

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391959 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.10.30

(22) Дата подачи заявки
2022.01.06

(51) Int. Cl. A61K 35/76 (2015.01)
A61K 35/768 (2015.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(54) ИНКАПСУЛИРОВАННЫЕ ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ РНК И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/134,376; 63/147,959; 63/181,663;
63/181,899; 63/181,917

(32) 2021.01.06; 2021.02.10; 2021.04.29;
2021.04.29; 2021.04.29

(33) US

(86) PCT/US2022/011450

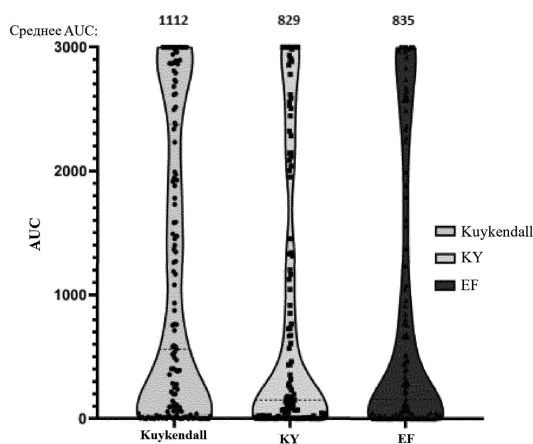
(87) WO 2022/150485 2022.07.14

(71) Заявитель:
ОНКОРУС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Лернер Лорена, Кеннеди Эдвард М.,
Куива Кристоф, Детерлинг Джессика,
Брайант Джеффри Дэвид, Ху Ци-Ин,
Чима Тооба А., Эссекс Шон (US)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Данное изобретение относится к молекулам рекомбинантной РНК, кодирующим геном онколитического вируса. Данное изобретение дополнительно относится к инкапсуляции молекул рекомбинантной РНК и применению молекул и/или частиц рекомбинантной РНК для лечения и профилактики рака.



A1

202391959

202391959

A1

ИНКАПСУЛИРОВАННЫЕ ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ РНК И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 63/134 376, поданной 6 января 2021 г., предварительной заявки на патент США № 63/147 959, поданной 10 февраля 2021 г., предварительной заявки на патент США № 63/181 899, поданной 29 апреля 2021 г., предварительной заявки на патент США № 63/181 917, поданной 29 апреля 2021 г., и предварительной заявки на патент США № 63/181 663, поданной 29 апреля 2021 г., содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ВКЛЮЧЕНИЕ ТЕКСТОВОГО ФАЙЛА, ПРЕДСТАВЛЕННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0002] Содержание текстового файла, представленного в электронном виде, полностью включено в данный документ посредством ссылки. Копия перечня последовательностей в машиночитаемом формате (название файла: ONCR_023_03WO_SeqList_ST25.txt, дата создания: 6 января 2022 г., размер файла: около 524 килобайт).

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Данное изобретение в целом относится к области иммунологии, воспаления и терапии рака. Более конкретно, данное изобретение относится к штаммам онколитических вирусов, конструкции молекул рекомбинантной ДНК для экспрессии в составе вирусного генома и вирусным геномам, инкапсулированным в частицы. Изобретение также относится к лечению и профилактике пролиферативных заболеваний, таких как рак.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Онколитические вирусы - это репликационно-компетентные вирусы с литическим жизненным циклом, способные инфицировать и лизировать опухолевые клетки. Прямой лизис опухолевых клеток приводит не только к гибели клеток, но и к возникновению врожденного и адаптивного иммунного ответа против опухолевых антигенов, поглощенных и представленных местными антигенпрезентирующими клетками. Поэтому онколитические вирусы борются с ростом опухолевых клеток как путем прямого лизиса клеток, так и путем стимулирования антигенспецифических адаптивных ответов, способных поддерживать противоопухолевые ответы после удаления вируса.

[0005] Однако клиническое использование вирусов, способных к репликации, сопряжено с рядом трудностей. В целом, вирусное воздействие активирует пути врожденного иммунитета, что приводит к широкой, неспецифической воспалительной реакции. Если пациент ранее не подвергался воздействию вируса, этот первоначальный врожденный иммунный ответ может привести к развитию адаптивного противовирусного ответа и выработке нейтрализующих антител. Если пациент ранее подвергался воздействию вируса, существующие нейтрализующие противовирусные антитела могут препятствовать достижению желаемого литического эффекта. В обоих случаях присутствие нейтрализующих антител не только предотвращает вирусный лизис клеток-мишеней, но и делает повторное введение вирусной терапии неэффективным. Эти факторы ограничивают применение вирусных терапевтических средств в лечении метастатических опухолей, поскольку эффективность многократного системного введения, необходимого для лечения таких опухолей, затрудняется естественным противовирусным ответом. Даже при отсутствии таких препятствий последующая вирусная репликация в не пораженных клетках может привести к существенному побочному повреждению окружающих клеток и тканей. Кроме того, разные штаммы онколитического вируса обычно проявляют существенно различный тропизм и способность уничтожать раковые клетки.

[0006] В данной области техники остается давно ощущаемая и неудовлетворенная потребность в композициях и способах, связанных с терапевтическим применением репликационно-компетентного вируса, конструированием вируса и соответствующей матрицы экспрессии, и выбором подходящих штаммов вируса для различных терапевтических показаний. В настоящем изобретении предложены такие композиции и способы, и многое другое.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] В одном аспекте данного изобретения предложена липидная наночастица (ЛНЧ), содержащая синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий онколитический вирус Коксаки, где вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21, выбранный из штамма EF и штамма KY. В некоторых вариантах осуществления вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21-KY, при этом штамм CVA21-KY содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21-EF, при этом штамм CVA21-EF содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на

85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления вирус Коксаки содержит последовательность 5'-UTR (IRES), по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичную последовательности SEQ ID NO: 6 или 10. В некоторых вариантах осуществления вирус Коксаки содержит последовательность P1, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичную последовательности SEQ ID NO: 7 или 11. В некоторых вариантах осуществления вирус Коксаки содержит последовательность 3D, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичную последовательности SEQ ID NO: 8 или 12. В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном не содержит полинуклеотидную последовательность, более чем на 95%, более чем на 90%, более чем на 85% или более чем на 80% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1.

[0008] В одном аспекте данного изобретения предложена липидная наночастица (ЛНЧ), содержащая синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий онколитический вирус Коксаки, где вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21 Kuykendall.

[0009] В одном аспекте данное изобретение относится к липидной наночастице (ЛНЧ), содержащей синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий онколитический вирус долины Сенека (SVV), при этом синтетический РНК-вирусный геном содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном содержит последовательность 5'-UTR (IRES), по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную нуклеиновым кислотам 1–670 последовательности SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном кодирует белок SVV VP2, содержащий мутацию S177A.

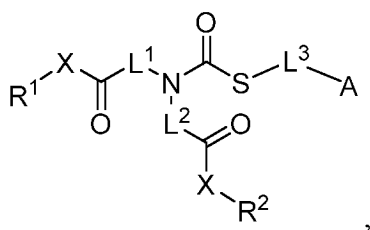
[0010] В некоторых вариантах осуществления доставка ЛНЧ в клетку приводит к продукции вирусных частиц клеткой, при этом вирусные частицы являются инфекционными и литическими. В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном дополнительно содержит гетерологичный полинуклеотид, кодирующий экзогенный белок полезной нагрузки. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ дополнительно содержит вторую молекулу рекомбинантной РНК, кодирующую экзогенный белок полезной нагрузки.

[0011] В некоторых вариантах осуществления экзогенный белок полезной нагрузки содержит или состоит из домена 4HB MLKL, N-концевого фрагмента гасдермина D, N-концевого фрагмента гасдермина E, домена Box B HMGB1, SMAC/Diablo, мелиттина, оксидазы L-аминокислот (LAAO), дезинтегрина, TRAIL (TNFSF10), нитроредуктазы, белка FAST реовируса, лептина/FOSL2, α -1,3-галактозилтрансферазы или аденозиндезаминазы 2 (ADA2). В некоторых вариантах осуществления нитроредуктаза представляет собой NfsB или NfsA. В некоторых вариантах осуществления белок FAST реовируса представляет собой ARV p14, BRV p15 или гибрид p14-p15. В некоторых вариантах осуществления экзогенный белок полезной нагрузки представляет собой флуоресцентный белок, белок-фермент, цитокин, хемокин, антигенсвязывающую молекулу, способную связываться с рецептором клеточной поверхности, или лиганд для рецептора клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления цитокин выбран из GM-CSF, IFN γ , IL-2, IL-7, IL-12, IL-18, IL-21 и IL-36 γ . В некоторых вариантах осуществления лиганд для рецептора клеточной поверхности представляет собой лиганд Flt3 или TNFSF14. В некоторых вариантах осуществления хемокин выбран из CXCL10, CCL4, CCL21 и CCL5. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула способна связываться с рецептором иммунной контрольной точки и ингибировать его. В некоторых вариантах осуществления рецептор иммунной контрольной точки представляет собой PD-1. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула способна связываться с опухолевым антигеном. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула представляет собой молекулу привлекающего Т-клетки биспецифического активатора (BiTE), или молекулу привлекающего Т-клетки биспецифического «легкого» активатора (LiTE). В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой вирусный антиген, выбранный из HBV-core (внутренний антиген гепатита В), HBV-pol, HbS-Ag, HPV E6, HPV E7, большого Т-антигена полиомавируса клеток Меркеля и антигена EBNA2 или BZLF1 вируса Эпштейна-Барра. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой DLL3 или EpCAM.

[0012] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном и/или молекула рекомбинантной РНК содержит кассету с целевой последовательности микроРНК (miРНК) (miR-TS), при этом кассета miR-TS содержит одну или несколько целевых последовательностей miРНК. В некоторых вариантах осуществления одна или более микроРНК выбраны из miR-124, miR-1, miR-143, miR-128, miR-219, miR-219a, miR-122, miR-204, miR-217, miR-137, miR-142 и miR-126. В некоторых вариантах осуществления кассета miR-TS содержит:

- a. одну или несколько копий целевой последовательности miR-124, одну или несколько копий целевой последовательности miR-1 и одну или несколько копий целевой последовательности miR-143;
- b. одну или несколько копий целевой последовательности miR-128, одну или несколько копий целевой последовательности miR-219a и одну или несколько копий целевой последовательности miR-122;
- c. одну или несколько копий целевой последовательности miR-128, одну или несколько копий целевой последовательности miR-204 и одну или несколько копий целевой последовательности miR-219; или
- d. одну или несколько копий целевой последовательности miR-217, одну или несколько копий целевой последовательности miR-137 и одну или несколько копий целевой последовательности miR-126.

[0013] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит катионный липид, вспомогательный липид, структурный липид и ПЭГ-липид. В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой соединение формулы (I):



Формула (I)

или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где:

A представляет собой $-\text{N}(\text{CH}_2\text{R}^{\text{N1}})(\text{CH}_2\text{R}^{\text{N2}})$ или 4-7-членное гетероциклическое кольцо, содержащее по меньшей мере один N, где 4-7-членное гетероциклическое кольцо необязательно замещено 0-6 R^3 ;

каждый X независимо представляет собой $-\text{O}-$, $-\text{N}(\text{R}^1)-$ или $-\text{N}(\text{R}^2)-$;

R^1 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенных $\text{C}_1\text{-C}_{31}$ алифатических углеводородов и стероидов;

R^2 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенных $\text{C}_1\text{-C}_{31}$ алифатических углеводородов и стероидов;

R^3 необязательно замещен $\text{C}_1\text{-C}_6$ алифатическими группами;

каждый из R^{N1} и R^{N2} независимо представляет собой водород, гидрокси- $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкил, $\text{C}_2\text{-C}_6$ алкенил или $\text{C}_3\text{-C}_7$ циклоалкил;

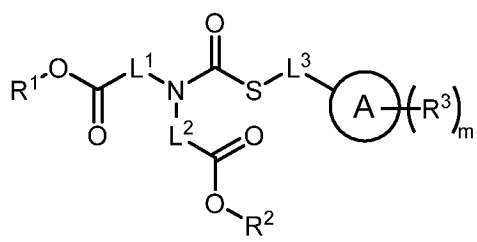
L^1 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенной $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ алкиленовой цепи и двухвалентной необязательно замещенной $\text{C}_2\text{-C}_{20}$ алкениленовой цепи;

L^2 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенной C_1 - C_{20} алкиленовой цепи и двухвалентной необязательно замещенной C_2 - C_{20} алкениленовой цепи; и

L^3 представляет собой связь, необязательно замещенную C_1 - C_6 алкиленовую цепь или двухвалентный необязательно замещенный C_3 - C_7 циклоалкилен; и

при условии, что когда A представляет собой $-N(CH_3)(CH_3)$ и X представляет собой O , L^3 не является C_1 - C_6 алкиленовой цепью.

[0014] В некоторых вариантах осуществления количество атомов углерода между S тиолата и ближайшим N , содержащимся в A , составляет 2-4. В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой соединение формулы (I-a):

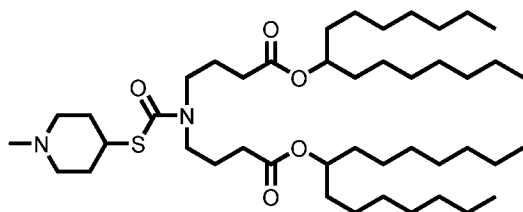


Формула (I-a)

или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где:

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

[0015] В некоторых вариантах осуществления A представляет собой необязательно замещенное 5-6-членное гетероциклическое кольцо. В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль или сольват.

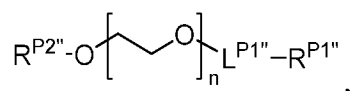
[0016] В некоторых вариантах осуществления катионный липид выбран из DLinDMA, DLin-KC2-DMA, DLin-MC3-DMA (MC3), COATSOME® SS-LC (прежнее название: SS-18/4PE-13), COATSOME® SS-EC (прежнее название: SS-33/4PE-15), COATSOME® SS-OC, COATSOME® SS-OP, ди((Z)-нон-2-ен-1-ил)9-((4-диметиламино)бутаноил)окси)гептадекандиоата (L-319) или N-(2,3-диолеоилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмонийхлорида (DOTAP).

[0017] В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид выбран из 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DSPC); 1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (DLPE); 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DOPC); и 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (DOPE).

[0018] В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой 1,2-диолеоил-3-триметиламмоний-пропан (DOTAP), а вспомогательный липид представляет собой 1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DLPE) или 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE).

[0019] В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой холестерин.

[0020] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (A''):



Формула (A'')

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

n равно целому числу от 10 до 200, включая все конечные точки;

$L^{P1''}$ представляет собой связь, $-[(CH_2)_{0-3}-C(O)O]_{1-3}-$, $-(CH_2)_{0-3}-C(O)O-$ $(CH_2)_{1-3}-OC(O)-$ или $-C(O)N(H)-$;

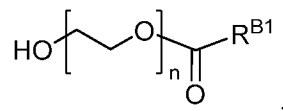
$R^{P1''}$ представляет собой C_5-C_{25} алкил или C_5-C_{25} алкенил; и

$R^{P2''}$ представляет собой водород или $-CH_3$,

и при этом ЛНЧ имеет молярное соотношение от около 0,001% до около 5% ПЭГ-липида.

[0021] В некоторых вариантах осуществления $L^{P1''}$ представляет собой связь, $-CH_2C(O)O-$, $-CH_2CH_2C(O)O-$, $-CH_2C(O)OCH_2C(O)O-$, $-CH_2C(O)OCH_2CH_2OC(O)-$ или $-C(O)N(H)-$.

[0022] В некоторых вариантах осуществления $L^{P1''}$ представляет собой связь. В некоторых вариантах осуществления $R^{P2''}$ представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (B):



Формула B

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

n равно целому числу от 10 до 200, включая все конечные точки; и

R^{B1} представляет собой C_5-C_{25} алкил или C_5-C_{25} алкенил, и

при этом ЛНЧ имеет молярное соотношение от около 0,001% до около 5% ПЭГ-липида.

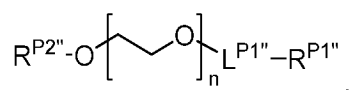
[0023] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид выбран из 1,2-

дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина-N-[амино(полиэтиленгликоля)] (DSPE-PEG); 1,2-дипальмитоил-рац-глицеринметоксиполиэтиленгликоля (DPG-PEG); 1,2-дистеароил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена (DSG-PEG); 1,2-дистеароил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена (DSG-PEG); 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена (DMG-PEG); и 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена (DMG-PEG), или 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[амино(полиэтиленгликоля)] (DSPE-PEG-амин).

[0024] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид выбран из 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина-N-[амино(полиэтиленгликоля)-5000] (DSPE-PEG5K); 1,2-дипальмитоил-рац-глицерин метоксиполиэтиленгликоля-2000 (DPG-PEG2K); 1,2-дистеароил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена-5000 (DSG-PEG5K); 1,2-дистеароил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена-2000 (DSG-PEG2K); 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена-5000 (DMG-PEG5K); и 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена-2000 (DMG-PEG2K).

[0025] В некоторых вариантах осуществления катионный липид содержит COATSOME® SS-OC, при этом вспомогательный липид содержит DSPC, структурный липид содержит холестерин (Chol), а ПЭГ-липид содержит DPG-PEG2000.

[0026] В некоторых вариантах осуществления катионный липид содержит COATSOME® SS-OC, при этом вспомогательный липид содержит DSPC, структурный липид содержит холестерин (Chol), а ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (A''):



Формула (A'')

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

n равно целому числу от 10 до 200, включая все конечные точки;

L^{P1''} представляет собой связь;

R^{P1''} представляет собой C₅-C₂₅ алкил или C₅-C₂₅ алкенил; и

R^{P2''} представляет собой водород, и

при этом ЛНЧ имеет молярное соотношение от около 0,001% до около 5% ПЭГ-липид.

[0027] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид выбран из группы, состоящей из BRIJ™ S100, BRIJ™ S20, BRIJ™ O20 и BRIJ™ C20. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой BRIJ™ S100.

[0028] В некоторых вариантах осуществления соотношение SS-

ОС:DSPC:Chol:ПЭГ-липид (в процентах от общего содержания липидов) составляет A:B:C:D, где A+B+C+D = 100%, и где

- e. A = 40-60%, B = 10-25%, C = 20-30% и D = 0,01-3%;
- f. A = 45-50%, B = 20-25%, C = 25-30% и D = 0,01-1%; или
- g. A = около 49%, B = около 22%, C = около 28% и D = около 0,5%.

[0029] В некоторых вариантах осуществления соотношение SS-ОС:DSPC:Chol:ПЭГ-липид (в процентах от общего содержания липидов) составляет A:B:C:D, где A+B+C+D = 100%, и где

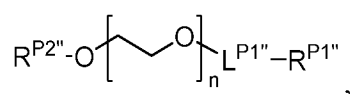
- h. A = 40-60%, B = 10-30%, C = 20-45% и D = 0-3%;
- i. A = 40-60%, B = 10-30%, C = 25-45% и D = 0,01-3%;
- j. A = 45-55%, B = 10-20%, C = 30-40% и D = 1-2%;
- k. A = 45-50 %, B = 10-15 %, C = 35-40 % и D = 1-2 %; или
- l. A = около 49%, B = около 11%, C = около 38% и D = около 1,5%.

[0030] В некоторых вариантах осуществления соотношение SS-ОС:DSPC:Chol:ПЭГ-липид (в процентах от общего содержания липидов) составляет около A:B:C:D, где A+B+C+D = 100%, и где

- m. A = 45-65%, B = 5-20%, C = 20-45% и D = 0-3%;
- n. A = 50-60%, B = 5-15%, C = 30-45% и D = 0,01-3%;
- o. A = 55-60%, B = 5-15%, C = 30-40% и D = 1-2%;
- p. A = 55-60 %, B = 5-10 %, C = 30-35 % и D = 1-2 %; или
- q. A = около 58%, B = около 7%, C = около 33% и D = около 1,5%.

