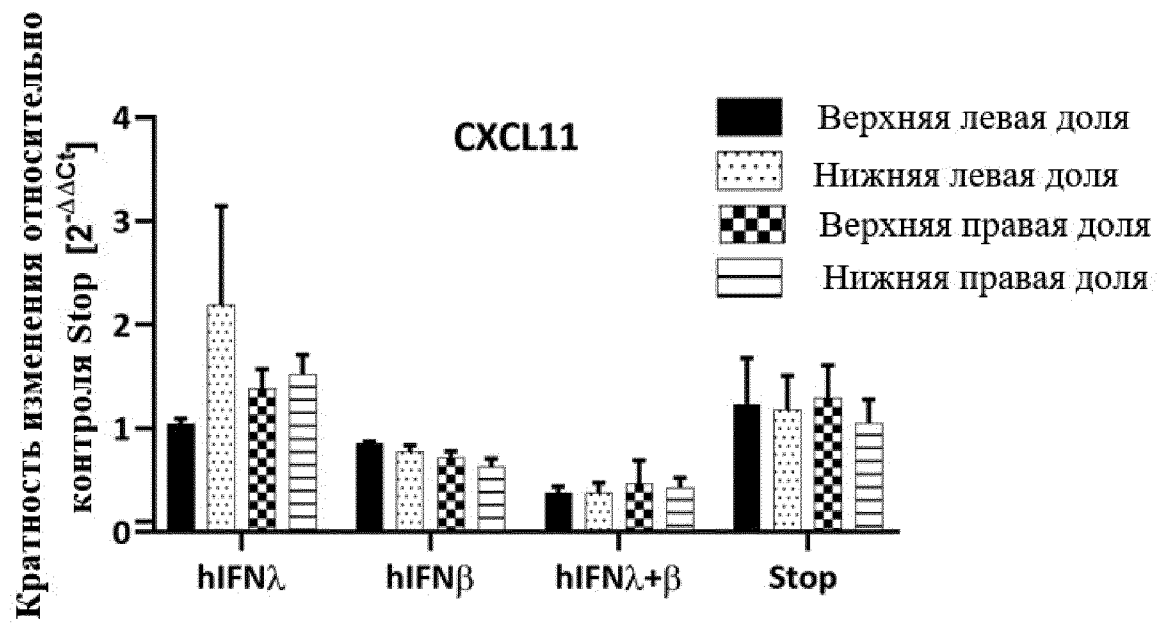
Фигура 28.



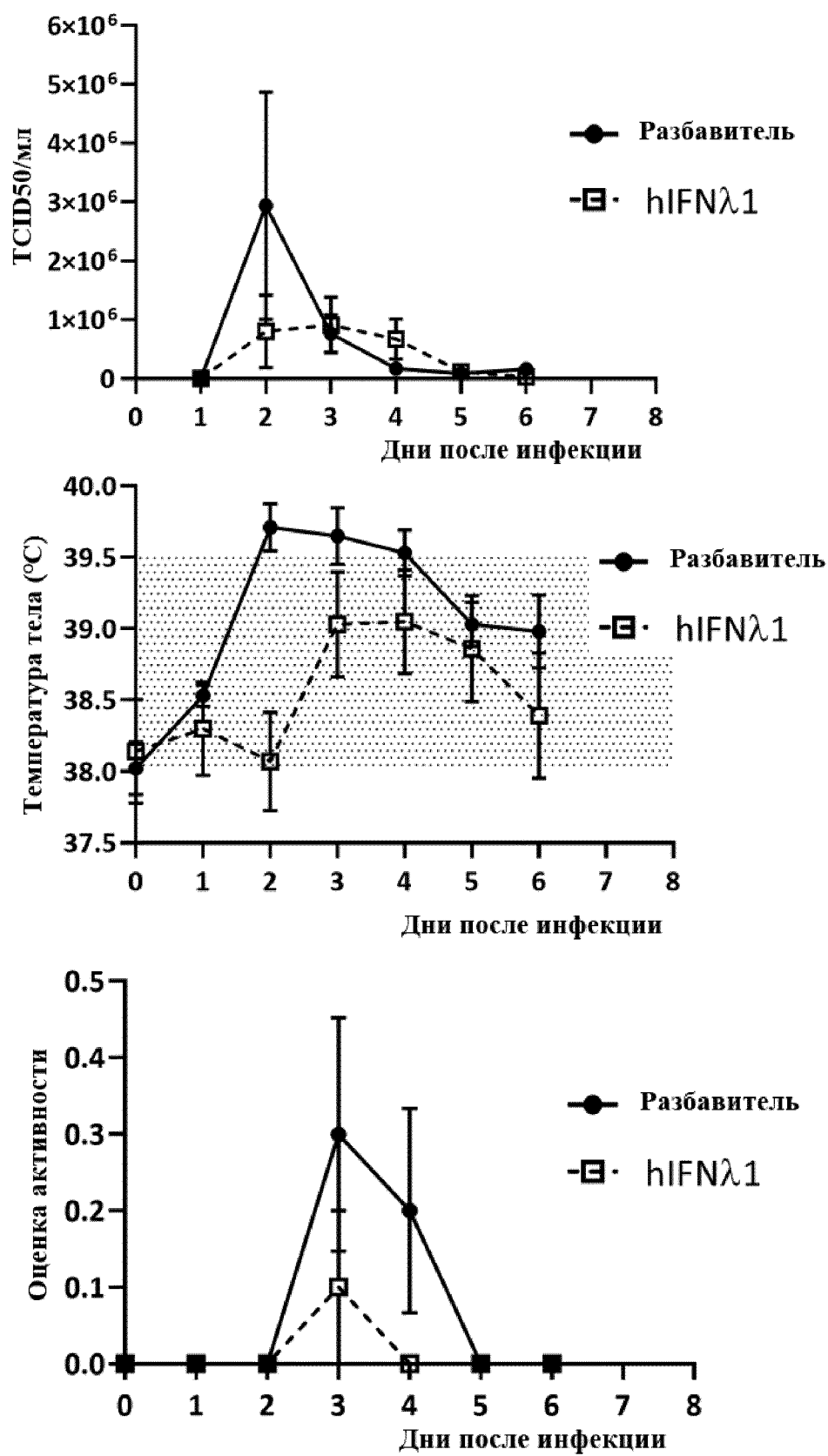