[0031] В одном аспекте в данном изобретении предложена липидная наночастица (ЛНЧ), содержащая:

- a. синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий вирус долины Сенека (SVV);
- и
- b. катионный липид, вспомогательный липид, структурный липид и ПЭГ-липид, где ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (A''):



Формула (A'')

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

n равно целому числу от 10 до 200, включая все конечные точки;

$L^{P1''}$ представляет собой связь, $-[(CH_2)_{0-3}-C(O)O]_{1-3}-$, $-(CH_2)_{0-3}-C(O)O-$ $(CH_2)_{1-3}-OC(O)-$ или $-C(O)N(H)-$;

$R^{P1''}$ представляет собой C_5-C_{25} алкил или C_5-C_{25} алкенил; и

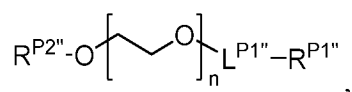
$R^{P2''}$ представляет собой водород или $-CH_3$, и

при этом ЛНЧ имеет молярное соотношение от около 0,001% до около 5% ПЭГ-липид.

[0032] В одном аспекте в данном изобретении предложена липидная наночастица (ЛНЧ), содержащая:

a. синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий вирус Коксаки; и

b. катионный липид, вспомогательный липид, структурный липид и ПЭГ-липид, где ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (A''):



Формула (A'')

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

n равно целому числу от 10 до 200, включая все конечные точки;

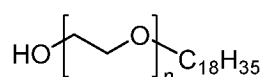
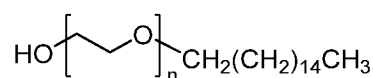
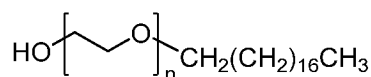
$L^{P1''}$ представляет собой связь, $-[(CH_2)_{0-3}-C(O)O]_{1-3}-$, $-(CH_2)_{0-3}-C(O)O-$ $(CH_2)_{1-3}-OC(O)-$ или $-C(O)N(H)-$;

$R^{P1''}$ представляет собой C_5-C_{25} алкил или C_5-C_{25} алкенил; и

$R^{P2''}$ представляет собой водород или $-CH_3$, и

при этом ЛНЧ имеет молярное соотношение от около 0,001% до около 5% ПЭГ-липид.

[0033] В некоторых вариантах осуществления R^1 представляет собой $C_{16}-C_{18}$ алкил или $C_{16}-C_{18}$ алкенил. В некоторых вариантах осуществления $L^{P1''}$ представляет собой связь, $-CH_2C(O)O-$, $-CH_2CH_2C(O)O-$, $-CH_2C(O)OCH_2C(O)O-$, $-CH_2C(O)OCH_2CH_2OC(O)-$ или $-C(O)N(H)-$. В некоторых вариантах осуществления $L^{P1''}$ представляет собой связь. В некоторых вариантах осуществления $R^{P2''}$ представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (A''-f1), формулы (A''-f2) или формулы (A''-f3):



или их фармацевтически приемлемую соль.

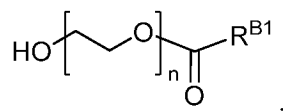
[0034] В одном аспекте в данном изобретении предложена липидная наночастица (ЛНЧ), содержащая:

а. синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий вирус долины Сенека (SVV);

и

б. катионный липид, вспомогательный липид, структурный липид и ПЭГ-липид, где ПЭГ-липид представляет собой

соединение формулы (В):



Формула В

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

n равно целому числу от 10 до 200, включая все конечные точки; и

R^{B1} представляет собой C₅-C₂₅ алкил или C₅-C₂₅ алкенил, и

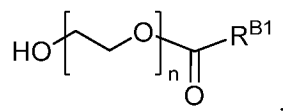
при этом ЛНЧ имеет молярное соотношение от около 0,001% до около 5% ПЭГ-липида.

[0035] В одном аспекте в данном изобретении предложена липидная наночастица (ЛНЧ), содержащая:

а. синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий вирус Коксаки; и

б. катионный липид, вспомогательный липид, структурный липид и ПЭГ-липид, где ПЭГ-липид представляет собой

соединение формулы (В):



Формула (В)

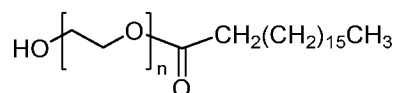
или его фармацевтически приемлемую соль, где:

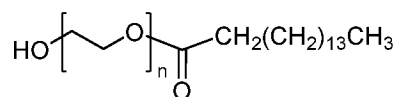
n равно целому числу от 10 до 200, включая все конечные точки; и

R^{B1} представляет собой C₅-C₂₅ алкил или C₅-C₂₅ алкенил, и

при этом ЛНЧ имеет молярное соотношение от около 0,001% до около 5% ПЭГ-липида. В некоторых вариантах осуществления R¹ представляет собой C₁₅-C₁₇ алкил или C₁₅-C₁₇ алкенил.

[0036] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (В-а) или формулы (В-б):





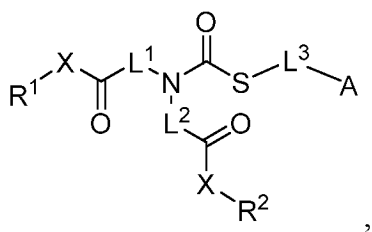
или их фармацевтически приемлемую соль.

[0037] В некоторых вариантах осуществления n составляет в среднем около 20, около 40, около 50 или около 100. В некоторых вариантах осуществления n составляет в среднем около 100. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид содержит фрагмент ПЭГ со средним молекулярным весом от около 200 дальтон до около 10 000 дальтон, от около 500 дальтон до около 7 000 дальтон, или от около 800 дальтон до около 6 000 дальтон.

[0038] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид выбран из группы, состоящей из HO-PEG100-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₄CH₃, HO-PEG20-C₁₈H₃₅, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃ и HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃.

[0039] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ индуцирует сниженный иммунный ответ *in vivo* по сравнению с контрольной ЛНЧ, не содержащей ПЭГ-липида формулы (A'') и/или ионизируемого липида формулы (I), необязательно, при этом ПЭГ-липид в контрольной ЛНЧ представляет собой PEG2K-DPG или PEG2K-DMG. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой ускоренный клиренс ЛНЧ из крови (ABC; англ.: accelerated blood clearance) и/или ответ IgM на ПЭГ.

[0040] В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой соединение формулы (I):



Формула (I)

или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где:

A представляет собой -N(CH₂R^{N1})(CH₂R^{N2}) или 4-7-членное гетероциклическое кольцо, содержащее по меньшей мере один N, где 4-7-членное гетероциклическое кольцо необязательно замещено 0-6 R³;

каждый X независимо представляет собой -O-, -N(R¹)- или -N(R²)-;

R¹ выбран из группы, состоящей из необязательно замещенных C₁-C₃₁ алифатических углеводородов и стероидилов;

R^2 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенных C_1-C_{31} алифатических углеводородов и стероидилов;

R^3 необязательно замещен C_1-C_6 алифатическими группами;

каждый из R^{N1} и R^{N2} независимо представляет собой водород, гидроксигруппу, алкил, C_2-C_6 алкенил или C_3-C_7 циклоалкил;

L^1 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенной C_1-C_{20} алкиленовой цепи и двухвалентной необязательно замещенной C_2-C_{20} алкениленовой цепи;

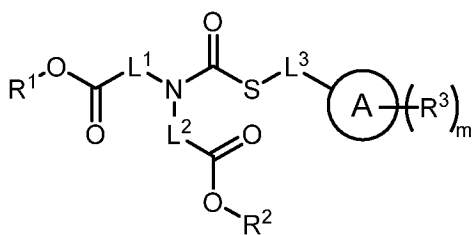
L^2 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенной C_1-C_{20} алкиленовой цепи и двухвалентной необязательно замещенной C_2-C_{20} алкениленовой цепи; и

L^3 представляет собой связь, необязательно замещенную C_1-C_6 алкиленовую цепь или двухвалентный необязательно замещенный C_3-C_7 циклоалкилен; и

при условии, что когда A представляет собой $-N(CH_3)(CH_3)$ и X представляет собой O , L^3 не является C_1-C_6 алкиленовой цепью.

[0041] В некоторых вариантах осуществления количество атомов углерода между S тиолата и ближайшим N , содержащимся в A , составляет 2-4.

[0042] В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой соединение формулы (I-a):



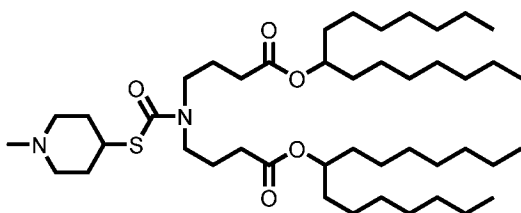
Формула (I-a)

или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где:

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

[0043] В некоторых вариантах осуществления A представляет собой необязательно замещенное 5-6-членное гетероциклическое кольцо.

[0044] В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой

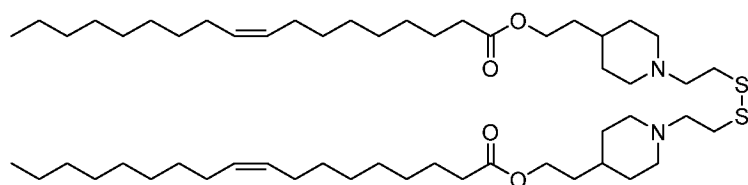


или его фармацевтически приемлемую соль или сольват.

[0045] В некоторых вариантах осуществления катионный липид выбран из

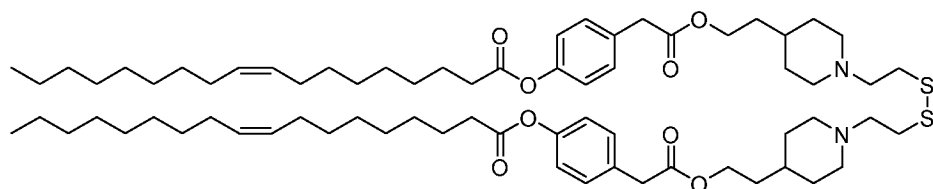
DLinDMA, DLin-KC2-DMA, DLin-MC3-DMA (MC3), COATSOME® SS-LC (прежнее название: SS-18/4PE-13), COATSOME® SS-EC (прежнее название: SS-33/4PE-15), COATSOME® SS-OC, COATSOME® SS-OP, ди((Z)-нон-2-ен-1-ил)9-((4-диметиламино)бутаноил)окси)гептадекандиоат (L-319), N-(2,3-диолеоилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмонийхлорида (DOTAP) или их смеси.

[0046] В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой соединение формулы (II-1a):



Формула (II-1a), или

соединение формулы (II-2a):



Формула (II-

2a).

[0047] В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой соединение формулы (II-1a), структурный липид представляет собой холестерин, вспомогательный липид представляет собой DSPC, а ПЭГ-липид представляет собой BRIJ™ S100.

[0048] В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой соединение формулы (II-1a), структурный липид представляет собой холестерин, вспомогательный липид представляет собой DSPC и ПЭГ-липид представляет собой MYRJ™ S100, MYRJ™ S50 или MYRJ™ S40.

[0049] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит молярное соотношение от около 0,1% до около 2% ПЭГ-липида, например, от около 0,2% до около 0,8 мол%, от около 0,4% до около 0,6 мол%, от около от около 0,7% до около 1,3% или от около от около 1,2% до около 1,8% ПЭГ-липида. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит молярное соотношение от около 0,2% до около 0,8% или около 0,5% ПЭГ-липида. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержат молярное соотношение около 1,2% около 1,8% или около 1,5% ПЭГ-липида. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеет молярное соотношение от около 44% до около 54% катионного липида, от около 19% до около 25% вспомогательного липида, от около 24% до около 33% структурного липида и от около 0,2% до около 0,8% ПЭГ-липида.

[0050] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит соединение формулы (II-1a), холестерин, DSPC и ПЭГ-липид, выбранный из HO-PEG100-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₄CH₃, HO-PEG20-C₁₈H₃₅, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃ и HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, при этом молярное соотношение соединения формулы (II-1a): холестерин: DSPC : ПЭГ-липид составляет 49 : 28,5 : 22 : 0,5.

[0051] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит соединение формулы (II-1a), холестерин, DSPC и ПЭГ-липид, выбранный из HO-PEG100-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₄CH₃, HO-PEG20-C₁₈H₃₅, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃ и HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, при этом молярное соотношение соединения формулы (II-1a): холестерин: DSPC : ПЭГ-липид составляет 49 : 27,5 : 22 : 1,5.

[0052] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит соединение формулы (II-1a), холестерин, DSPC и ПЭГ-липид, выбранный из HO-PEG100-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₄CH₃, HO-PEG20-C₁₈H₃₅, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃ и HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, при этом молярное соотношение соединения формулы (II-1a): холестерин: DSPC : ПЭГ-липид составляет 49 : 38,5 : 11 : 1,5.

[0053] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеет соотношение липидного азот к фосфату (N:P) от около 1 до около 25. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеет соотношение N:P около 14. В некоторых вариантах осуществления гиалуронан конъюгирован с поверхностью ЛНЧ.

[0054] В одном аспекте в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая множество липидных наночастиц по данному изобретению. В некоторых вариантах осуществления множество ЛНЧ имеют средний диаметр от около 50 нм до около 500 нм, от около 150 нм до около 500 нм, от около 200 нм до около 500 нм, от около 300 нм до около 500 нм, от около 350 нм до около 500 нм, от около 400 нм до около 500 нм, от около 425 нм до около 500 нм, от около 450 нм до около 500 нм или от около 475 нм до около 500 нм. В некоторых вариантах осуществления множество ЛНЧ имеют средний диаметр от около 50 нм до около 120 нм. В некоторых вариантах осуществления множество ЛНЧ имеют средний диаметр около 50 нм, 60 нм, 70 нм, 80 нм, 90 нм, 100 нм, 110 нм или около 120 нм. В некоторых вариантах осуществления множество ЛНЧ имеют

средний диаметр около 100 нм.

[0055] В некоторых вариантах осуществления множество ЛНЧ имеют средний дзета-потенциал от около 40 мВ до около -40 мВ, от около 20 мВ до около -20 мВ, от около 10 мВ до около -10 мВ, от около 5 мВ до около -5 мВ или от около 20 мВ до около -40 мВ. В некоторых вариантах осуществления множество ЛНЧ имеют средний дзета-потенциал менее около 5 мВ, менее около 0 мВ, менее около -5 мВ, менее около -10 мВ, менее около -20 мВ, менее около -30 мВ, менее около -35 мВ или менее около -40 мВ. В некоторых вариантах осуществления множество ЛНЧ имеют средний дзета-потенциал от около -50 мВ до около -20 мВ, от около -40 мВ до около -20 мВ, от около -30 мВ до около -10 мВ, от около -20 мВ до около 0 мВ, от около -15 мВ до около 5 мВ или от около -10 мВ до около 10 мВ. В некоторых вариантах осуществления средний дзета-потенциал множества ЛНЧ составляет около -30 мВ, около -31 мВ, около -32 мВ, около -33 мВ, около -34 мВ, около -35 мВ, около -36 мВ, около -37 мВ, около -38 мВ, около -39 мВ или около -40 мВ.

[0056] В некоторых вариантах осуществления введение фармацевтической композиции субъекту доставляет полинуклеотид рекомбинантной РНК в клетку-мишень субъекта, при этом полинуклеотид рекомбинантной РНК продуцирует инфекционный онколитический вирус, способный лизировать клетку-мишень субъекта. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой раковую клетку. В некоторых вариантах осуществления композиция составлена для внутривенной и/или внутриопухолевой доставки.

[0057] В некоторых вариантах осуществления композиция имеет продолжительность терапевтического эффекта *in vivo* больше, чем у композиции, не содержащей ПЭГ-липид Формулы (A'') и/или ионизируемого липида Формулы (I). В некоторых вариантах осуществления композиция имеет продолжительность терапевтического эффекта *in vivo* около 1 часа или более, около 2 часов или более, около 3 часов или более, около 4 часов или более, около 5 часов или более, около 6 часов или более, около 7 часов или более, около 8 часов или более, около 9 часов или более, около 10 часов или более, около 12 часов или более, около 14 часов или более, около 16 часов или более, около 18 часов или более, около 20 часов или более, около 25 часов или более, около 30 часов или более, около 35 часов или более, около 40 часов или более, около 45 часов или более или около 50 часов или более. Композиция имеет период полувыведения и/или AUC *in vivo*, превышающий или равный предварительно определенному пороговому значению.

[0058] В некоторых вариантах осуществления эффективность инкапсуляции

синтетического РНК-вирусного генома с помощью ЛНЧ составляет не менее 70 %, не менее 75 %, не менее 80 %, не менее 85 %, не менее 90 %, не менее 91 %, не менее 92 %, не менее 93 %, не менее 94 %, не менее 95 %, не менее 96 %, не менее 97 %, не менее 98 %, не менее 99 % или 100 %. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция имеет общую концентрацию липидов около 10 мМ, около 20 мМ, около 30 мМ, около 40 мМ или около 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция составлена при pH около 2,5, около 3, около 3,5, около 4, около 4,5, около 5, около 5,5 или около 6.

[0059] В некоторых вариантах осуществления композиция составлена для многократного введения. В некоторых вариантах осуществления последующее введение проводят по меньшей мере через 3 дня, по меньшей мере через 5 дней, по меньшей мере через 7 дней, по меньшей мере через 9 дней, по меньшей мере через 11 дней, по меньшей мере через 14 дней или по меньшей мере через 21 день после первого введения. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

[0060] В одном аспекте в данном изобретении предложена молекула рекомбинантной РНК, содержащая синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий онколитический вирус Коксаки, где вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21, выбранный из штамма EF и штамма KY. В некоторых вариантах осуществления вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21-KY, при этом штамм CVA21-KY содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21-EF, при этом штамм CVA21-EF содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления вирус Коксаки содержит последовательность 5'-UTR (IRES), по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичную последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 6 или 10. В некоторых вариантах осуществления вирус Коксаки содержит последовательность P1, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичную последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 7 или 11. В некоторых вариантах осуществления вирус Коксаки содержит последовательность 3D, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере

мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичную последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 8 или 12. В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном не содержит полинуклеотидную последовательность, более чем на 95%, более чем на 90%, более чем на 85% или более чем на 80% идентичную последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной РНК не содержит РНК-вирусный геном, обладающий 100% идентичностью последовательности с вирусом Коксаки дикого типа.

[0061] В одном аспекте в данном изобретении предложена молекула рекомбинантной РНК, содержащая синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий онколитический вирус Коксаки, при этом вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21 Kuykendall.

[0062] В одном аспекте в данном изобретении предложена молекула рекомбинантной РНК, содержащей синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий вирус долины Сенека (SVV), при этом SVV представляет собой химерный SVV, и при этом синтетический РНК-вирусный геном содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80% , по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 68.

[0063] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной РНК дополнительно содержит кассету целевой последовательности микроРНК (miРНК) (miR-TS), вставленную в полинуклеотидную последовательность, кодирующую онколитический вирус, при этом кассета miR-TS содержит одну или несколько целевых последовательностей микроРНК, и при этом экспрессия одной или нескольких соответствующих микроРНК в клетке ингибирует репликацию кодируемого вируса в клетке. В некоторых вариантах осуществления одна или более микроРНК выбраны из miR-124, miR-1, miR-143, miR-128, miR-219, miR-219a, miR-122, miR-204, miR-217, miR-137, miR-142 и miR-126. В некоторых вариантах осуществления кассета miR-TS содержит:

- a. одну или несколько копий целевой последовательности miR-124, одну или несколько копий целевой последовательности miR-1 и одну или несколько копий целевой последовательности miR-143;
- b. одну или несколько копий целевой последовательности miR-128, одну или несколько копий целевой последовательности miR-219a и одну или несколько копий целевой последовательности miR-122;
- c. одну или несколько копий целевой последовательности miR-128, одну или несколько копий целевой последовательности miR-204 и одну

или несколько копий целевой последовательности miR-219; или

d. одну или несколько копий целевой последовательности miR-217, одну или несколько копий целевой последовательности miR-137 и одну или несколько копий целевой последовательности miR-126.