Фигура 28 (продолжение)



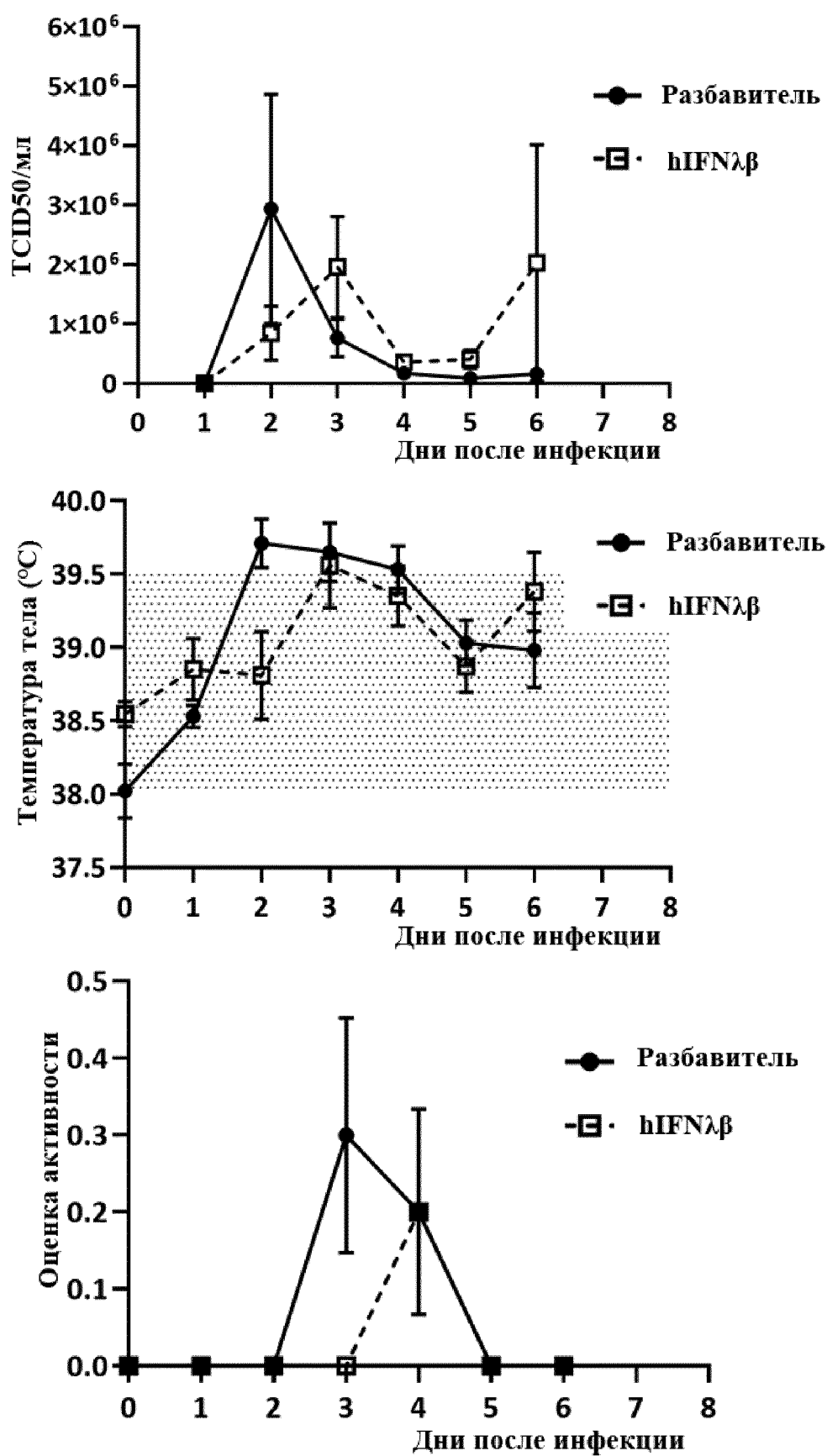