[0064] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной РНК способна продуцировать репликационно-компетентный онколитический вирус при введении в клетку с помощью невирусного средства доставки. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего, присутствующую у субъекта-млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько кассет miR-TS включены в 5'-нетранслируемую область (UTR) или 3'-UTR одного или нескольких вирусных генов. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько кассет miR-TS включены в открытую рамку считывания (ORF), 5'-нетранслируемую область (UTR) или 3'-UTR одного или нескольких вирусных генов. В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной РНК вставлена в вектор нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления вектор нуклеиновой кислоты представляет собой репликон.

[0065] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном дополнительно содержит гетерологичный полинуклеотид, кодирующий экзогенный белок полезной нагрузки. В некоторых вариантах осуществления экзогенный белок полезной нагрузки содержит или состоит из домена 4HB MLKL, N-концевого фрагмента гасдермина D, N-концевого фрагмента гасдермина E, домена Box B HMGB1, SMAC/Diablo, мелиттина, оксидазы L-аминокислот (LAAO), дезинтегрин, TRAIL (TNFSF10), нитроредуктазы, белка FAST реовируса, лептина/FOSL2, α -1,3-галактозилтрансферазы или аденозиндезаминазы 2 (ADA2). В некоторых вариантах осуществления нитроредуктаза представляет собой NfsB или NfsA. В некоторых вариантах осуществления белок FAST реовируса представляет собой ARV p14, BRV p15 или гибрид p14-p15. В некоторых вариантах осуществления экзогенный белок полезной нагрузки представляет собой флуоресцентный белок, белок-фермент, цитокин, хемокин, антигенсвязывающую молекулу, способную связываться с рецептором клеточной поверхности, или лиганд, способный связываться с рецептором клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления цитокин выбран из GM-CSF, IFN γ , IL-2, IL-7, IL-12, IL-18, IL-21 и IL-36 γ . В некоторых вариантах осуществления лиганд для рецептора клеточной поверхности представляет собой лиганд Flt3 или TNFSF14. В некоторых вариантах осуществления хемокин выбран из CXCL10, CCL4, CCL21 и CCL5. В

некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула способна связываться с рецептором иммунной контрольной точки и ингибировать его. В некоторых вариантах осуществления рецептор иммунной контрольной точки представляет собой PD-1. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула способна связываться с опухолевым антигеном. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула представляет собой молекулу привлекающего Т-клетки биспецифического активатора (BiTE), или молекулу привлекающего Т-клетки биспецифического «легкого» активатора (LiTE). В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой вирусный антиген, выбранный из HBV-core (внутренний антиген гепатита В), HBV-pol, HbS-Ag, HPV E6, HPV E7, большого Т-антигена полиомавируса клеток Меркеля и антигена EBNA2 или BZLF1 вируса Эпштейна-Барра. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой DLL3 или EpCAM.

[0066] В одном аспекте данное изобретение относится к рекомбинантной матрице ДНК, содержащей от 5' к 3' последовательность промотора, 5' соединительную последовательность расщепления, полинуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу РНК, содержащую синтетический РНК-вирусный геном, хвост поли-А и 3' соединительную последовательность расщепления.

[0067] В одном аспекте данное изобретение относится к молекуле рекомбинантной ДНК, содержащей от 5' к 3' последовательность промотора, 5' соединительную последовательность расщепления, полинуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу РНК по изобретению, содержащую синтетический РНК-вирусный геном, хвост поли-А и 3' соединительную последовательность расщепления.

[0068] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК содержит лидерную последовательность между последовательностью промотора и 5' соединительной последовательностью расщепления.

[0069] В одном аспекте данное изобретение относится к молекуле рекомбинантной ДНК, содержащей от 5' к 3' последовательность промотора, лидерную последовательность, 5' соединительную последовательность расщепления, полинуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу рекомбинантной РНК, содержащую синтетический РНК-вирусный геном, хвост поли-А и 3' соединительную последовательность расщепления.

[0070] В некоторых вариантах осуществления лидерная последовательность имеет длину менее 100 п.н. В некоторых вариантах осуществления последовательность промотора представляет собой последовательность промотора T7. В некоторых вариантах

осуществления хвост поли-А имеет длину около 50-90 п.н. или около 65-75 п.н. В некоторых вариантах осуществления хвост поли-А имеет длину около 70 п.н. В некоторых вариантах осуществления хвост поли-А имеет длину около 10-50 п.н. или 25-35 п.н.

[0071] В некоторых вариантах осуществления 5' соединительная последовательность расщепления содержит последовательность рибозима или состоит из нее, и 3' соединительная последовательность расщепления содержит последовательность рибозима или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления 5' последовательность рибозима представляет собой последовательность рибозима типа «головка молотка», а 3' последовательность рибозима представляет собой последовательность рибозима вируса гепатита дельта. В некоторых вариантах осуществления 5' соединительная последовательность расщепления содержит последовательность связывания праймера РНКазы Н или состоит из нее, а 3' соединительная последовательность расщепления содержит последовательность распознавания ферментом рестрикции или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления 5' соединительная последовательность расщепления содержит последовательность рибозима или состоит из нее, а 3' соединительная последовательность расщепления содержит последовательность распознавания ферментом рестрикции или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления 5' последовательность рибозима содержит или состоит из последовательности рибозима типа «головка молотка», последовательности рибозима типа «пистолет» или модифицированной последовательности рибозима типа «пистолет».

[0072] В некоторых вариантах осуществления 3' соединительная последовательность расщепления содержит последовательность распознавания ферментом рестрикции типа IIS или состоит из нее.

[0073] В некоторых вариантах осуществления молекула РНК кодирует РНК-вирусный геном вируса Коксаки (CVA). В некоторых вариантах осуществления вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21. В некоторых вариантах осуществления лидерная последовательность содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70 %, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 14 или 15. В некоторых вариантах осуществления 5' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности рибозима типа «пистолет», по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 % или на 100 % идентичной последовательности с SEQ ID NO: 18, и при этом мотив P2 5' последовательности рибозима имеет полинуклеотидную последовательность

«TTTT». В некоторых вариантах осуществления 5' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности рибозима типа «пистолет», по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 % или на 100 % идентичной последовательности с SEQ ID NO: 17, и при этом мотив P2 5' последовательности рибозима имеет полинуклеотидную последовательность «TTTA». В некоторых вариантах осуществления 3' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности распознавания BsmBI. В некоторых вариантах осуществления 3' соединительная последовательность расщепления содержит последовательность распознавания BsaI или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления последовательность промотора представляет собой последовательность промотора T7, при этом лидерная последовательность состоит из полинуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 15, при этом 5' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности рибозима типа «пистолет» в соответствии с SEQ ID NO: 18, при этом хвост поли-А имеет длину около 70 п.н., и при этом 3' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности распознавания BsmBI. В некоторых вариантах осуществления последовательность промотора представляет собой последовательность промотора T7, при этом лидерная последовательность состоит из полинуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 15, при этом 5' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности рибозима типа «пистолет» в соответствии с SEQ ID NO: 18, при этом хвост поли-А имеет длину около 70 п.н., и при этом 3' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности распознавания BsaI.

[0074] В некоторых вариантах осуществления молекула РНК кодирует РНК-вирусный геном вируса долины Сенека (SVV). В некоторых вариантах осуществления лидерная последовательность содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70 %, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичной любой последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 53-63. В некоторых вариантах осуществления лидерная последовательность содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70 %, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления 5' последовательность рибозима представляет собой последовательность рибозима типа «пистолет», по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90

%, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичную последовательности SEQ ID NO: 64 или 65, и при этом мотив P2 5' последовательности рибозима имеет полинуклеотидную последовательность «ТCAA» или «TTAA». В некоторых вариантах осуществления РНК-вирусный геном содержит последовательность 5'-UTR (IRES), по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную нуклеиновым кислотам 1–670 последовательности SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления 3' соединительная последовательность расщепления содержит последовательность распознавания SapI или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления последовательность промотора представляет собой последовательность промотора T7, при этом лидерная последовательность состоит из полинуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 53, при этом 5' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности рибозима типа «пистолет» в соответствии с SEQ ID NO: 64, при этом хвост поли-А имеет длину около 70 п.н., и при этом 3' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности распознавания SapI. В некоторых вариантах осуществления последовательность промотора представляет собой последовательность промотора T7, при этом лидерная последовательность состоит из полинуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 58, при этом 5' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности рибозима типа «пистолет» в соответствии с SEQ ID NO: 64, при этом хвост поли-А имеет длину около 70 п.н., и при этом 3' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности распознавания SapI.

[0075] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК не содержит дополнительной нуклеиновой кислоты в области, охватывающей последовательность промотора и 3' соединительную последовательность расщепления.

[0076] В одном аспекте в данном изобретении предложен способ получения молекулы рекомбинантной РНК, включающий транскрипцию *in vitro* молекулы ДНК по изобретению и очистку полученной молекулы рекомбинантной РНК. В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной РНК содержит 5'- и 3'-концы, которые являются нативными для онколитического вируса, кодируемого синтетическим РНК-вирусным геномом.

[0077] В одном аспекте в изобретении предложена композиция, содержащая эффективное количество молекулы рекомбинантной РНК по изобретению и носитель, подходящий для введения субъекту-млекопитающему.

[0078] В одном аспекте в изобретении предложена частица, содержащая молекулу рекомбинантной РНК по изобретению. В некоторых вариантах осуществления частица является биоразлагаемой. В некоторых вариантах осуществления частица выбрана из группы, состоящей из наночастицы, экзосомы, липосомы и липоплекса. В некоторых вариантах осуществления экзосома представляет собой модифицированную экзосому, полученную из интактной экзосомы или пустой экзосомы.

[0079] В одном аспекте в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая множество частиц по изобретению. В некоторых вариантах осуществления множество частиц имеет средний размер от около 50 нм до около 500 нм, от около 150 нм до около 500 нм, от около 200 нм до около 500 нм, от около 300 нм до около 500 нм, от около 350 нм до около 500 нм, от около 400 нм до около 500 нм, от около 425 нм до около 500 нм, от около 450 нм до около 500 нм или от около 475 нм до около 500 нм. В некоторых вариантах осуществления средний размер множества частиц составляет от около 50 нм до около 120 нм. В некоторых вариантах осуществления множество частиц имеет средний размер около 50 нм, 60 нм, 70 нм, 80 нм, 90 нм, 100 нм, 110 нм или около 120 нм. В некоторых вариантах осуществления множество частиц имеет средний размер около 100 нм.

[0080] В некоторых вариантах осуществления множество частиц имеет средний дзета-потенциал от около 40 мВ до около -40 мВ, от около 20 мВ до около -20 мВ, от около 10 мВ до около -10 мВ, от около 5 мВ до около -5 мВ или от около 20 мВ до около -40 мВ. В некоторых вариантах осуществления множество частиц имеет средний дзета-потенциал менее около 5 мВ, менее около 0 мВ, менее около -5 мВ, менее около -10 мВ, менее около -20 мВ, менее около -30 мВ, менее около -35 мВ или менее около -40 мВ. В некоторых вариантах осуществления множество частиц имеет средний дзета-потенциал от около -50 мВ до около -20 мВ, от около -40 мВ до около -20 мВ, от около -30 мВ до около -10 мВ, от около -20 мВ до около 0 мВ, от около -15 мВ до около 5 мВ или от около -10 мВ до около 10 мВ. В некоторых вариантах осуществления средний дзета-потенциал множества частиц составляет около -30 мВ, около -31 мВ, около -32 мВ, около -33 мВ, около -34 мВ, около -35 мВ, около -36 мВ, около -37 мВ, около -38 мВ, около -39 мВ или около -40 мВ.

[0081] В некоторых вариантах осуществления доставка композиции субъекту доставляет инкапсулированную молекулу рекомбинантной РНК в клетку-мишень, при этом инкапсулированная молекула рекомбинантной РНК продуцирует инфекционный вирус, способный лизировать клетку-мишень.

[0082] В одном аспекте в данном изобретения предложена неорганическая частица,

содержащая молекулу рекомбинантной РНК по изобретению. В некоторых вариантах осуществления неорганическая частица выбрана из группы, состоящей из золотой наночастицы (ЗНЧ), золотого наностержня (ЗНС), магнитной наночастицы (МНЧ), магнитной нанотрубки (МНТ), углеродного нанорога (УНР), углеродного фуллерена, углеродной нанотрубки (УНТ), наночастицы фосфата кальция (НЧФК), наночастицы мезопористого кремнезема (НЧМК), нанотрубки кремнезема (НТК) или звездообразной полый наночастицы кремнезема (ЗПНЧ). В некоторых вариантах осуществления средний диаметр частиц составляет менее около 500 нм, составляет от около 50 нм до 500 нм, составляет от около 250 нм до около 500 нм или составляет около 350 нм.

[0083] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по изобретению, частица по изобретению или неорганическая частица по изобретению дополнительно содержат вторую молекулу рекомбинантной РНК, кодирующую молекулу полезной нагрузки. В некоторых вариантах осуществления вторая молекула рекомбинантной РНК представляет собой репликон.

[0084] В одном аспекте в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая ЛНЧ по изобретению, частицу по изобретению или неорганическую частицу по изобретению, причем композиция составлена для внутривенной и/или внутриопухолевой доставки. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой раковую клетку.

[0085] В одном аспекте в данном изобретении предложен способ уничтожения раковой клетки, включающий воздействие на раковую клетку частицы по изобретению, молекулы рекомбинантной РНК по изобретению или их композиций, в условиях, достаточных для внутриклеточной доставки частицы в указанную раковую клетку, при этом репликационно-компетентный вирус, продуцируемый инкапсулированным полинуклеотидом, приводит к уничтожению раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления репликационно-компетентный вирус не продуцируется в нераковых клетках. В некоторых вариантах осуществления способ выполняют *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*.

[0086] В одном аспекте в данном изобретении предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту, страдающему раком, эффективного количества частицы по изобретению, молекулы рекомбинантной РНК по изобретению или их композиций. В некоторых вариантах осуществления частицу или ее композицию вводят внутривенно, интраназально, внутриопухолемо, внутрибрюшинно или в виде ингаляции. В некоторых вариантах осуществления частицу или ее композицию вводят внутриопухолемо и/или внутривенно. В некоторых вариантах осуществления частицу или ее композицию

вводят субъекту повторно. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой мышь, крысу, кролика, кошку, собаку, лошадь, примата, отличного от человека, или человека.

[0087] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак легкого, рак молочной железы, рак толстой кишки или рак поджелудочной железы, при этом синтетический РНК-вирусный геном содержит полинуклеотидную последовательность, полученную из штамма KY. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак мочевого пузыря, почечно-клеточную карциному, рак яичников, рак желудка или рак печени, при этом синтетический РНК-вирусный геном содержит полинуклеотидную последовательность, полученную из штамма EF.

[0088] В некоторых вариантах осуществления рак выбран из рака легких, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака предстательной железы, рака яичек, колоректального рака, рака толстой кишки, рака поджелудочной железы, рака печени, почечно-клеточной карциномы, рака желудка, рака головы и шеи, рака щитовидной железы, злокачественной глиомы, глиобластомы, меланомы, В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза, множественной миеломы, моноклональной гаммапатии неустановленной значимости (MGUS), карциномы из клеток Меркеля, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), саркомы, нейробластомы, нейроэндокринного рака, рабдомиосаркомы, медуллобластомы, рака мочевого пузыря и лимфомы маргинальной зоны (MZL). В некоторых вариантах осуществления рак выбран из групп, состоящей из рака легкого, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, почечно-клеточной саркомы, рака яичников, рака желудка и рака печени. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой почечно-клеточную карциному, рак легкого или рак печени. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой мелкоклеточный рак легкого или немелкоклеточный рак легкого (например, плоскоклеточный рак легкого или аденокарциному легкого). В некоторых вариантах осуществления рак печени представляет собой гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК) (например, ГЦК, ассоциированную с вирусом гепатита В). В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой нейроэндокринный рак предстательной железы, возникший после начала лечения. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак легкого, рак печени, рак предстательной железы (например, CRPC-NE), рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, рак желудка, рак молочной железы, нейробластому, почечно-клеточную карциному, рак яичников, рабдомиосаркому, медуллобластому, нейроэндокринный рак, карциному из

клеток Меркеля или меланому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой мелкоклеточный рак легкого (МРЛ) или нейробластому.

[0089] В одном аспекте данное изобретение относится к способу лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества вируса CVA21-EF.

[0090] В одном аспекте данное изобретение относится к способу лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества вируса CVA21-KY.

[0091] В одном аспекте данное изобретение относится к способу лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества вируса CVA21-Kuykendall.

[0092] В некоторых вариантах осуществления вирус вводят внутриопухолево и/или внутривенно.

[0093] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту ингибитора иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор PD-1. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение сконструированной иммунной клетки, содержащей сконструированный антигенный рецептор.

[0094] В одном аспекте в данном изобретении предложен способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества онколитического вируса Коксаки, при этом вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21, или полинуклеотида, кодирующего CVA21, при этом рак классифицируется как чувствительный к инфекции CVA21 на основе экспрессии ICAM-1 и/или процентного содержания ICAM-1-положительных раковых клеток.

[0095] В одном аспекте в данном изобретении предложен способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий:

(a) определение уровня экспрессии ICAM1 и/или процентного содержания ICAM-1-положительных раковых клеток при раке;

(b) классификацию рака как чувствительного к инфекции вирусом Коксаки 21 (CVA21) на основе экспрессии ICAM-1 и/или процентного содержания ICAM-1-положительных раковых клеток, определенных на стадии (a); и

(c) введение субъекту терапевтически эффективного количества CVA21 или полинуклеотида, кодирующего CVA21, если рак классифицируется как чувствительный к инфекции CVA21 на стадии (b).

[0096] В одном аспекте в данном изобретении предложен способ выбора субъекта, страдающего раком, для лечения вирусом Коксаки 21 (CVA21) или полинуклеотидом, кодирующим CVA21, включающий:

- (а) определение уровня экспрессии ICAM-1 и/или процентного содержания ICAM-1-положительных раковых клеток при раке;
- (b) классификацию рака как чувствительного к инфекции вирусом CVA21 на основе уровня экспрессии ICAM-1 и/или процентного содержания ICAM1-положительных раковых клеток, как определено на стадии (а);
- (с) выбор субъекта для лечения CVA21 или полинуклеотидом, кодирующим CVA21, если рак классифицируется как чувствительный к инфекции CVA21 на стадии (b);
- и
- (d) введение CVA21 или полинуклеотида, кодирующего CVA21, выбранным субъектам

[0097] В некоторых вариантах осуществления штамм CVA21 представляет собой CVA21-KY.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0098] На **Фиг. 1** показан объем опухоли у мышей с опухолями SK-MEL-28 после внутриопухолевого введения PBS или молекул CVA21-РНК, составленных с липофектамином, или внутривенного введения ЛНЧ, содержащих молекулы РНК штамма CVA21-Kuykendall (ID состава № 70032-6C).

[0099] На **Фиг. 2А** показан обзор транскрипционного подхода *in vitro* для создания аутентичного 3'-конца пикорнавирусов с использованием 3'-сайтов распознавания ферментом рестрикции типа PIS. На **Фиг. 2В** показан электрофорез расщепления ДНК ферментом рестрикции BsmBI или BsaI.

[00100] На **Фиг. 3** показан подход на основе РНКазы H для создания аутентичного 5'-конца пикорнавирусов с использованием 5'-праймеров ДНК и фермента РНКазы H.

[00101] На **Фиг. 4** показан подход на основе рибозима для создания аутентичного 5'-конца пикорнавируса.

[00102] На **Фиг. 5А – Фиг. 5В** показаны рибозимы типа «головки молотка», образующие дискретные 5'-концы. На **Фиг. 5А** показана структурная модель минимального рибозима типа «головка молотка» (NHR), который отжигается и расщепляется на 5'-конце по стрелке (SEQ ID NO: 75). На **Фиг. 5В** показана структурная модель рибозима со стабилизированным стеблем I (STBL) для расщепления 5'-конца по стрелке (SEQ ID NO: 76).

[00103] На Фиг. 6А – Фиг. 6С показаны рибозимы типа «пистолет», образующие дискретные 5'-концы. На Фиг. 6А показана схема характеристик рибозима типа «пистолет» дикого типа (SEQ ID NO: 77). На Фиг. 6В показан рибозим типа «пистолет» из *P. Polymyxa* с тетрапетлей, добавленной для слияния цепей РЗ, смоделированных с помощью mFOLD. Пунктирный прямоугольник представляет собой область, подвергнутую мутагенизации для сохранения фолдинга рибозима в контексте вирусной последовательности. Последовательность «GUC», показанная в пунктирном прямоугольнике, была мутирована в «UCA» для создания типа «пистолет» 1, а последовательность «GUC» была мутирована в «TTA» для создания типа «пистолет» 2. (SEQ ID NO: 78) На Фиг. 6С показано выравнивание последовательностей нескольких вариантов рибозима типа «пистолет» и расположение мотива Р2.

[00104] На Фиг. 7А – Фиг. 7В показано получение инфекционного вируса CVA21 из полинуклеотидов РНК. На Фиг. 7А показано влияние последовательностей 5'-UTR на продукцию инфекционного CVA21 из полинуклеотидов РНК. На Фиг. 7В показано получение инфекционного CVA21 из полинуклеотидов РНК, содержащих 5'-UTR SEQ ID NO: 2.

[00105] На Фиг. 8А – Фиг. 8В показаны эффекты CVA-ЛНЧ *in vivo*. На Фиг. 8А показаны размеры опухоли. На Фиг. 8В показаны изменения массы тела с течением времени. На Фиг. 8С показаны результаты лизиса клеток H1299 вследствие инфекции CVA21 (слева) и вестерн-анализ экспрессии ICAM1 и DAF в указанных клеточных линиях (справа). На Фиг. 8Д показаны диаграммы, показывающие среднюю экспрессию мРНК и белка ICAM-1 в 130 клеточных линиях человека на основе их чувствительности/резистентности к инфекции CVA21-KY. На Фиг. 8Е показана диаграмма, показывающая корреляцию между экспрессией ICAM-1 и чувствительностью к инфекции CVA21-KY.

[00106] На Фиг. 9 показано схематическое изображение композиции ЛНЧ/РНК пикорнавируса и способа действия. РНК ЛНЧ/пикорнавируса вводят системно, а геномы РНК пикорнавируса доставляют в пермиссивные опухолевые клетки, где они реплицируются и продуцируют вирионы пикорнавируса. Затем пикорнавирусная инфекция распространяется на соседние опухолевые клетки, вызывая онколиз и противовирусный иммунный ответ.

[00107] На Фиг. 10 показан процесс транскрипции *in vitro* для CVA21-РНК и Нег-РНК. Автокаталитическое расщепление CVA21-РНК 5' и 3' рибозимом (Rib) привело к образованию CVA21-РНК с дискретными 5'- и 3'-концами, необходимыми для репликации. Напротив, конструкция Нег-РНК лишена последовательности рибозима и не

способна к репликации и продукции вирионов.

[00108] На Фиг. 11А показана общая схема использования соединительных последовательностей расщепления для удаления невирусных полинуклеотидов РНК из транскриптов генома с целью сохранения нативных 5'- и 3'-дискретных концов вируса. На Фиг. 11В показана схема использования соединительных последовательностей расщепления для удаления невирусных полинуклеотидов РНК из транскриптов генома с целью сохранения нативных 5'- и 3'-дискретных концов вируса, при этом 3' соединительная последовательность расщепления содержит сайт распознавания ферментом рестрикции.

[00109] На Фиг. 12А – Фиг. 12В показана обобщенная диаграмма AUC, полученная в результате скрининга цитотоксичности для трех штаммов CVA21 (Фиг. 12А), и их относительные значения IC50 для каждой отдельной клеточной 15 линии (Фиг. 12В).

[00110] На Фиг. 13 показаны значения IC50 трех штаммов CVA21 для каждой отдельной клеточной линии при различных типах рака.

[00111] На Фиг. 14 показаны результаты, представленные в виде отношения значений AUC для штаммов EF и KY с использованием клеточных линий рака легких и NSCLC.

[00112] На Фиг. 15А – Фиг. 15С показаны результаты, представленные в виде отношения значений AUC для штаммов EF и KY с использованием клеточных линий рака молочной железы (Фиг. 15А), толстой кишки/ЖКТ (Фиг. 15В) и поджелудочной железы (Фиг. 15С).

[00113] На Фиг. 16А показана экспрессия ICAM-1 на микроматрице рака легких человека с помощью иммуногистохимии. Сюда входит процент опухолевых клеток, которые являются положительными по ICAM-1, и H-оценка (формула включает процент клеток, которые экспрессируют уровни интенсивности ICAM-1 +1, +2, +3). На Фиг. 16В показана онколитическая эффективность штаммов EF и KY в отношении различных клеточных линий рака аденокарциномы легких. На Фиг. 16С показана онколитическая эффективность штаммов EF и KY в отношении различных клеточных линий крупноклеточного рака легких.

[00114] На Фиг. 17А – Фиг. 17Е показаны результаты, представленные в виде отношения значений AUC для штаммов EF и KY с использованием клеточных линий рака мочевого пузыря (Фиг. 17А), почек (Фиг. 17В), почек (Фиг. 17С), яичника (Фиг. 17D) и GBM (Фиг. 17Е).

[00115] На Фиг. 18А показаны результаты, представленные в виде

отношения значений AUC для штаммов EF и KY с использованием клеточных линий рака молочной железы. **На Фиг. 18В** показаны результаты, представленные в виде отношения значений AUC для штаммов EF и KY с использованием клеточных линий почечно-клеточной карциномы. **На Фиг. 18С** показаны результаты, представленные в виде отношения значений AUC для штаммов EF и KY с использованием клеточных линий гепатоцеллюлярной карциномы.

[00116] На Фиг. 19 представляет собой таблицу, обобщающую чувствительность клеточных линий к штаммам KY и EF на основе значения TCID₅₀.

[00117] На Фиг. 20А и Фиг. 20В показаны диаграммы, отображающие количество копий штаммов KY и EF в диссоциированных опухолевых клетках человека от трех доноров через 24 часа и 72 часа после инфицирования.

[00118] На Фиг. 21 показано изменение размеров опухоли с течением времени у животных, получавших указанные ЛНЧ, на основе модели ксенотрансплантата NCI-H1299 и рассчитанного процента TGI.

[00119] На Фиг. 22 показано изменение размеров опухоли с течением времени у животных, получавших указанные ЛНЧ, на основе модели ксенотрансплантата NCI-H2122 и рассчитанного процента TGI.

[00120] На Фиг. 23 показано изменение размеров опухоли с течением времени у животных, получавших указанные ЛНЧ, на основе модели ксенотрансплантата PC3 и рассчитанного процента TGI.

[00121] На Фиг. 24 показано изменение массы тела с течением времени у животных, получавших указанное лечение (верхний график), а также изменения химического состава печени (нижние графики).

[00122] На Фиг. 25А – Фиг. 25С показано количество копий цепи РНК CVA21 на основе ОТ-кПЦР в различных тканях животных, обработанных ЛНЧ, содержащими указанный вирусный геном. **На Фиг. 25А** показано количество копий (-)-цепи РНК CVA21 через 48 часов после обработки. **На Фиг. 25В** показано количество копий (-)-цепи РНК CVA21 через 7 дней после обработки. **На Фиг. 25С** показана диаграмма, отображающая количество копий (+)-цепи РНК CVA21 на основе ОТ-кПЦР в различных тканях животных, обработанных ЛНЧ, содержащими указанный вирусный геном, через 48 часов или 7 дней после инфицирования.

[00123] На Фиг. 26 показаны результаты анализа вирусных бляшек образцов, извлеченных из указанных тканей.

[00124] На Фиг. 27А – Фиг. 27С показана выживаемость клеток указанных клеточных линий, предварительно обработанных увеличивающимся количеством IFN

перед инфицированием указанными штаммами вируса. Для расчета относительного процента выживших клеток, значение 100% установлено в соответствии с группой ложного инфицирования, тогда как значение 0% установлено в соответствии с группами инфицирования вирусом CVA21 без предварительной обработки IFN. **На Фиг. 27А** показаны результаты для клеточных линий H1299. **На Фиг. 27В** показаны результаты для клеточных линий H2122. **На Фиг. 27С** показаны результаты для клеточных линий HFF.

[00125] **На Фиг. 28А** показано относительное соотношение частот устойчивости к рибавирину указанных штаммов вируса. **На Фиг. 28В** показано количество рекомбинированных жизнеспособных вирусов, выделенных из указанных аналитических групп.

[00126] **На Фиг. 29А** показана схема конструкции матрицы для анализа лидерной последовательности и 5' последовательности рибозима. **На Фиг. 29В** показаны результаты гель-электрофореза указанных продуктов транскрипции *in vitro* на основе различных схем лидерных последовательностей.

[00127] **На Фиг. 30** показаны результаты гель-электрофореза указанных продуктов транскрипции *in vitro* на основе различных схем 5' рибозима.

[00128] **На Фиг. 31А** показана диаграмма, показывающая изменение размеров опухолей с течением времени у животных, получавших указанные ЛНЧ, содержащие РНК-вирусные геномы, полученные в результате транскрипции *in vitro* матриц ДНК с различными схемами (например, с различной длиной хвоста поли-А и 5' последовательностями рибозима), с использованием модели ксенотрансплантата NCI-H1299. **На Фиг. 31В** показаны диаграммы, отображающие изменение размеров опухолей с течением времени у животных, получавших указанные ЛНЧ.

[00129] **На Фиг. 32** показаны схемы организации доменов РНК-вирусных геномов трех штаммов CVA21 (EF, KY и Kuykendall) и начальные/конечные положения нуклеиновой кислоты селективной области.

[00130] **На Фиг. 33** показаны схемы неограничивающего примера схемы конструкции экспрессии CVA21 и соответствующего процесса транскрипции *in vitro* для создания синтетических РНК-вирусных геномов с точными 5'- и 3'-концами.

[00131] **На Фиг. 34** показана схема, показывающая доменную организацию вирусного генома SVV и конструкцию химерных вирусов.

[00132] **На Фиг. 35** показаны изображения флуоресцентной микроскопии клеток NCI-H69AR, инфицированных химерными вирусами SVV-001 или SVV-IRES, несущими репортерный ген GFP.

[00133] **На Фиг. 36** показаны диаграммы, отображающие интенсивность

флуоресценции клеток NCI-H69AR и NCI-H69, инфицированных указанными вирионами SVV с предварительной обработкой IFN α или без нее (слева), и репрезентативные изображения флуоресцентной микроскопии через 12 часов после инфицирования (справа).

[00134] На **Фиг. 37** показаны изображения флуоресцентной микроскопии клеток NCI-H69AR, инфицированных химерными вирусами SVV-001 или SVV-P1, несущими репортерный ген GFP.

[00135] На **Фиг. 38A** и **Фиг. 38B** показаны изображения флуоресцентной микроскопии клеток NCI-H69AR, инфицированных химерными вирусами SVV-001 или SVV-P3, несущими репортерный ген GFP.

[00136] На **Фиг. 39A** показана конструкция матрицы для лидерной последовательности и анализ 5' последовательности рибозима для матрицы SVV. На **Фиг. 39B** показаны результаты гель-электрофореза указанных продуктов транскрипции *in vitro* на основе различных схем лидерных последовательностей для матрицы SVV. На **Фиг. 39C** показан результат анализа вирусных бляшек с использованием клеток H1299. На **Фиг. 39D** показан анализ ОФ-ВЭЖХ продуктов транскрипции вирусных геномов *in vitro* с использованием различных лидерных последовательностей SVV.

[00137] На **Фиг. 40A - Фиг. 40C** показаны результаты исследования эффективности титрования дозы *in vivo*. Бестимусных голых мышей с опухолями H446 лечили указанными ЛНЧ. На **Фиг. 40A** показаны размеры опухоли с течением времени. На **Фиг. 40B** показаны измерения ОТ-кПЦР для репликации SVV в опухолевых тканях мышей, обработанных ЛНЧ 96062-1 в дозе 0,1 мг/кг. На **Фиг. 40C** показан анализ FISH для репликации SVV.

[00138] На **Фиг. 41** показаны размеры опухолей с течением времени у мышей с опухолями H446, обработанных ЛНЧ.

[00139] На **Фиг. 42** показано изменение размеров опухоли с течением времени у животных, получавших указанные ЛНЧ, на основе модели опухоли SCLC H446.

[00140] На **Фиг. 43** показано изменение размеров опухоли с течением времени у животных, получавших указанные ЛНЧ или вирионами SVV, в присутствии или отсутствии нейтрализующего антитела к SVV, на основе модели опухоли SCLC H446.

[00141] На **Фиг. 44** показано изменение размеров опухоли с течением времени у животных, получавших указанные ЛНЧ, на основе модели опухоли SCLC H82.

[00142] На **Фиг. 45** показана вероятность выживания с течением времени у животных, получавших указанные ЛНЧ, на основе ортотопической модели опухоли SCLC H82.

[00143] На **Фиг. 46A** показана диаграмма, показывающая количественный

анализ опухолевой нагрузки на основе ИГХ hDLL3. **На Фиг. 46В** показаны изображения ИГХ hDLL3.

[00144] **На Фиг. 47А и Фиг. 47В** показаны результаты лечения SVV на модели опухоли SCLC PDX. **На Фиг. 47А** показано изменение размеров опухоли с течением времени у животных, получавших указанные ЛНЧ, на основе модели опухоли SCLC PDX. **На Фиг. 47В** показаны результаты измерения с помощью ОТ-кПЦР.

[00145] **На Фиг. 48** показано изменение размеров опухоли с течением времени у животных, получавших указанные ЛНЧ, содержащие РНК-вирусный геном SVV с различной длиной хвоста поли-А.

[00146] **На Фиг. 49А – Фиг. 49G** показана инфильтрация иммунных клеток и эффекты комбинированного лечения SVV/ЛНЧ и антителом к PD1 на модели сингенной нейробластомы N1E-115. **На Фиг. 49А** показано количество NK-, NKT-, CD4, CD8 и Treg-клеток на мг опухоли. **На Фиг. 49В** показано соотношение CD8/Treg. **На Фиг. 49С** показано количество CD8 Т-клеток на мг опухоли, которые экспрессируют CTLA-4 или PD-1. **На Фиг. 49D** показано количество CD8 Т-клеток на мг опухоли, которые представляют собой SLEC (CD127-KLRG1+) или MPEC (CD127+-KLRG1-). **На Фиг. 49Е** показано соотношение макрофагов M1/M2. **На Фиг. 49F** показано количество макрофагов M1 и M2. **На Фиг. 49G** показано количество клеток CD45-PD-L1+ на мг опухоли.

[00147] **На Фиг. 50** показано изменение размеров опухоли с течением времени у животных, получавших указанные ЛНЧ, на основе модели сингенной нейробластомы N1E-115.

[00148] **На Фиг. 51** показаны комбинированные эффекты терапии SVV-ЛНЧ и антителом к PD1 у животных модели сингенной нейробластомы N1E-115.

[00149] **На Фиг. 52А** показана диаграмма, отображающая результаты исследования на мышинной модели опухоли H446, показывающий рост опухоли при приеме повторной дозы композиций ЛНЧ по данному изобретению. **На Фиг. 52В** показана диаграмма, показывающая изменение массы тела мышинной модели опухоли H446 после введения композиции ЛНЧ.

[00150] **На Фиг. 53А и Фиг. 53В** показаны диаграммы, изображающие результаты ФК-исследования на мышах композиций ЛНЧ, содержащих PEG2k-DPG, PEG2k-DMG или BRIJ™ S100 в качестве ПЭГ-липида.

[00151] **На Фиг. 54А** показан профиль поглощения при УФ-А280 вирусного генома CVA21 с различной длиной хвоста поли-А с использованием олиго-dT-хроматографии. **На Фиг. 54В** показан профиль поглощения при УФ-А280 вирусного генома SVV с различной длиной хвоста поли-А с использованием олиго-dT-

хроматографии.

[00152] На Фиг. 55А – Фиг. 55С показаны характеристики частиц композиций ЛНЧ CAT4 и CAT5. На Фиг. 55А показаны размеры частиц, а на Фиг. 55В показан индекс полидисперсности, определенный в эксперименте по динамическому светорассеянию композиций ЛНЧ CAT4 и CAT5, приготовленных с различными буферами, подкисляющими РНК. На Фиг. 55С показана эффективность инкапсуляции данных композиций ЛНЧ, измеренная с помощью RiboGreen.

[00153] На Фиг. 56А – Фиг. 56С показаны характеристики частиц композиций ЛНЧ, содержащих указанные САТ-липиды. На Фиг. 56А показаны размеры частиц, а на Фиг. 56В показан индекс полидисперсности, определенный в эксперименте по динамическому светорассеянию композиций ЛНЧ. На Фиг. 56С показана эффективность инкапсуляции данных композиций ЛНЧ, измеренная с помощью RiboGreen.

[00154] На Фиг. 57 показано схематическое представление процесса приготовления составов ЛНЧ.

[00155] На Фиг. 58А – Фиг. 58F показаны уровни РНК, измеренные с помощью активации люциферазы NanoLuc. На Фиг. 58А, Фиг. 58В и Фиг. 58С показаны уровни РНК, измеренные с помощью активации люциферазы NanoLuc через 96 часов после введения дозы соответствующих составов ЛНЧ. На Фиг. 58D, Фиг. 58Е и Фиг. 58F показаны уровни РНК, измеренные с помощью активации люциферазы NanoLuc через 72 часа после введения дозы соответствующих составов ЛНЧ.

[00156] На Фиг. 59А - Фиг. 59Е показан объем опухоли (слева) и изменение массы тела (справа) за дни лечения мышей, получавших соответствующие составы ЛНЧ. На Фиг. 59А показаны результаты для составов ЛНЧ CAT1, 2, 3, 4 и 5. На Фиг. 59В показаны результаты для составов ЛНЧ CAT6, 7, 8, 9 и 10. На Фиг. 59С показаны результаты для CAT11, 12, 13, 14, 15, 16. На Фиг. 59D показаны результаты для составов ЛНЧ CAT17, 19, 20, 25, 31 и 7. На Фиг. 59Е показаны результаты для составов ЛНЧ CAT18, 21, 22, 23, 26, 28, 29, 32, 34.

[00157] На Фиг. 60А – Фиг. 60В показаны уровни РНК *in vivo* и их влияние на объем опухоли и массу тела для указанных составов ЛНЧ. На Фиг. 60А показаны уровни РНК, измеренные по люминесценции, вызванной активацией люциферазы NanoLuc через 72 ч после введения дозы соответствующих составов ЛНЧ. На Фиг. 60В показан объем опухоли (справа) и изменение массы тела (справа) за дни лечения мышей, получавших соответствующие составы ЛНЧ.

[00158] На Фиг. 61А-61D показана концентрацию ионизируемого липида,

содержащегося в ЛНЧ (SS-OC), в плазме обработанных мышей, измеренную с помощью ЖХ-МС. **На Фиг. 61А** показаны результаты для OC/Brij по схеме дозирования Q1W2. **На Фиг. 61В** показаны результаты для OC/Brij по схеме дозирования Q2W2. **На Фиг. 61С** показаны результаты для OC/DMG по схеме дозирования Q2W2. **На Фиг. 61D** показаны результаты для OC/DPG по схеме дозирования Q2W2.