Фигура 28 (продолжение)



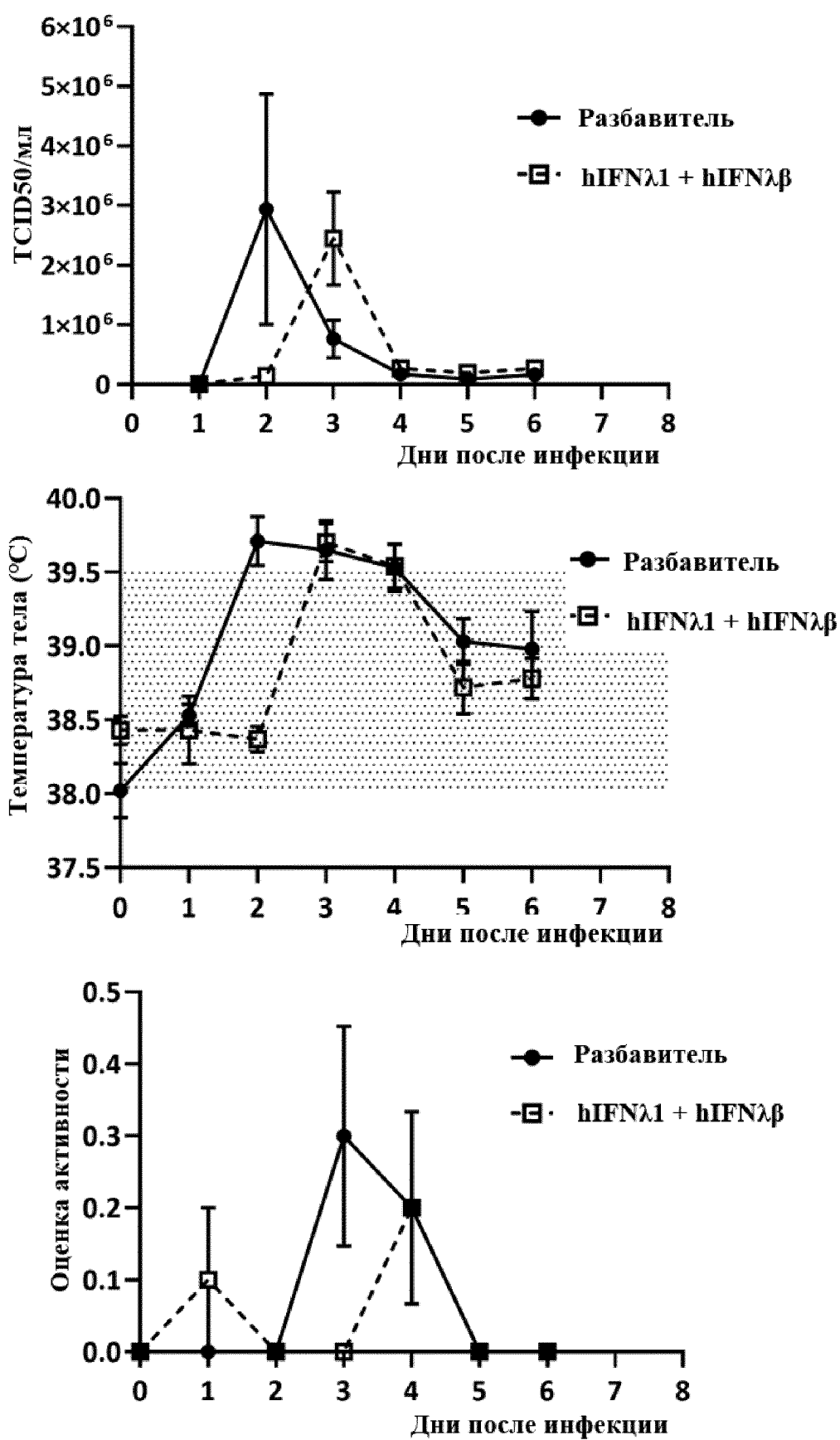
Фигура 28 (продолжение)



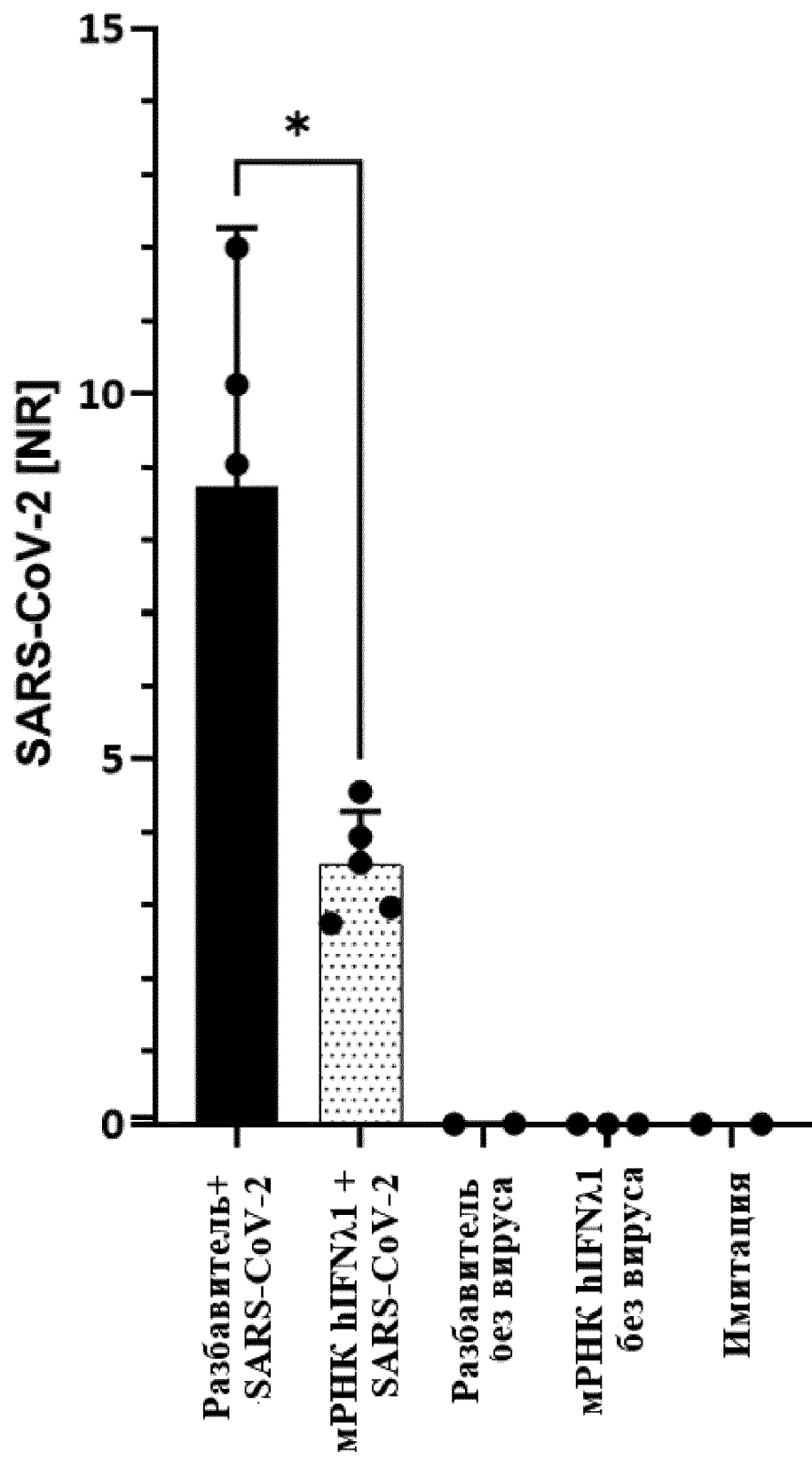
Фигура 29.