[00159] **На Фиг. 62А - Фиг. 62F** показана концентрация ионизируемого липида, содержащегося в ЛНЧ (SS-OC или CAT7), в плазме обработанных мышей, измеренная с помощью ЖХ-МС. **На Фиг. 62А** показаны результаты для OC/Brij по схеме дозирования Q2W2. **На Фиг. 62В** показаны результаты для CAT7/DMG_6 по схеме дозирования Q2W2. **На Фиг. 62С** показаны результаты для CAT7/DMG_3 по схеме дозирования Q2W2. **На Фиг. 62D** показаны результаты для CAT7/DMG_5 по схеме дозирования Q2W2. **На Фиг. 62Е** показаны результаты для CAT7/DMG1_1 по схеме дозирования Q2W2. **На Фиг. 62F** показаны результаты для CAT7/CHM6_4 по схеме дозирования Q2W2.

[00160] **На Фиг. 63А - Фиг. 63Е** показана концентрация ионизируемого липида, содержащегося в ЛНЧ (SS-OC, CAT7 или CAT11), в плазме обработанных мышей, измеренная с помощью ЖХ-МС. **На Фиг. 63А** показаны результаты для CAT7/Brij. **На Фиг. 63В** показаны результаты для OC/DMG. **На Фиг. 63С** показаны результаты для CAT7/CHM6_4. **На Фиг. 63D** показаны результаты для CAT11/DMG. **На Фиг. 63Е** показаны результаты для CAT11/Brij.

[00161] **На Фиг. 64А и Фиг. 64В** отображают уровни IgM в указанные временные точки у мышей, получавших соответствующие составы ЛНЧ, измеренные с помощью ИФА.

[00162] **На Фиг. 65А и Фиг. 65В** показаны уровни IgG в указанные временные точки у мышей, получавших соответствующие составы ЛНЧ, измеренные с помощью анализа ИФА.

[00163] **На Фиг. 66А и Фиг. 66В** показаны уровни мРНК BITE (**Фиг. 66А**) или hERO (**Фиг. 66В**) в плазме, измеренные с помощью ECL-анализа.

[00164] **На Фиг. 67** показана А-оптимальная схема скрининговых экспериментов ЛНЧ, содержащих CAT7.

[00165] **На Фиг. 68** показаны прогнозирующие профили, смоделированные на основе плана прогонов экспериментов для ЛНЧ, содержащих CAT7, с использованием способа самопроверяющегося ансамблевого моделирования

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00166] В данной области техники существует потребность в выборе

конкретного штамма онколитического вируса с соответствующим тропизмом и высокой эффективностью в отношении конкретных типов рака. Различные штаммы вирусов, даже принадлежащие к одному и тому же виду, сильно различаются по эффективности уничтожения раковых клеток и токсичности. Химерный вирус может быть создан путем замены части вирусного генома одного вирусного штамма соответствующей частью другого штамма. В некоторых вариантах осуществления такой химерный вирус может быть более эффективным в уничтожении раковых клеток и/или обладать другими полезными свойствами. Кроме того, получение композиций, содержащих такие вирусы или соответствующие вирусные геномы, требует оптимизации конструкции векторной матрицы, а также процесса производства (например, экспрессии, очистки, инкапсуляции и хранения). В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены вирусные геномы и конструкция матрицы векторов для вирусной экспрессии *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления вирусные геномы являются репликационно-компетентными. В данном изобретении также предложены вирусные геномы, которые могут быть инкапсулированы в неиммуногенную частицу, такую как липидная наночастица, полимерная наночастица или экзосома, которую можно повторно вводить субъекту. В некоторых вариантах осуществления частица дополнительно инкапсулирует полинуклеотид, кодирующий молекулу полезной нагрузки. Соответственно, данное изобретение позволяет системно доставлять безопасный и эффективный рекомбинантный полинуклеотидный вектор и предлагает способы лечения и профилактики широкого спектра пролиферативных расстройств (*например*, видов рака).

[00167] Заголовки разделов, используемые в данном документе, предназначены только для организационных целей и не должны рассматриваться как ограничение описываемого объекта изобретения. Все документы или части документов, приведенные в данном документе, в том числе, без ограничения, патенты, заявки на патент, статьи, книги и научные труды включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для любой цели. В случае, если один или большее количество из включенных документов или частей документов определяют термин, который противоречит определению этого термина в приложении, определение, приведенное в данной заявке, является превалирующим. Однако упоминание любых ссылок, статей, публикаций, патентов, патентных публикаций и патентных заявок, цитируемых в данном документе не является и не должно восприниматься как признание или любая форма предположения, что они составляют действительный уровень техники или образуют часть общедоступных сведений в любой стране мира.

Определения

[00168] В данном описании любой диапазон концентрации, процентный диапазон, диапазон отношения или целочисленный диапазон следует понимать как включающий значение любого целого числа в указанном диапазоне и, при необходимости, части целого числа (например, одна десятая и одна сотая часть целого числа), если не указано иное. Следует понимать, что термины в единственном числе, используемые в данном документе, относятся к «одному или более» из перечисленных компонентов, если не указано иное. Использование альтернативы (*например*, «или») следует понимать как означающее один из вариантов, оба варианта или любую из комбинаций в качестве альтернативы. В настоящем документе термины «включает» и «содержит» используются как синонимы. Используемый в данном документе термин «множество» может относиться к одному или нескольким компонентам (*например*, к одной или более целевым последовательностям микроРНК). В данной заявке применение «или» означает «и/или», если не указано иное.

[00169] При использовании в данной заявке термины «около» и «приблизительно» используются в качестве эквивалентов. Любые цифры, используемые в данной заявке с или без дополнения «около/приблизительно», предназначены для охвата любых нормальных вариаций оцененных специалистом в соответствующей области техники. В некоторых вариантах осуществления термин «приблизительно» или «около» относится к диапазону значений, которые попадают в пределы 10 % в любую сторону (больше или меньше) от установленного эталонного значения, если не указано иное или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышало бы 100 % от возможного значения). В некоторых вариантах осуществления термин «приблизительно» или «около» относится к диапазону значений, которые находятся в пределах 10% в любом направлении (больше или меньше) от установленного эталонного значения, если не указано иное или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышало бы 100 % от возможного значения).

[00170] «Уменьшение» или «снижение» относится к уменьшению или снижению определенного значения по меньшей мере на 5%, например, на 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 или 100% по сравнению с контрольным значением. Уменьшение или снижение конкретного значения может быть также представлено в виде кратного изменения значения по сравнению с контрольным значением, например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 1000-кратное или более уменьшение по сравнению с контрольным значением.

[00171] «Увеличение» означает увеличение конкретного значения по меньшей мере на 5%, например, на 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99, 100, 200, 300, 400, 500% или более по сравнению с контрольным значением. Увеличение конкретного значения может быть также представлено в виде кратного изменения значения по сравнению с контрольным значением, например, по меньшей мере 1-кратное, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 1000-кратное или более увеличение по сравнению с уровнем контрольного значения.

[00172] Термин «идентичность последовательности» относится к проценту оснований или аминокислот между двумя полинуклеотидными или полипептидными последовательностями, которые являются одинаковыми и находятся в одинаковом относительном положении. Как таковая, одна полинуклеотидная или полипептидная последовательность имеет определенный процент идентичности последовательности по сравнению с другой полинуклеотидной или полипептидной последовательностью. Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность служит эталонной последовательностью, с которой сравнивают исследуемые последовательности. Термин «контрольная последовательность» относится к молекуле, с которой сравнивается тестовая последовательность. Если не указано иное, термин «идентичность последовательности» в формуле изобретения относится к идентичности последовательности, рассчитанной с помощью Clustal Omega® версии 1.2.4 с использованием параметров по умолчанию.

[00173] Термин «полученный из» относится к полипептидной или полинуклеотидной последовательности, которая содержит всю или часть эталонной полипептидной или полинуклеотидной последовательности. Например, полинуклеотид РНК, кодирующий геном SVV или CVA, описанный в данном документе, может содержать полинуклеотидную последовательность, полученную из всего или части эталонного генома SVV или CVA (*например*, встречающегося в природе или модифицированного генома SVV или CVA). Полипептидная или полинуклеотидная последовательность, «полученная из» эталонной полипептидной или полинуклеотидной последовательности, также включает полипептидные и/или полинуклеотидные последовательности, которые содержат еще одну аминокислотную мутацию или мутацию нуклеиновой кислоты (*например*, замены, делеции и/или вставки) относительно эталонной полипептидной или полинуклеотидной последовательности.

[00174] «Комплементарный» относится к способности к спариванию посредством стэкинг-взаимодействия и специфической водородной связи между двумя последовательностями, содержащими природные или не встречающиеся в природе

(например, модифицированные, как описано выше) основания (нуклеотиды) или их аналоги. Например, если основание в одном положении нуклеиновой кислоты способно к водородному связыванию с основанием в соответствующем положении мишени, то основания считаются комплементарными друг другу в этом положении. Нуклеиновые кислоты могут содержать универсальные основания или инертные спейсеры с удаленными азотными основаниями, которые не обеспечивают положительного или отрицательного вклада в водородные связи. Спаривание оснований может включать в себя как каноническое спаривание оснований по Уотсону-Крику, так и спаривание оснований, отличное от спаривания по Уотсону-Крику (например, спаривание оснований по Воббл и спаривание оснований по Хугстину). Понятно, что для комплементарных пар оснований основания аденозинового типа (А) являются комплементарными основаниям тимидинового типа (Т) или основаниям урацилового типа (U), что основания цитозинового типа (С) являются комплементарными основаниям гуанозинового типа (G), и что универсальные основания, такие как 3-нитропиррол или 5-нитроиндол, могут гибридизоваться и считаться комплементарными любым А, С, U или Т. Nichols *et al.*, Nature, 1994;369:492-493 и Loakes *et al.*, Nucleic Acids Res., 1994;22:4039-4043. Инозин (I) также считается в данной области техники универсальной основой и считается комплементарным любому А, С, U или Т. См. Watkins and SantaLucia, Nucl. Acids Research, 2005; 33 (19): 6258-6267.

[00175] «Кассета экспрессии» или «экспрессионный конструкт» относится к полинуклеотидной последовательности, функционально связанной с промотором. Термин «функционально связанный» относится к взаимному расположению, в котором описываемые таким образом компоненты находятся во взаимосвязи, обеспечивающей их функционирование предполагаемым для них образом. Например, промотор является функционально соединенным с полинуклеотидной последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию полинуклеотидной последовательности.

[00176] Термин «субъект» включает животных, таких как, например, млекопитающие. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее представляет собой примата. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее представляет собой человека. В некоторых вариантах субъектами является домашний скот, такой как крупный рогатый скот, овцы, козы, коровы, свиньи и тому подобное; или одомашненные животные, такие как собаки и кошки. В некоторых вариантах осуществления (например, особенно в контексте исследований) субъектами являются грызуны (например, мыши, крысы, хомяки), кролики, приматы или свиньи, такие как инбредные свиньи и тому подобное. Термины «субъект» и «пациент» применяют в данном документе

взаимозаменяемо.

[00177] В контексте данного документа «введение» относится к введению агента или композиции субъекту или приведению в контакт композиции с клеткой и/или тканью.

[00178] Используемый в данном документе термин «лечение» означает доставку агента или композиции субъекту для воздействия на физиологический результат. В некоторых вариантах осуществления лечение относится к лечению заболевания у млекопитающего, *например*, у человека, включая (а) ингибирование заболевания, *т.е.* остановку развития заболевания или предотвращение прогрессирования заболевания; (b) облегчение заболевания, *т.е.* вызывание регрессии состояния заболевания; и (с) излечение заболевания.

[00179] Термин «эффективное количество» относится к количеству агента или композиции, требуемому для достижения определенного физиологического эффекта (*например*, количества, необходимого для увеличения, активации и/или усиления конкретного физиологического эффекта). Эффективное количество конкретного агента может быть представлено различными способами в зависимости от природы агента, *например*, масса/объем, количество клеток/объем, частиц/объем, (масса агента)/(масса субъекта), количество клеток/(масса субъекта) или частиц/(масса субъекта). Эффективное количество конкретного агента также может быть выражено в виде концентрации полумаксимального эффекта (EC₅₀), которая относится к концентрации агента, которая приводит к величине конкретного физиологического ответа, который находится на полпути между контрольным уровнем и максимальный уровень ответа.

[00180] Термин «популяция» клеток относится к любому количеству клеток, превышающему 1, но предпочтительно по меньшей мере 1×10^3 клеток, по меньшей мере 1×10^4 клеток, по меньшей мере 1×10^5 клеток, по меньшей мере 1×10^6 клеток, по меньшей мере 1×10^7 клеток, по меньшей мере 1×10^8 клеток, по меньшей мере 1×10^9 клеток, по меньшей мере 1×10^{10} клеток или более клеток. Популяция клеток может относиться к популяции *in vitro* (*например*, популяции клеток в культуре) или к популяции *in vivo* (*например*, популяции клеток, находящихся в определенной ткани).

[00181] Термин «эффекторная функция» относится к функциям иммунной клетки, связанным с вызовом, поддержанием и/или усилением иммунного ответа против клетки-мишени или антигена-мишени.

[00182] Термины «микроРНК», «miРНК» и «miR» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к небольшим некодирующим эндогенным РНК длиной около 21–25 нуклеотидов, которые регулируют экспрессию генов, направляя свои

нацеленные матричные РНК (мРНК) для деградации или поступательной репрессии.

[00183] Используемый в данном документе термин «композиция» относится к составу молекулы рекомбинантной РНК или инкапсулированной в частицу молекулы рекомбинантной РНК, описанному в данном документе, который может быть введен или доставлен субъекту или в клетку.

[00184] Фраза «фармацевтически приемлемый» используется в данном документе для обозначения тех соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые, в рамках обоснованного медицинского заключения, подходят для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соизмеримых с разумным соотношением польза/риск.

[00185] Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент» включает в себя, без ограничения, любой адъювант, носитель, эксципиент, глидант, подсластитель, разбавитель, консервант, краситель/пигмент, усилитель вкуса, поверхностно-активное вещество, смачивающий агент, диспергирующий агент, суспендирующий агент, стабилизатор, изотонический агент, растворитель, поверхностно-активное вещество и/или эмульгатор, который был одобрен Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США как приемлемый для использования для людей и/или домашних животных.

[00186] Термин «репликационно-компетентный вирусный геном» относится к вирусному геному, кодирующему все вирусные гены, необходимые для вирусной репликации и продуцирования инфекционной вирусной частицы.

[00187] Термин «онколитический вирус» относится к вирусу, который был модифицирован для преимущественного инфицирования раковых клеток или естественным образом преимущественно инфицировал раковые клетки.

[00188] Термин «вектор» используется в данном документе для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной переносить, кодировать или транспортировать другую молекулу нуклеиновой кислоты.

[00189] Термины «соответствующий» или «соответствует», используемые в данном документе по отношению к положению(ям) аминокислоты или нуклеиновой кислоты, относятся к положению(ям) в первой полипептидной/полинуклеотидной последовательности, которое выравнивается с данной аминокислотой/нуклеиновой кислотой в эталонной полипептидной/полинуклеотидной последовательности, когда первая и эталонная полипептидные/полинуклеотидные последовательности выровнены. Выравнивание выполняет специалист в данной области техники с использованием

программного обеспечения, разработанного для этой цели, например, Clustal Omega версии 1.2.4 с параметрами по умолчанию для этой версии.

[00190] Термин «эффективность инкапсуляции» или «% ЭИ» относится к проценту молекулы-мишени (например, синтетического РНК-вирусного генома), которая успешно захватывается в ЛНЧ. Эффективность инкапсуляции можно рассчитать по формуле:

$$(\% \text{ ЭИ}) = (W_t/W_i) \times 100 \%$$

где W_t — общее количество лекарственного средства в суспензии ЛНЧ, а W_i — общее количество лекарственного средства, добавленное изначально во время приготовления. В качестве иллюстративного примера: если 97 мг молекулы-мишени захватываются в ЛНЧ из общего количества 100 мг молекулы-мишени, первоначально введенной в композицию, эффективность инкапсуляции может быть равна 97%.

[00191] Термин «соотношение липид-азот-фосфат» или «(N:P)» относится к соотношению положительно заряженных липидных аминогрупп к фосфатным группам нуклеиновой кислоты в липидной наночастице.

[00192] Термин «период полувыведения» относится к фармакокинетическому свойству молекулы (например, молекулы, инкапсулированной в липидную наночастицу). Период полувыведения может быть выражен как время, необходимое для выведения посредством биологических процессов (например, метаболизма, экскреции, ускоренного клиренса из крови и т.д.) пятидесяти процентов (50%) известного количества молекулы *in vivo*, после ее введения, из организма субъекта (например, пациента-человека или другого млекопитающего) или из его конкретного компартмента, например, при измерении в сыворотке, т.е. период полувыведения из кровотока или из других тканей. Как правило, увеличение периода полувыведения приводит к увеличению среднего времени удержания (MRT) в кровотоке для введенной молекулы.

[00193] Термин «ускоренное выведение из крови» или «ABC» относится к явлению, при котором определенные фармацевтические агенты (например, ПЭГ-содержащие ЛНЧ) быстро выводятся из крови при втором и последующих введениях. ABC наблюдали для многих средств доставки липидов, включая липосомы и ЛНЧ.

[00194] Используемый в данном документе термин «соотношение» при использовании в отношении состава липидов (например, в процентах от общего содержания липидов) относится к молярному соотношению, если явно не указано иное. Молярное соотношение в процентах от общего содержания липидов также может быть представлено как «мол.%». Например, «49:22:28,5:0,5 мол.%» означает молярное

соотношение 49:22:28,5:0,5.

[00195] Термин «алифатический» или «алифатическая группа», используемый в данном документе, означает прямую (т.е. неразветвленную) или разветвленную, замещенную или незамещенную углеводородную цепь, которая полностью насыщена или содержит одну или несколько единиц ненасыщенности, или моноциклическую углеводород или бициклический углеводород, который является полностью насыщенным или содержит одну или несколько единиц ненасыщенности, но не является ароматическим (также называемый в данном документе «карбоциклом», «циклоалифатическим» или «циклоалкилом»), который имеет одну точку присоединения к остальной части молекулы. Если не указано иное, алифатические группы содержат 1-6 алифатических атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления алифатические группы содержат 1-5 алифатических атомов углерода. В других вариантах осуществления алифатические группы содержат 1-4 алифатических атомов углерода. В других вариантах осуществления алифатические группы содержат 1-3 алифатических атомов углерода, а в других вариантах алифатические группы содержат 1-2 алифатических атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления «циклоалифатический» (или «карбоцикл» или «циклоалкил») относится к моноциклическому углеводороду C_3 - C_6 , который является полностью насыщенным или содержит одну или более единиц ненасыщенности, но не является ароматическим, который имеет единственную точку присоединения к остальной части молекулы. Подходящие алифатические группы включают, но не ограничиваются ими, линейные или разветвленные, замещенные или незамещенные алкильные, алкенильные, алкинильные группы и их гибриды, такие как (циклоалкил)алкил, (циклоалкенил)алкил или (циклоалкил)алкенил.

[00196] В контексте данного документа термин «алкил» представляет собой разветвленную или неразветвленную насыщенную углеводородную группу, имеющую определенное число атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления алкил относится к разветвленной или неразветвленной насыщенной углеводородной группе, имеющей три атома углерода (C_3). В некоторых вариантах осуществления алкил относится к разветвленной или неразветвленной насыщенной углеводородной группе, имеющей шесть атомов углерода (C_6). В некоторых вариантах осуществления термин «алкил» включает, но не ограничивается ими, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, н-пентил, изопентил, втор-пентил, неопентил и гексил.

[00197] В контексте данного документа термин «алкилен» относится к двухвалентной алкильной группе. «Алкиленовая цепь» представляет собой полиметиленовую группу, т.е. $-(CH_2)_n-$, где n равен положительному целому числу,

предпочтительно от 1 до 6, от 1 до 4, от 1 до 3, от 1 до 2 или от 2 до 3. Замещенная алкиленовая цепь представляет собой полиметиленовую группу, в которой один или более метиленовых атомов водорода заменены заместителем. Подходящие заместители включают описанные ниже для замещенной алифатической группы.