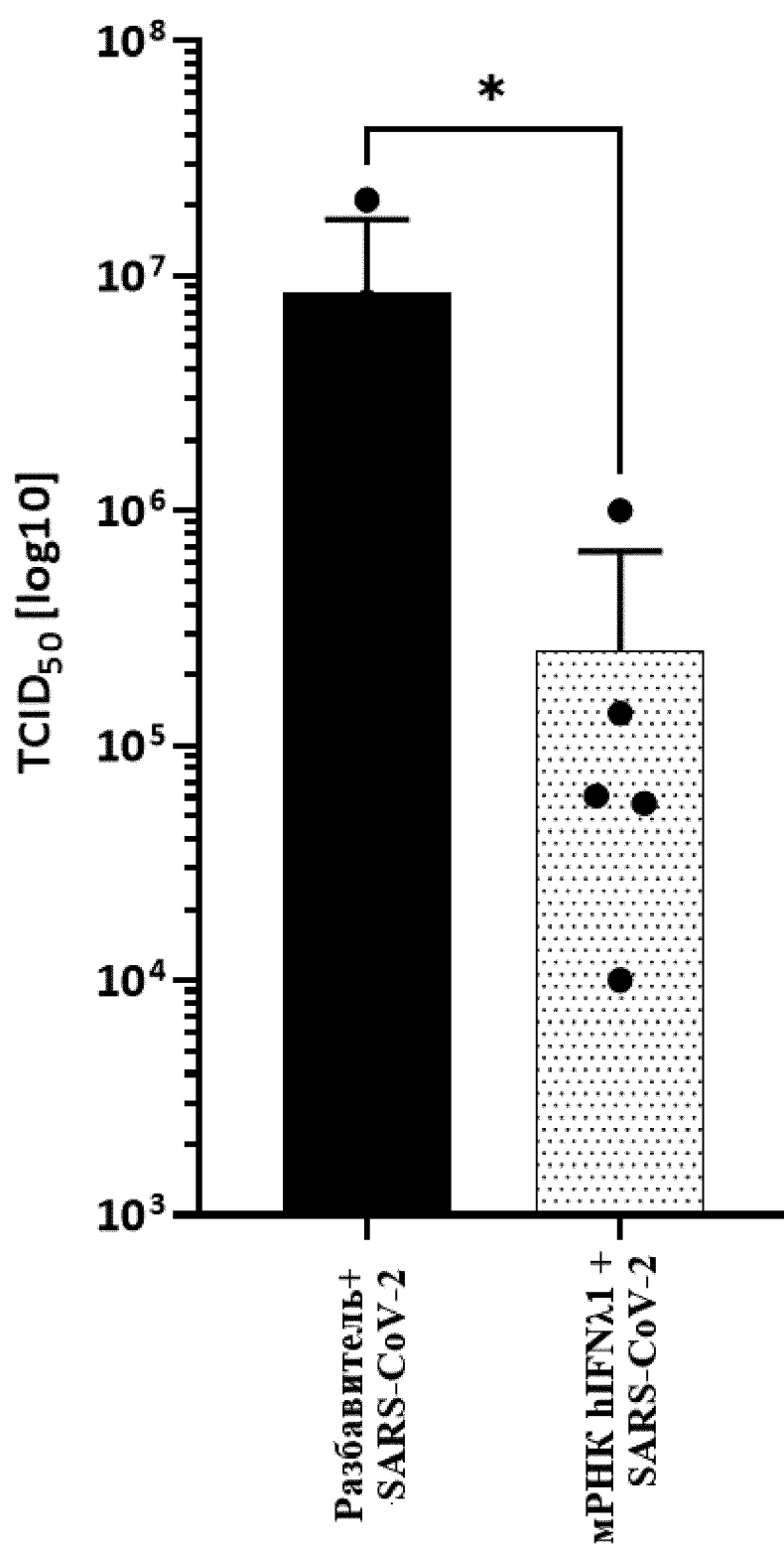
Фигура 29(продолжение).



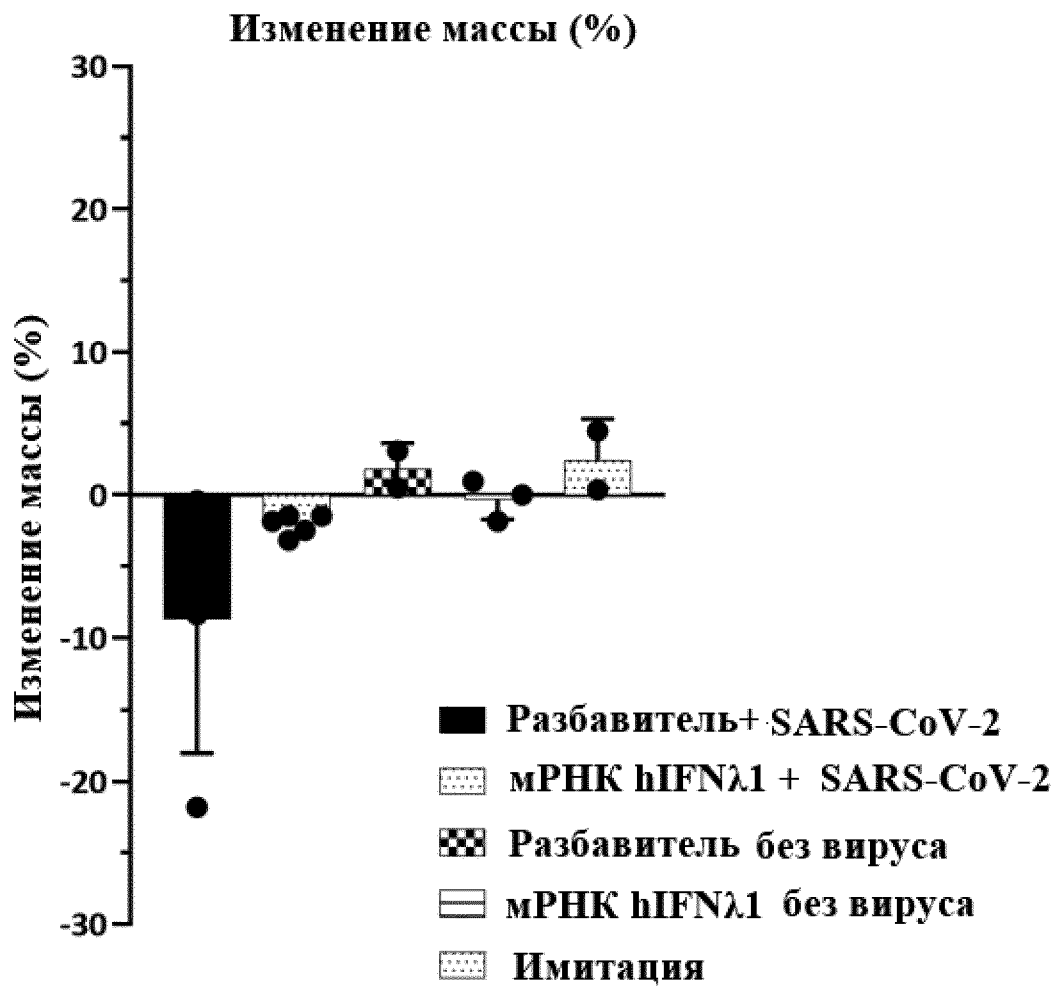
Фигура 29(продолжение).



Фигура 30а.



Фигура 306.



Фигура 30в.