[00198] В контексте данного документа термин «арил», используемый отдельно или как часть большего фрагмента, такого как «аралкил», «аралкокси» или «арилоксиалкил», относится к моноциклическим и бициклическим кольцевым системам, имеющим в общей сложности от пяти до четырнадцати членов в кольце, где по меньшей мере одно кольцо в системе является ароматическим, и при этом каждое кольцо в системе содержит от трех до семи членов кольца. Термин «арил» может использоваться взаимозаменяемо с термином «арильное кольцо». В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения «арил» относится к ароматической кольцевой системе, которая включает, но не ограничивается ими, фенил, бифенил, нафтил, антрацил и т.п., которые могут иметь один или несколько заместителей. В контексте данного документа в объем термина «арил», также входит группа, в которой ароматическое кольцо конденсировано с одним или более неароматическими кольцами, такая как инданил, фталимидил, нафтимидил, фенантридинил или тетрагидронафтил, и тому подобное.

[00199] Термины «гетероарил» и «гетероар-», используемые отдельно или как часть большего фрагмента, например, «гетероаралкил» или «гетероаралкокси», относятся к группам, имеющим от 5 до 10 атомов в кольце, предпочтительно 5, 6 или 9 атомов в кольце; имеющие 6, 10 или 14 π -электронов в циклической системе; и имеющие, помимо атомов углерода, от одного до пяти гетероатомов. Термин «гетероатом» относится к азоту, кислороду или сере и включает любую окисленную форму азота или серы и любую кватернизованную форму основного азота. Гетероарильные группы включают, без ограничения, тиенил, фуранил, пирролил, имидазолил, пиразолил, триазолил, тетразолил, оксазолил, изоксазолил, оксадиазолил, тиазолил, изотиазолил, тиадиазолил, пиридил, пиридазинил, пиримидинил, пиразинил, индолизинил, пуринил, нафтиридинил и птеридинил. В контексте данного документа термины «гетероарил» и «гетероар-» также включают группы, в которых гетероароматическое кольцо конденсировано с одним или более арильными, циклоалифатическими или гетероциклическими кольцами, при этом радикал или точка присоединения находится на гетероароматическом кольце. Неограничивающие примеры включают индолил, изоиндолил, бензотиенил, бензофуранил, дибензофуранил, индазолил, бензимидазолил, бензтиазазол, хинолил, изохинолил, циннолинил, фталазинил, хиназолинил, хиноксалинил, 4Н-хинолизинил, карбазолил, акридинил, феназинил, фенотиазинил,

феноксазинил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил и пиридо[2,3-b]-1,4-оксазин-3(4H)-он. Гетероарильная группа может быть моно- или бициклической. Термин «гетероарил» может применяться взаимозаменяемо с терминами «гетероарильное кольцо», «гетероарильная группа» или «гетероароматическая группа», любой из которых включает кольца, которые являются необязательно замещенными. Термин «гетероаралкил» относится к алкильной группе, замещенной гетероарильной, при этом алкильная и гетероарильная части независимо являются необязательно замещенными.

[00200] Термин «галогеналифатический» относится к алифатической группе, которая замещена одним или более атомами галогена.

[00201] Термин «галогеналкил» относится к алкильной группе с прямой или разветвленной цепью, которая замещена одним или более атомами галогена.

[00202] Термин «галоген» означает F, Cl, Br или I.

[00203] В контексте данного документа термин «гетероцикл», «гетероциклил», «гетероциклический радикал» и «гетероциклическое кольцо» используются взаимозаменяемо и относятся к стабильному 5-7-членному моноциклическому или 7-10-членному бициклическому гетероциклическому фрагменту, который представляет собой либо насыщенный, либо частично ненасыщенный, и содержащий, помимо атомов углерода, один или более, предпочтительно от одного до четырех, гетероатомов, как определено выше. Когда термин «азот» используется в отношении кольцевого атома гетероцикла, он включает замещенный азот. Например, в насыщенном или частично ненасыщенном кольце, содержащем 0-3 гетероатома, выбранных из кислорода, серы или азота, азот может быть N (как в 3,4-дигидро-2H-пирролиле), NH (как в пирролидиниле), или ⁺NR (как в TV-замещенном пирролидиниле). Гетероциклическое кольцо может быть присоединено к своей подвесной группе у любого гетероатома или атома углерода, что приводит к образованию стабильной структуры, и любой из атомов кольца может быть необязательно замещен. Примеры таких насыщенных или частично ненасыщенных гетероциклических радикалов включают, без ограничения, тетрагидрофуранил, тетрагидротиофенил пирролидинил, пиперидинил, пирролинил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, декагидрохинолинил, оксазолидинил, пиперазинил, диоксанил, диоксоланил, diaзепинил, оксазепинил, тиазепинил, морфолинил и хинуклидинил. В контексте данного документа термины «гетероцикл», «гетероциклил», «гетероциклильное кольцо», «гетероциклическая группа», «гетероциклический фрагмент» и «гетероциклический радикал» применяются взаимозаменяемо и также включают группы, в которых гетероциклильное кольцо конденсировано с одним или более арильных, гетероарильных или циклоалифатических

колец, таких как индолинил, 3Н-индолил, хроманил, фенантридинил или тетрагидрохинолинил, где радикал или точка присоединения находится на гетероциклическом кольце. Гетероциклическая группа может быть моно- или бициклической. Термин «гетероциклилалкил» относится к алкильной группе, замещенной гетероциклилом, при этом алкильная и гетероциклическая части независимо являются необязательно замещенными.

[00204] Гетероциклическое кольцо может быть присоединено к своей подвесной группе у любого гетероатома или атома углерода, что приводит к образованию стабильной структуры, и любой из атомов кольца может быть необязательно замещен. Примеры таких насыщенных или частично ненасыщенных гетероциклических радикалов включают, без ограничения, тетрагидрофуранил, тетрагидротифенил, пирролидинил, пиперидинил, пирролинил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, декагидрохинолинил, оксазолидинил, пиперазинил, диоксанил, диоксоланил, diazepinyl, оксазепинил, тиазепинил, морфолинил и хинуклидинил. В контексте данного документа термины «гетероцикл», «гетероциклил», «гетероциклическое кольцо», «гетероциклическая группа», «гетероциклический фрагмент» и «гетероциклический радикал» применяются взаимозаменяемо и также включают группы, в которых гетероциклическое кольцо конденсировано с одним или более арильными, гетероарильными или циклоалифатическими кольцами, таких как индолинил, 3Н-индолил, хроманил, фенантридинил или тетрагидрохинолинил, где радикал или точка присоединения находится на гетероциклическом кольце. Гетероциклическая группа может быть моно- или бициклической. Термин «гетероциклилалкил» относится к алкильной группе, замещенной гетероциклилом, при этом алкильная и гетероциклическая части независимо являются необязательно замещенными.

[00205] В соответствии с описанием в данном документе, соединения по данному изобретению могут содержать «необязательно замещенные» фрагменты. В общем случае, термин «замещенный», независимо от того, предшествует ли ему термин «необязательно» или нет, означает, что один или более атомов водорода в обозначенном фрагменте замещены подходящим заместителем. Если не указано иное, «необязательно замещенная» группа может иметь подходящий заместитель в каждом замещаемом положении группы, а когда существует возможность замещения более одного положения в любой данной структуре более чем одним заместителем, выбранным из указанной группы, заместители могут быть одинаковыми или разными в каждом положении. Комбинации заместителей, предусмотренных в данном изобретении, предпочтительно представляют собой соединения, которые приводят к образованию стабильных или

химически возможных соединений. В контексте данного документа термин «стабильный» относится к соединениям, которые по существу не изменяются при воздействии условий, обеспечивающих их получение, выявление и, в определенных вариантах осуществления, их выделение, очистку и применение для одной или более целей, описанных в данном документе.

[00206] Подходящие одновалентные заместители у замещаемого атома углерода «необязательно замещенной» группы независимо представляют собой галоген;— $(\text{CH}_2)_{0-4}\text{R}^\circ$; — $(\text{CH}_2)_{0-4}\text{OR}^\circ$; — $\text{O}(\text{CH}_2)_{0-4}\text{R}^\circ$, — $\text{O}—(\text{CH}_2)_{0-4}\text{C}(\text{O})\text{OR}^\circ$; — $(\text{CH}_2)_{0-4}\text{CH}(\text{OR}^\circ)_2$; — $(\text{CH}_2)_{0-4}\text{SR}^\circ$; — $(\text{CH}_2)_{0-4}\text{Ph}$, который может быть замещен R° ; — $(\text{CH}_2)_{0-4}\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}\text{Ph}$, который может быть замещен R° ; — $\text{CH}=\text{CHPh}$, который может быть замещен R° ; — $(\text{CH}_2)_{0-4}\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}$ -пиридилом, который может быть замещен R° ; — NO_2 ; — CN ; — N_3 ; — $(\text{CH}_2)_{0-4}\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; — $(\text{CH}_2)_{0-4}\text{N}(\text{R}^\circ)\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$; — $\text{N}(\text{R}^\circ)\text{C}(\text{S})\text{R}^\circ$; — $(\text{CH}_2)_{0-4}\text{N}(\text{R}^\circ)\text{C}(\text{O})\text{NR}^\circ_2$; — $\text{N}(\text{R}^\circ)\text{C}(\text{S})\text{NR}^\circ_2$; — $(\text{CH}_2)_{0-4}\text{N}(\text{R}^\circ)\text{C}(\text{O})\text{OR}^\circ$; — $\text{N}(\text{R}^\circ)\text{N}(\text{R}^\circ)\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$; — $\text{N}(\text{R}^\circ)\text{N}(\text{R}^\circ)\text{C}(\text{O})\text{NR}^\circ_2$; — $\text{N}(\text{R}^\circ)\text{N}(\text{R}^\circ)\text{C}(\text{O})\text{OR}^\circ$; — $(\text{CH}_2)_{0-4}\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$; — $\text{C}(\text{S})\text{R}^\circ$; — $(\text{CH}_2)_{0-4}\text{C}(\text{O})\text{OR}^\circ$; — $(\text{CH}_2)_{0-4}\text{C}(\text{O})\text{SR}^\circ$; — $(\text{CH}_2)_{0-4}\text{C}(\text{O})\text{OSiR}^\circ_3$; — $(\text{CH}_2)_{0-4}\text{OC}(\text{O})\text{R}^\circ$; — $\text{OC}(\text{O})(\text{CH}_2)_{0-4}\text{SR}^\circ$, $\text{SC}(\text{S})\text{SR}^\circ$; — $(\text{CH}_2)_{0-4}\text{SC}(\text{O})\text{R}^\circ$; — $(\text{CH}_2)_{0-4}\text{C}(\text{O})\text{NR}^\circ_2$; — $\text{C}(\text{S})\text{NR}^\circ_2$; — $\text{C}(\text{S})\text{SR}^\circ$; — $\text{SC}(\text{S})\text{SR}^\circ$, — $(\text{CH}_2)_{0-4}\text{OC}(\text{O})\text{NR}^\circ_2$; — $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{OR}^\circ)\text{R}^\circ$; — $\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$; — $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$; — $\text{C}(\text{NOR}^\circ)\text{R}^\circ$; — $(\text{CH}_2)_{0-4}\text{SSR}^\circ$; — $(\text{CH}_2)_{0-4}\text{S}(\text{O})_2\text{R}^\circ$; — $(\text{CH}_2)_{0-4}\text{S}(\text{O})_2\text{OR}^\circ$; — $(\text{CH}_2)_{0-4}\text{OS}(\text{O})_2\text{R}^\circ$; — $\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^\circ_2$; — $(\text{CH}_2)_{0-4}\text{S}(\text{O})\text{R}^\circ$; — $\text{N}(\text{R}^\circ)\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^\circ_2$; — $\text{N}(\text{R}^\circ)\text{S}(\text{O})_2\text{R}^\circ$; — $\text{N}(\text{OR}^\circ)\text{R}^\circ$; — $\text{C}(\text{NH})\text{NR}^\circ_2$; — $\text{P}(\text{O})_2\text{R}^\circ$; — $\text{P}(\text{O})\text{R}^\circ_2$; — $\text{OP}(\text{O})\text{R}^\circ_2$; — $\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^\circ)_2$; SiR°_3 ; — $(\text{C}_{1-4}$ линейный или разветвленный алкилен) $\text{O}—\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; или — $(\text{C}_{1-4}$ линейный или разветвленный алкилен) $\text{C}(\text{O})\text{O}—\text{N}(\text{R}^\circ)_2$, где каждый R° может быть замещен, как определено ниже, и независимо представляет собой водород, C_{1-6} алифатическую группу, $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}\text{Ph}$, $-\text{CH}_2$ -(5-6-членное гетероарильное кольцо) или 5-6-членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное кольцо, содержащее 0-4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы, или, несмотря на приведенное выше определение, два независимых варианта R° , взятые вместе с промежуточным атомом (атомами), образуют 3-12-членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное моно- или бициклическое кольцо, содержащее 0-4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы, которые могут быть замещены, как определено ниже.

[00207] Подходящие одновалентные заместители при R° (или кольцо, образованном двумя независимыми вариантами R° вместе с промежуточными атомами) независимо друг от друга представляют собой галоген, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{R}^\bullet$, $-(\text{haloR}^\bullet)$, $-(\text{CH}_2)_{0-}$

2OH , $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{OR}^\bullet$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{CH}(\text{OR}^\bullet)_2$; $-\text{O}(\text{галогенR}^\bullet)$, $-\text{CN}$, $-\text{N}_3$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{C}(\text{O})\text{R}^\bullet$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{C}(\text{O})\text{OR}^\bullet$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{SR}^\bullet$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{SH}$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{NHR}^\bullet$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{NR}^\bullet_2$, $-\text{NO}_2$, $-\text{SiR}^\bullet_3$, $-\text{OSiR}^\bullet_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{SR}^\bullet$, $-(\text{C}_{1-4}$ линейный или разветвленный алкилен) $\text{C}(\text{O})\text{OR}^\bullet$, или $-\text{SSR}^\bullet$, где каждый $\text{R}^\bullet$ незамещен или, если ему предшествует «галоген», замещен только одним или более галогенами и независимо выбран из C_{1-4} алифатической группы, $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}\text{Ph}$ или 5-6-членного насыщенного, частично ненасыщенного или арильного кольца, содержащего 0-4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы. Подходящие двухвалентные заместители при насыщенном атоме углерода $\text{R}^\bullet$ включают $=\text{O}$ и $=\text{S}$.

[00208] Подходящие двухвалентные заместители при насыщенном атоме углерода «необязательно замещенной» группы включают следующие: $=\text{O}$, $=\text{S}$, $=\text{NNR}^{*2}$, $=\text{NNHC}(\text{O})\text{R}^*$, $=\text{NNHC}(\text{O})\text{OR}^*$, $=\text{NNHS}(\text{O})_2\text{R}^*$, $=\text{NR}^*$, $=\text{NOR}^*$, $-\text{O}(\text{C}(\text{R}^{*2}))_{2-3}\text{O}-$ или $-\text{S}(\text{C}(\text{R}^{*2}))_{2-3}\text{S}-$, где каждый независимый вариант R^* выбран из водорода, C_{1-6} алифатической группы, которая может быть замещена, как определено ниже, или незамещенного 5-6-членного насыщенного, частично ненасыщенного или арильного кольца, содержащего 0-4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы. Подходящие двухвалентные заместители, которые связаны с вицинальными замещаемыми атомами углерода «необязательно замещенной» группы, включают: $-\text{O}(\text{CR}^{*2})_{2-3}\text{O}-$, где каждый независимый вариант R^* выбран из водорода, C_{1-6} алифатической группы, которая может быть замещенной, как определено ниже, или незамещенное 5-6-членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное кольцо, содержащее 0-4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы.

[00209] Подходящие заместители при алифатической группе R^* включают галоген, $-\text{R}^\bullet$, $-(\text{галогенR}^\bullet)$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}^\bullet$, $-\text{O}(\text{галогенR}^\bullet)$, $-\text{CN}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^\bullet$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}^\bullet$, $-\text{NR}^\bullet_2$, или $-\text{NO}_2$, где каждый $\text{R}^\bullet$ незамещен или, если ему предшествует «галоген», замещен только одним или более галогенами и независимо представляет собой C_{1-4} алифатическую группу, $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}\text{Ph}$ или 5-6-членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное кольцо, содержащее 0-4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы.

[00210] Подходящие заместители при замещаемом атоме азота «необязательно замещенной» группы включают $-\text{R}^\dagger$, $-\text{NR}^\dagger_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^\dagger$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^\dagger$, $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{R}^\dagger$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{R}^\dagger$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^\dagger$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^\dagger_2$, $-\text{C}(\text{S})\text{NR}^\dagger_2$, $-\text{C}(\text{NH})\text{NR}^\dagger_2$ или $-\text{N}(\text{R}^\dagger)\text{S}(\text{O})_2\text{R}^\dagger$; где каждый $\text{R}^\dagger$ независимо представляет собой водород, C_{1-6} алифатическую группу, которая может быть замещена как это определено ниже, незамещенный $-\text{OPh}$ или незамещенное 5-6-членное насыщенное, частично

ненасыщенное или арильное кольцо, содержащее 0-4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы, или, несмотря на вышеприведенное определение, два независимых варианта $R^{\dagger}$, вместе со своим(и) промежуточным(и) атомом(ами) образуют 3-12-членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное моно- или бициклическое кольцо, содержащее 0-4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы.

[00211] Подходящие заместители при алифатической группе $R^{\dagger}$ независимо представляют собой галоген, $-R^{\bullet}$, $-(\text{галоген}R^{\bullet})$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}^{\bullet}$, $-\text{O}(\text{галоген}R^{\bullet})$, $-\text{CN}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^{\bullet}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}^{\bullet}$, $-\text{NR}^{\bullet}_2$, или $-\text{NO}_2$, где каждый $R^{\bullet}$ незамещен или, если ему предшествует «галоген», замещен только одним или более галогенами и независимо представляет собой C_{1-4} алифатическую группу, $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}\text{Ph}$ или 5-6-членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное кольцо, содержащее 0-4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы.

[00212] В контексте данного документа термин «частично ненасыщенный» относится к кольцевому фрагменту, который включает по меньшей мере одну двойную или тройную связь. Термин «частично ненасыщенный» охватывает кольца, имеющие несколько участков ненасыщенности, но не предназначен для включения арильных или гетероарильных фрагментов, как определено в данном документе.

[00213] В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к тем солям, которые в рамках здравого медицинского заключения, подходят для использования в контакте с тканями человека и низших животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и т.п., и соизмеримы с разумным соотношением польза/риск. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области. Например, S.M.Berge et al. подробно описывают фармацевтически приемлемые соли в J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1- 19, включенной в данный документ посредством ссылки. Фармацевтически приемлемые соли соединений по настоящему изобретению включают соли, полученные из подходящих неорганических и органических кислот и оснований. Примерами фармацевтически приемлемых нетоксичных солей добавления кислот являются соли аминогрупп, образованные с неорганическими кислотами, такими как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и хлорная кислота, или с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, щавелевая кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота, или с помощью других методов, используемых в данной области техники, таких как ионный обмен. Другие фармацевтически приемлемые соли включают адипинат, альгинат,

аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, глюконат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, п-толуолсульфонат, ундеканоат, валератные соли и т.п.

[00214] Соли, полученные из соответствующих оснований, включают соли щелочных металлов, щелочноземельных металлов, аммония и $N(C_{1-4}\text{алкил})_4$. Типовые соли щелочных или щелочноземельных металлов включают соли натрия, лития, калия, кальция, магния и тому подобные. Дополнительные фармацевтически приемлемые соли включают, при необходимости, нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, образованные с использованием противоионов, таких как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, низший алкилсульфонат и арилсульфонат.

[00215] «Фармацевтически приемлемое производное» означает любую нетоксичную соль, сложный эфир, соль сложного эфира или другое производное соединения по настоящему изобретению, которое при введении реципиенту способно прямо или косвенно обеспечить соединение по настоящему изобретению или его активный метаболит или его остаток.

[00216] Термин «третичный амин» используется для описания амина (атома азота), который присоединен к трем углеродсодержащим группам, причем каждая из групп ковалентно связана с аминогруппой через атом углерода внутри группы. Третичный амин может быть протонирован или может образовывать комплекс с кислотой Льюиса.

[00217] Указание списка химических групп в любом определении переменной в данном документе включает определения этой переменной как любой отдельной группы или комбинации перечисленных групп. Перечисление варианта осуществления для переменной в данном документе включает этот вариант осуществления как любой отдельный вариант осуществления или в сочетании с любыми другими вариантами осуществления или их частями.

Если не указано иное, структуры, изображенные в данном документе, также включают все энантиомерные, диастереомерные и геометрические (или конформационные) формы структуры; например, конфигурации R и S для каждого асимметричного центра, изомеры двойной связи Z и E и конформационные изомеры Z и

Е. Следовательно, отдельные стереохимические изомеры, а также энантиомерные, диастереомерные и геометрические (или конформационные) смеси соединений по настоящему изобретению входят в объем настоящего изобретения. Если не указано иное, все таутомерные формы соединений по настоящему изобретению входят в объем настоящего изобретения.

[00218] Общие методы молекулярной и клеточной биохимии можно найти в таких стандартных руководствах как *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed. (Sambrook *et al.*, HaRBor Laboratory Press 2001); *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th Ed. (Ausubel *et al.* eds., John Wiley & Sons 1999); *Protein Methods* (Bollag *et al.*, John Wiley & Sons 1996); *Nonviral Vectors for Gene Therapy* (Wagner *et al.* eds., Academic Press 1999); *Viral Vectors* (Kaplift & Loewy eds., Academic Press 1995); *Immunology Methods Manual* (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997); и *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology* (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998), раскрытия которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

Синтетические РНК-вирусные геномы

[00219] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложена молекула рекомбинантной РНК, кодирующая онколитический вирус (*например*, РНК-геном). Такие молекулы рекомбинантной РНК упоминаются в данном документе как «синтетические вирусные геномы» или «синтетические РНК-вирусные геномы». В таких вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном способен продуцировать инфекционный литический вирус при введении в клетку с помощью невирусного средства доставки и не требует присутствия в клетке дополнительных экзогенных генов или белков для репликации и продуцирования инфекционного вируса. Скорее, эндогенные механизмы трансляции в клетке-хозяине опосредуют экспрессию вирусных белков из синтетического РНК-вирусного генома. Экспрессированные вирусные белки затем опосредуют репликацию вируса и сборку в инфекционную вирусную частицу (которая может включать капсидный белок, белок оболочки и/или мембранный белок), содержащую РНК-вирусный геном. Таким образом, описанные в данном документе полинуклеотиды РНК (*т.е.*, синтетические РНК-вирусные геномы) при введении в клетку-хозяина продуцируют вирус, способный инфицировать другую клетку-хозяина. В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус представляет собой пикорнавирус (см. схему на **Фиг. 9**). В некоторых вариантах осуществления пикорнавирус представляет собой CVA21. В некоторых вариантах осуществления пикорнавирус представляет собой SVV.

[00220] В некоторых вариантах осуществления синтетический вирусный

геном представлен в виде рекомбинантной рибонуклеиновой кислоты (РНК) (*т.е.* синтетического РНК-вирусного генома). В некоторых вариантах осуществления синтетические РНК-вирусные геномы содержат один или несколько аналогов нуклеиновой кислоты. Примеры аналогов нуклеиновых кислот включают 2'-О-метилзамещенную РНК, 2'-О-метоксиэтильные основания, 2'-фторсодержащие основания, заблокированные нуклеиновые кислоты (LNA; англ.: locked nucleic acid), незаблокированные нуклеиновые кислоты (UNA; англ.: unlocked nucleic acid), соединённый мостиковой связью нуклеиновые кислоты (BNA; англ.: bridged nucleic acid), морфолиновые олигонуклеотиды и пептидно-нуклеиновые кислоты (PNA; англ.: peptide nucleic acid). В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном представляет собой репликон, РНК-вирусный геном, кодирующий трансген, молекулу мРНК или молекулу кольцевой РНК (кольцРНК). В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном содержит вирусный геном с одноцепочечной РНК (оцРНК). В некоторых вариантах осуществления одноцепочечный геном может быть положительно-полярным или отрицательно-полярным геномом.

[00221] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная молекула РНК представляет собой молекулу кольцевой РНК (кольцРНК). У молекул кольцРНК отсутствуют свободные концы, необходимые для опосредованной экзонуклеазой деградации, что продлевает период полувыведения молекулы РНК и обеспечивает более стабильное производство белка с течением времени (*см., например, Wesselhoeft et al., Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells. Nature Communications. (2018) 9:2629.*). Чтобы получить функциональный РНК-вирус из молекулы кольцРНК, необходимо «разорвать» кольцевую конструкцию внутри клетки, чтобы можно было получить линейный геном РНК с соответствующими 3'- и 5'-нативными концами. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной РНК, кодирующая онколитический вирус, представлена в виде молекулы кольцРНК и дополнительно содержит одну или несколько дополнительных последовательностей РНК, которые способствуют линейаризации молекулы кольцРНК внутри клетки. Примеры таких дополнительных последовательностей РНК включают сайты-мишени миРНК, сайты-мишени микроРНК и сайты-мишени направляющей РНК. Соответствующая миРНК, микроРНК или нРНК может быть составлена совместно с молекулой кольцРНК. Альтернативно, сайт-мишень микроРНК может быть выбран на основе экспрессии когнатной микроРНК в клетке-мишени, так что расщепление молекулы кольцРНК и начальная экспрессия кодируемого онколитического вируса ограничиваются клетками-мишенями, экспрессирующими конкретную микроРНК.

[00222] Описанные в данном документе синтетические РНК-вирусные геномы кодируют онколитический вирус. В данной области техники известны примеры онколитических вирусов, включая, но не ограничиваясь ими, пикорнавирус (*например*, вирус Коксаки), полиовирус, вирус кори, вирус везикулярного стоматита, ортомиксовирус и вирус мараба. В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус, кодируемый синтетическим РНК-вирусным геномом, представляет собой вирус семейства Picornaviridae, такой как вирус Коксаки, полиовирус (включая химерный полиовирус, такой как PVS-RIPO и другие химерные пикорнавирусы) или вирус долины Сенека или любой вирус химерного происхождения из любого множества пикорнавирусов, вирус семейства Arenaviridae, такой как вирус Ласса, вирус семейства Retroviridae, такой как вирус мышинного лейкоза, вирус семейства Orthomyxoviridae, такой как вирус гриппа А, вирус семейства Paramyxoviridae, такой как вирус болезни Ньюкасла или вирус кори, вирус семейства Reoviridae, такой как ортореовирус млекопитающих, вирус семейства Togaviridae, такой как вирус Синдбис, или вирус семейства Rhabdoviridae, такой как вирус везикулярного стоматита. (VSV) или вирус мараба.

Вирусы с положительно-полярной одноцепочечной РНК

[00223] В некоторых вариантах осуществления синтетические РНК-вирусные геномы, описанные в данном документе, кодируют вирусный геном с одноцепочечной РНК (оцРНК). В некоторых вариантах осуществления вирус с оцРНК представляет собой вирус с положительно-полярной оцРНК (+ полярная оцРНК). Примерные вирусы с + полярной оцРНК включают представителей семейства Picornaviridae (*например* вирус Коксаки, полиовирус и вирус долины Сенека (SVV), включая SVV-A), семейства Coronaviridae (*например*, альфакоронавирусы, такие как HCoV-229E и HCoV-NL63, бетакоронавирусы, такие как HCoV-NKU1, HCoV-OC3 и MERS-CoV), семейства Retroviridae (*например*, вирус мышинного лейкоза) и семейства Togaviridae (*например*, альфавирусы, такие как вирус леса Семлики, вирус Синдбис, вирус Росс-Ривер или вирус Чикунгунья). Дополнительные иллюстративные роды и виды вирусов с положительно-полярной оцРНК показаны ниже в Таблице 1.

Таблица 1: Вирусы с положительно-полярной оцРНК

<u>Семейство/подсемейство</u>	<u>Род</u>	<u>Естественный хозяин</u>	<u>Вид</u>
Picornaviridae	Кардиовирус	Человек	
	Козавирус	Человек	
	Энтеровирус	Человек	Вирус Коксаки
		Человек	Полиовирус
	Гепатовирус	Человек	
	Кобувирус	Человек	
	Пареховирус	Человек	

<u>Семейство/подсемейство</u>	<u>Род</u>	<u>Естественный хозяин</u>	<u>Вид</u>
	Розавирус	Человек	
	Саливирус	Человек	
	Пассивирус	Свиньи	
	Вирус Сенека	Свиньи	Вирус долины Сенека А
Caliciviridae	Саповирус	Человек	
	Норовирус	Человек	
	Небовирус	Крупный рогатый скот	
	Везивирус	Кошачьи/Свиньи	
Herpesviridae	Ортогепевирус		
Astroviridae	Мамастровирус	Человек	
	Авастровирус	Птицы	
Flaviviridae	Гепацивирус	Человек	
	Флавивирус	Членистоногие	
	Пегивирус		
	Пестивирус	Млекопитающие	
Coronaviridae/Coronavirinae	Альфакоронавирус		НCoV-229E
			НCoV-NL63
	Бетакоронавирус		НCoV-HKU1
			НCoV-OC3
			MERS-CoV
	Дельтакоронавирус		
Coronaviridae/Torovirinae	Гаммакоронавирус		
	Бафинивирус		
	Торовирус		
Retroviridae	Гаммаретровирус		Вирус мышинного лейкоза
Togaviridae	Альфавирус		Вирус Синдбиса Вирус леса Семлики Вирус Росс-Ривер Вирус Чикунгунья Вирус венесуэльского лошадиного энцефалита

[00224] В некоторых вариантах осуществления молекулы рекомбинантной РНК, описанные в данном документе, кодируют пикорнавирус, выбранный из вируса Коксаки, полиовируса и вируса долины Сенека (SVV). В некоторых вариантах осуществления молекулы рекомбинантной РНК, описанные в данном документе, кодируют вирус Коксаки. В некоторых аспектах этого варианта осуществления молекулы рекомбинантной РНК вируса Коксаки содержат последовательность 5'-UTR SEQ ID NO: 2 (См., например, Brown *et al.*, Complete Genomic Sequencing Shows that Polioviruses and Members of Human Enterovirus Species C Are Closely Related in the Noncapsid Coding Region. Journal of Virology, (2003)77:16, p. 8973–8984. Номер доступа Genbank № AF546702). В таких вариантах осуществления последовательность 5'-UTR SEQ ID NO: 2

неожиданно увеличивает продукцию функционального вируса Коксаки по сравнению с другими ранее описанными последовательностями 5'-UTR (См., например, Newcombe *et al.*, Cellular receptor interactions of C-cluster human group A coxsackieviruses Journal of General Virology (2003), 84, 3041–3050. Номер доступа Genbank № AF465515). В некоторых аспектах этого варианта осуществления молекулы рекомбинантной РНК кодируют вирус Коксаки и содержат последовательность SEQ ID NO: 1.

[00225] В некоторых вариантах осуществления синтетические РНК-вирусные геномы, описанные в настоящем документе, кодируют вирус Коксаки. В некоторых вариантах осуществления вирус Коксаки выбран из CVB3, CVA21 и CVA9. Последовательности нуклеиновых кислот типичных вирусов Коксаки представлены по номеру эталонной последовательности GenBank № M33854.1 (CVB3), номеру эталонной последовательности GenBank № KT161266.1 (CVA21) и номеру эталонной последовательности GenBank № D00627.1 (CVA9). В некоторых вариантах осуществления синтетические РНК-вирусные геномы, описанные в данном документе, кодируют модифицированный вирус CVA21, содержащий SEQ ID NO: 1, который представляет собой штамм Kuykendall (Kuyk). В некоторых вариантах осуществления последовательность вирусного генома штамма Kuykendall соответствует номеру доступа GenBank № AF465515.1 или № AF546702.1. В некоторых вариантах осуществления синтетические РНК-вирусные геномы, описанные в данном документе, кодируют химерный вирус Коксаки. В некоторых вариантах осуществления синтетические РНК-вирусные геномы, описанные в данном документе, кодируют штамм CVA21, выбранный из штамма CVA21-EF и штамма CVA21-KY. В некоторых вариантах осуществления синтетические РНК-вирусные геномы, описанные в данном документе, кодируют штамм CVA21-EF. Типичная последовательность вирусного генома штамма EF соответствует номеру доступа GenBank № EF015029.1. В некоторых вариантах осуществления синтетические РНК-вирусные геномы, описанные в данном документе, кодируют штамм CVA21-KY. Типичная последовательность вирусного генома штамма KY соответствует номеру доступа GenBank № KY284011.1. Как показано на Фиг. 11-26, штаммы EF и KY обеспечивают терапевтические преимущества по сравнению с лабораторным штаммом Kuykendall и ранее описанными композициями синтетического пикорнавируса.

[00226] Организация доменов трех штаммов CVA21 (EF, KY и Kuykendall) представлена на **Фиг. 32**, а идентичность последовательностей между различными областями этих трех штаммов представлена ниже в **Таблице 2**.

Таблица 2: Идентичность последовательностей соответствующих областей разных штаммов CVA21

Область	Штамм 1 (последовательность)	Штамм 2 (последовательность)	Идентичность последовательности
Цельный вирус	CVA21-KY (SEQ ID NO: 5)	CVA21-Kuykendall (SEQ ID NO: 1)	88,8%
	CVA21-EF (SEQ ID NO: 9)	CVA21-Kuykendall (SEQ ID NO: 1)	79,6%
	CVA21-EF (SEQ ID NO: 9)	CVA21-KY (SEQ ID NO: 5)	79,4%
5' UTR (IRES)	CVA21-KY (SEQ ID NO: 6)	CVA21-Kuykendall (SEQ ID NO: 2)	91,2%
	CVA21-EF (SEQ ID NO: 10)	CVA21-Kuykendall (SEQ ID NO: 2)	85,0%
	CVA21-EF (SEQ ID NO: 10)	CVA21-KY (SEQ ID NO: 6)	86,1%
P1	CVA21-KY (SEQ ID NO: 7)	CVA21-Kuykendall (SEQ ID NO: 3)	87,5%
	CVA21-EF (SEQ ID NO: 11)	CVA21-Kuykendall (SEQ ID NO: 3)	78,6%
	CVA21-EF (SEQ ID NO: 11)	CVA21-KY (SEQ ID NO: 7)	78,3%
3D	CVA21-KY (SEQ ID NO: 8)	CVA21-Kuykendall (SEQ ID NO: 4)	89,9%
	CVA21-EF (SEQ ID NO: 12)	CVA21-Kuykendall (SEQ ID NO: 4)	82,7%
	CVA21-EF (SEQ ID NO: 12)	CVA21-KY (SEQ ID NO: 8)	82,5%

[00227] Одна или несколько специфических областей вирусного генома штаммов CVA21 EF или KY могут способствовать положительному терапевтическому эффекту, наблюдаемому для штаммов EF и KY по сравнению с лабораторным штаммом Kuykendall. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько специфических областей выбраны из группы, состоящей из области 5'-UTR (IRES), области P1 и области 3D. Положения нуклеиновой кислоты каждой из этих конкретных областей для штаммов вируса, описанных в данном документе, являются следующими:

(a) Область 5'-UTR (IRES) CVA21-Kuykendall включает нуклеиновые кислоты 1-713 SEQ ID NO: 1. Область 5'-UTR (IRES) CVA21-KY включает нуклеиновые кислоты 1-713 SEQ ID NO: 5. Область 5'-UTR (IRES) CVA21-EF включает нуклеиновые кислоты 1-748 SEQ ID NO: 9.

(b) Область P1 CVA21-Kuykendall включает нуклеиновые кислоты 714-3350 SEQ ID NO: 1. Область P1 CVA21-KY включает нуклеиновые кислоты 714-3350 SEQ ID NO: 5. Область P1 CVA21-EF включает нуклеиновые кислоты 749-3385 SEQ ID NO: 9.

(c) Область 3D CVA21-Kuykendall включает нуклеиновые кислоты 5952-7340

SEQ ID NO: 1. Область область 3D CVA21-KY включает нуклеиновые кислоты 5952-7340

SEQ ID NO: 5. Область область 3D CVA21-EF включает нуклеиновые кислоты 5987-7375

SEQ ID NO: 9.

[00228] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, описанный в данном документе, кодирует штамм CVA21-KY. В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий штамм CVA21-KY, содержит полинуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий штамм CVA21-KY, содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную последовательности SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий штамм CVA21-KY, содержит полинуклеотидные последовательности, которые менее чем на 95%, менее чем на 90%, менее чем на 85% или менее чем на 80% идентичны (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) SEQ ID NO: 1.

[00229] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, описанный в данном документе, кодирует штамм CVA21-KY и содержит последовательность 5'-UTR (IRES) в соответствии с SEQ ID NO: 6 (соответствующую нуклеиновым кислотам 1-713 SEQ ID NO: 5). В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, описанный в данном документе, кодирует штамм CVA21-KY и содержит последовательность 5'-UTR (IRES), по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную последовательности SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий штамм CVA21-KY, содержит последовательность 5'-UTR (IRES), которая менее чем на 95%, менее чем на 90%, менее чем на 85% или менее чем на 80% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентична SEQ ID NO: 2.

[00230] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, описанный в данном документе, кодирует штамм CVA21-KY и содержит последовательность P1 в соответствии с SEQ ID NO: 7 (соответствующую нуклеиновым кислотам 714-3350 SEQ ID NO: 5). В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, описанный в данном документе, кодирует штамм CVA21-KY и содержит последовательность P1, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную последовательности SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий штамм CVA21-KY, содержит последовательность P1, которая менее чем на 95%, менее чем на 90%, менее чем на 85% или менее чем на 80% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентична SEQ ID NO: 3.

[00231] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, описанный в данном документе, кодирует штамм CVA21-KY и содержит последовательность 3D в соответствии с SEQ ID NO: 8 (соответствующую нуклеиновым кислотам 5952-7340 SEQ ID NO: 5). В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, описанный в данном документе, кодирует штамм CVA21-KY и содержит последовательность 3D, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную последовательности SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий штамм CVA21-KY, содержит последовательность 3D, которая менее чем на 95%, менее чем на 90%, менее чем на 85% или менее чем на 80% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентична SEQ ID NO: 4.

[00232] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, описанный в данном документе, кодирует штамм CVA21-EF. В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий штамм CVA21-EF, содержит полинуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный

геном, кодирующий штамм CVA21-EF, содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную последовательности SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий штамм CVA21-EF, содержит полинуклеотидные последовательности, которые менее чем на 95%, менее чем на 90%, менее чем на 85% или менее чем на 80% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичны SEQ ID NO: 1.

[00233] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, описанный в данном документе, кодирует штамм CVA21-EF и содержит последовательность 5'-UTR (IRES) в соответствии с SEQ ID NO: 10 (соответствующую нуклеиновым кислотам 1-748 SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, описанный в данном документе, кодирует штамм CVA21-EF и содержит последовательность 5'-UTR (IRES), по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную последовательности SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий штамм CVA21-EF, содержит последовательность 5'-UTR (IRES), которая менее чем на 95%, менее чем на 90%, менее чем на 85% или менее чем на 80% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентична SEQ ID NO: 2.

[00234] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, описанный в данном документе, кодирует штамм CVA21-EF и содержит последовательность P1 в соответствии с SEQ ID NO: 11 (соответствующую нуклеиновым кислотам 749-3385 SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, описанный в данном документе, кодирует штамм CVA21-EF и содержит последовательность P1, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на

96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную последовательности SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий штамм CVA21-EF, содержит последовательность P1, которая менее чем на 95%, менее чем на 90%, менее чем на 85% или менее чем на 80% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентична SEQ ID NO: 3.

[00235] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, описанный в данном документе, кодирует штамм CVA21-EF и содержит последовательность 3D в соответствии с SEQ ID NO: 12 (соответствующую нуклеиновым кислотам 5987-7375 SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, описанный в данном документе, кодирует штамм CVA21-EF и содержит последовательность 3D, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную последовательности SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий штамм CVA21-EF, содержит последовательность 3D, которая менее чем на 95%, менее чем на 90%, менее чем на 85% или менее чем на 80% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентична SEQ ID NO: 4.

[00236] В некоторых вариантах осуществления РНК-вирусный геном CVA21, описанный в данном документе, не содержит нуклеотидную последовательность CGUCUC (SEQ ID NO: 83) или GAGACG (SEQ ID NO: 84). Соответствующие комплементарные последовательности ДНК CGTCTC (SEQ ID NO: 85) и GAGACG (SEQ ID NO: 86) представляют собой сайты распознавания ферментом рестрикции BsmBI.

[00237] В некоторых вариантах осуществления РНК-вирусный геном CVA21, описанный в данном документе, не содержит нуклеотидную последовательность GGUCUC (SEQ ID NO: 87) или GAGACC (SEQ ID NO: 88). Соответствующие комплементарные последовательности ДНК GGTCTC (SEQ ID NO: 89) и GAGACC (SEQ ID NO: 90) представляют собой сайты распознавания ферментом рестрикции BsaI.

[00238] В некоторых вариантах осуществления синтетические РНК-вирусные

геномы, описанные в данном документе, кодируют вирус долины Сенека (SVV). В некоторых вариантах осуществления SVV выбран из SVV дикого типа (например, SVV-001, SEQ ID NO: 25) или мутантного SVV, или химерного SVV (например, SVV-001-S177A, кодируемого SEQ ID NO: 26; или SVV-IRES-2-S177A, кодируемого SEQ ID NO: 68 или SEQ ID NO: 73).

[00239] В некоторых вариантах осуществления SVV представляет собой мутант SVV-S177. В некоторых вариантах осуществления SVV представляет собой мутант SVV-S177A. При использовании в данном документе по отношению к вирусному геному SVV термин «мутант S177» относится к вирусному геному SVV, кодирующему белок VP2, содержащий мутацию в аминокислоте S177 белка дикого типа (нумерация аминокислот соответствует белку VP2, кодируемому SEQ ID NO: 25). Соответственно, термин «мутант S177A» относится к мутанту SVV, имеющему аминокислотную замену S177A белка VP2. В SEQ ID NO: 25 остаток S177 VP2 кодируется кодоном «UCU» в положении нуклеиновой кислоты 1645-1647. Соответственно, мутант SVV-S177 содержит мутацию нуклеиновой кислоты в области, соответствующей положению нуклеиновой кислоты 1645-1647 SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления мутант SVV-S177A содержит последовательность кодонов «GCU», «GCC», «GCA» или «GCG» в области, соответствующей положению нуклеиновой кислоты 1645-1647 SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления мутант SVV-S177A содержит последовательность кодона «GCG» в области, соответствующей положению нуклеиновой кислоты 1645-1647 SEQ ID NO: 25.

[00240] В некоторых вариантах осуществления РНК-вирусный геном SVV, описанный в данном документе, не содержит нуклеотидную последовательность GCUCUUC (SEQ ID NO: 79) или GAAGAGC (SEQ ID NO: 80). Соответствующие комплементарные последовательности ДНК GCTCTTC (SEQ ID NO: 81) и GAAGAGC (SEQ ID NO: 82) представляют собой сайты распознавания ферментом рестрикции SapI. В некоторых вариантах осуществления РНК-вирусный геном SVV дикого типа содержит SEQ ID NO: 79 в положении, соответствующем нуклеиновым кислотам 1504-1510 и/или нуклеиновым кислотам 5293-5299 SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления РНК-вирусный геном SVV по данному изобретению содержит по меньшей мере 1 нуклеотидную замену по сравнению с SEQ ID NO: 79 в области, соответствующей нуклеиновым кислотам 1504-1510 и/или нуклеиновым кислотам 5293-5299 SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 1 нуклеотидная замена представляет собой молчащую мутацию, которая не меняет аминокислоты, кодируемые соответствующим участком ДНК. В некоторых вариантах осуществления РНК-вирусный

геном SVV по данному изобретению содержит цитидин («С») в положении, соответствующем нуклеиновой кислоте 1509 и/или 5298 SEQ ID NO: 25.

[00241] В некоторых вариантах осуществления РНК-вирусный геном SVV, описанный в данном документе, не содержит нуклеотидную последовательность GGUCUC (SEQ ID NO: 87) или GAGACC (SEQ ID NO: 88). Соответствующие комплементарные последовательности ДНК GGTCTC (SEQ ID NO: 89) и GAGACC (SEQ ID NO: 90) представляют собой сайты распознавания ферментом рестрикции BsaI.

[00242] В некоторых вариантах осуществления синтетические РНК-вирусные геномы, описанные в данном документе, кодируют химерный пикорнавирус (например, кодируют вирус, содержащий одну часть, такую как капсидный белок или IRES, полученный из первого пикорнавируса, и другую часть, такую как неструктурный ген, такой как протеаза или полимеразы, полученный из второго пикорнавируса). В некоторых вариантах осуществления синтетические РНК-вирусные геномы, описанные в данном документе, кодируют химерный SVV.

[00243] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, описанный в данном документе, кодирует SVV, содержащий одну или несколько конкретных областей, полученных из штамма SVV, выбранного из группы, состоящей из SVV-001 (SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 72 (Genbank ID № DQ641257.1)), SVA/BRA/MG2/2015 (SEQ ID NO: 69; GenBank ID № KR063108.1), SVA/Canada/MB/NCFAD-104/2015 (SEQ ID NO: 70; GenBank ID № KY486156.1) и SVV-MN15-308 (SEQ ID NO: 71; GenBank ID № KU359214.1). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько специфических областей выбраны из группы, состоящей из области 5'-UTR (IRES), области P1 и области P3. Положения нуклеиновой кислоты каждой из этих конкретных областей для штаммов вируса, описанных в данном документе, являются следующими:

(a) Область 5'-UTR (IRES) SVV-001 включает нуклеиновые кислоты 1-668 SEQ ID NO: 25. Область 5'-UTR (IRES) SVA/BRA/MG2/2015 включает нуклеиновые кислоты 1-656 SEQ ID NO: 69. Область 5' UTR (IRES) SVA/Canada/MB/NCFAD-104/2015 включает нуклеиновые кислоты 1-612 SEQ ID NO: 70. Область 5'-UTR (IRES) SVV-MN15-308 включает нуклеиновые кислоты 1-610 SEQ ID NO: 71.

(b) Область P1 SVV-001 включает нуклеиновые кислоты 669-3477 SEQ ID NO: 25. Область P1 SVA/BRA/MG2/2015 включает нуклеиновые кислоты 657-3465 SEQ ID NO: 69. Область P1 SVA/Canada/MB/NCFAD-104/2015 включает нуклеиновые кислоты 613-3421 SEQ ID NO: 70. Область P1 SVV-MN15-308 включает нуклеиновые кислоты 611-3419 SEQ ID NO: 71.

(с) Область область P3 SVV-001 включает нуклеиновые кислоты 4855-7212 SEQ ID NO: 25. Область P3 SVA/BRA/MG2/2015 включает нуклеиновые кислоты 4843-7200 SEQ ID NO: 69. Область P3 SVA/Canada/MB/NCFAD-104/2015 включает нуклеиновые кислоты 4799-7156 SEQ ID NO: 70. Область область P3 SVV-MN15-308 включает нуклеиновые кислоты 4797-7154 SEQ ID NO: 71.

[00244] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, описанный в данном документе, кодирует SVV, содержащий область 5'-UTR (IRES), полученную из SVA/BRA/MG2/2015 (нуклеиновые кислоты 1-656 SEQ ID NO: 69). В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий штамм SVV, содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную нуклеиновым кислотам 1-656 последовательности SEQ ID NO: 69. В некоторых вариантах осуществления за исключением одной или более областей, полученных из SVA/BRA/MG2/2015, остальная часть вирусного генома SVV получена из SVV-001 и содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную последовательности соответствующей области SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления SVV представляет собой мутант SVV-S177 (например, мутант S177A).

[00245] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, описанный в данном документе, кодирует SVV, содержащий область 5'-UTR (IRES), полученную из SVA/Canada/MB/NCFAD-104/2015 (нуклеиновые кислоты 1-612 SEQ ID NO: 70). В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий штамм SVV, содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере

мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную нуклеиновым кислотам 1-612 последовательности SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления за исключением одной или более областей, полученных из SVA/Canada/MB/NCFAD-104/2015, остальная часть вирусного генома SVV получена из SVV-001 и содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную последовательности соответствующей области SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления SVV представляет собой мутант SVV-S177 (например, мутант S177A).

[00246] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, описанный в данном документе, кодирует SVV, содержащий область 5'-UTR (IRES), полученную из SVV-MN15-308 (нуклеиновые кислоты 1-610 SEQ ID NO: 71). В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий штамм SVV, содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную нуклеиновым кислотам 1-610 последовательности SEQ ID NO: 71. В некоторых вариантах осуществления за исключением одной или более областей, полученных из SVV-MN15-308, остальная часть вирусного генома SVV получена из SVV-001 и содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную последовательности соответствующей области SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления SVV представляет собой мутант SVV-S177 (например, мутант

S177A).

[00247] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, описанный в данном документе, кодирует SVV, содержащий область P1, полученную из SVA/BRA/MG2/2015 (нуклеиновые кислоты 657-3465 SEQ ID NO: 69). В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий штамм SVV, содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную нуклеиновым кислотам 657-3465 последовательности SEQ ID NO: 69. В некоторых вариантах осуществления за исключением одной или более областей, полученных из SVA/BRA/MG2/2015, остальная часть вирусного генома SVV получена из SVV-001 и содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную последовательности соответствующей области SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления SVV представляет собой мутант SVV-S177 (например, мутант S177A).

[00248] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, описанный в данном документе, кодирует SVV, содержащий область P1, полученную из SVA/Canada/MB/NCFAD-104/2015 (нуклеиновые кислоты 613-3421 SEQ ID NO: 70). В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий штамм SVV, содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную нуклеиновым кислотам 613-3421 последовательности SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления за исключением одной или более

областей, полученных из SVA/Canada/MB/NCFAD-104/2015, остальная часть вирусного генома SVV получена из SVV-001 и содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную последовательности соответствующей области SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления SVV представляет собой мутант SVV-S177 (например, мутант S177A).

[00249] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, описанный в данном документе, кодирует SVV, содержащий область P1, полученную из SVV-MN15-308 (нуклеиновые кислоты 611-3419 SEQ ID NO: 71). В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий штамм SVV, содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную нуклеиновым кислотам 611-3419 последовательности SEQ ID NO: 71. В некоторых вариантах осуществления за исключением одной или более областей, полученных из SVV-MN15-308, остальная часть вирусного генома SVV получена из SVV-001 и содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную последовательности соответствующей области SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления SVV представляет собой мутант SVV-S177 (например, мутант S177A).

[00250] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, описанный в данном документе, кодирует SVV, содержащий область P3, полученную из SVA/BRA/MG2/2015 (нуклеиновые кислоты 4843-7200 SEQ ID NO: 69). В

некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий штамм SVV, содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную нуклеиновым кислотам 4843-7200 последовательности SEQ ID NO: 69. В некоторых вариантах осуществления за исключением одной или более областей, полученных из SVA/BRA/MG2/2015, остальная часть вирусного генома SVV получена из SVV-001 и содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную последовательности соответствующей области SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления SVV представляет собой мутант SVV-S177 (например, мутант S177A).

[00251] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, описанный в данном документе, кодирует SVV, содержащий область P3, полученную из SVA/Canada/MB/NCFAD-104/2015 (нуклеиновые кислоты 4799-7156 SEQ ID NO: 70). В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий штамм SVV, содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную нуклеиновым кислотам 4799-7156 последовательности SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления за исключением одной или более областей, полученных из SVA/Canada/MB/NCFAD-104/2015, остальная часть вирусного генома SVV получена из SVV-001 и содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на

94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную последовательности соответствующей области SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления SVV представляет собой мутант SVV-S177 (например, мутант S177A).

[00252] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, описанный в данном документе, кодирует SVV, содержащий область РЗ, полученную из SVV-MN15-308 (нуклеиновые кислоты 4797-7154 SEQ ID NO: 71). В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий штамм SVV, содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную нуклеиновым кислотам 4797-7154 последовательности SEQ ID NO: 71. В некоторых вариантах осуществления за исключением одной или более областей, полученных из SVV-MN15-308, остальная часть вирусного генома SVV получена из SVV-001 и содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичную последовательности соответствующей области SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления SVV представляет собой мутант SVV-S177 (например, мутант S177A).

[00253] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном, описанный в данном документе, кодирует химерный SVV, содержащий область 5'-UTR (IRES), полученную из SVA/Canada/MB/NCFAD-104/2015 (SEQ ID NO: 70), и остальную часть вирусного генома, полученную из SVV-001 (SEQ ID NO: 25). В некоторых вариантах осуществления SVV представляет собой мутант SVV-S177 (например, мутант S177A). В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на

90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичен последовательности SEQ ID NO: 68.

[00254] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном был сконструирован и менее чем 100% идентичен последовательности вирусного генома вируса дикого типа (например, CVA21 дикого типа или SVV дикого типа). В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном менее чем на 99,9%, менее чем на 99,8%, менее чем на 99,7%, менее чем на 99,6%, менее чем на 99,5%, менее чем на 99%, менее чем на 98%, менее чем на 97% менее чем на 96%, менее чем на 95%, менее чем на 94%, менее чем на 93%, менее чем на 92%, менее чем на 91% или менее чем на 90% идентичен последовательности вирусного генома соответствующего вируса дикого типа.

[00255] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном содержит каскету целевой последовательности микроРНК (miРНК) (miR-TS), и при этом каскета miR-TS содержит одну или несколько целевых последовательностей микроРНК, и при этом экспрессия одной или нескольких соответствующих микроРНК в клетке ингибирует репликацию кодируемого онколитического вируса в клетке. В некоторых вариантах осуществления одна или более микроРНК выбраны из miR-124, miR-1, miR-143, miR-128, miR-219, miR-219a, miR-122, miR-204, miR-217, miR-137, miR-142 и miR-126. В некоторых вариантах осуществления каскета miR-TS содержит одну или более копий целевой последовательности miR-124, одну или более копий целевой последовательности miR-1 и одну или более копий целевой последовательности miR-143. В некоторых вариантах осуществления каскета miR-TS содержит одну или более копий целевой последовательности miR-128, одну или более копий целевой последовательности miR-219a и одну или более копий целевой последовательности miR-122. В некоторых вариантах осуществления каскета miR-TS содержит одну или более копий целевой последовательности miR-128, одну или более копий целевой последовательности miR-204 и одну или более копий целевой последовательности miR-219. В некоторых вариантах осуществления каскета miR-TS содержит одну или более копий целевой последовательности miR-217, одну или более копий целевой последовательности miR-137 и одну или более копий целевой последовательности miR-126.

[00256] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-

вирусный геном содержит одну или более каскет miR-TS, включенных в 5'-нетранслируемую область (UTR) или 3'-UTR одного или более основных вирусных генов. В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном содержит одну или более каскет miR-TS, включенных в 5'-нетранслируемую область (UTR) или 3'-UTR одного или более неосновных генов. В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном содержит одну или более каскет miR-TS, включенных на 5'- или 3'-конце одного или более основных вирусных генов.

[00257] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном содержит гетерологичный полинуклеотид, кодирующий молекулу полезной нагрузки. В таких вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном управляет продукцией инфекционного онколитического вируса, а также экспрессией молекулы полезной нагрузки. В некоторых вариантах осуществления экспрессия молекулы полезной нагрузки может повысить терапевтическую эффективность онколитического вируса. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки выбрана из IL-12, GM-CSF, CXCL10, IL-36 γ , CCL21, IL-18, IL-2, CCL4, CCL5, анти-CD3-анти-FAP BiTE, антигенсвязывающей молекулы, которая связывает DLL3, или антигенсвязывающей молекулы, которая связывает EpcAM. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки содержит или состоит из домена 4HB MLKL. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки содержит или состоит из N-концевого фрагмента гасдермина D. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки содержит или состоит из N-концевого фрагмента гасдермина E. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки содержит или состоит из домена Box B HMGB1. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки содержит или состоит из SMAC/Diablo. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки содержит или состоит из мелиттина. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки содержит или состоит из оксидазы L-аминокислот (LAAO). В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки содержит или состоит из дезинтегрина. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки содержит или состоит из TRAIL (TNFSF10). В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки содержит или состоит из нитроредуктазы (например, NfsB или NfsA E. coli). В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки содержит или состоит из белка FAST реовируса (например, ARV p14, BRV p15 или гибрида p14-p15). В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки содержит или состоит из лептина/FOSL2. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки

содержит или состоит из α -1,3-галактозилтрансферазы. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки содержит или состоит из аденозиндезаминазы 2 (ADA2). В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки содержит или состоит из цитокина, выбранного из IL-IL-36 γ , IL-7, IL-12, IL-18, IL-21, IL2 или IFN γ . Дальнейшее описание типов молекул полезной нагрузки, подходящих для применения в этих вариантах осуществления, представлено ниже.

Способы получения рекомбинантных РНК-вирусных геномов

[00258] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложены молекулы рекомбинантной ДНК, кодирующие синтетические РНК-вирусные геномы, описанные в данном документе. Такие молекулы рекомбинантной ДНК называются в данном документе «матрицами ДНК» или «матрицами рекомбинантной ДНК». В некоторых вариантах осуществления молекулы рекомбинантной ДНК используют в качестве матриц для транскрипции *in vitro* кодируемых синтетических РНК-вирусных геномов. В некоторых вариантах осуществления молекулы рекомбинантной ДНК (*например*, матрицы ДНК) содержат от 5' к 3' один или более из следующих элементов: (i) промотор; (ii) 5'-лидерную последовательность; (iii) 5' соединительную последовательность расщепления; (iv) полинуклеотидную последовательность ДНК, кодирующую синтетический РНК-геном; (v) хвост полиА; и/или (vi) 3' соединительную последовательность расщепления. В некоторых вариантах осуществления молекулы рекомбинантной ДНК (*например*, матрицы ДНК), кодирующие молекулу рекомбинантной РНК, содержат каждый из следующих элементов: (i) промотор; (ii) 5'-лидерную последовательность; (iii) 5' соединительную последовательность расщепления; (iv) полинуклеотидную последовательность ДНК, кодирующую синтетический РНК-геном; (v) хвост полиА; и (vi) 3' соединительную последовательность расщепления. Каждый из этих элементов подробно описан ниже. Описание, предоставленное для каждого отдельного элемента, таково, что конкретные варианты осуществления каждого элемента могут быть объединены в конечные молекулы рекомбинантной ДНК (*например*, матрицы ДНК). Например, описание конкретной лидерной последовательности может быть объединено с описанием конкретной 5' соединительной последовательности расщепления и т. д.

[00259] В некоторых вариантах осуществления молекулы рекомбинантной ДНК (*например*, матрицы ДНК) не содержат дополнительных нуклеиновых кислот между двумя смежными элементами, но могут содержать дополнительные нуклеиновые кислоты выше последовательности промотора или ниже 3' соединительной последовательности расщепления. В некоторых вариантах осуществления последовательность промотора

представляет собой последовательность промотора T7. В некоторых вариантах осуществления последовательность промотора T7 содержит или состоит из SEQ ID NO: 91.

[00260] В некоторых вариантах осуществления синтетические РНК-вирусные геномы, описанные в данном документе, получают *in vitro* с использованием одной или более матриц рекомбинантной ДНК, содержащих полинуклеотид, кодирующий синтетические РНК-вирусные геномы. Другими словами, матрицы рекомбинантной ДНК представляют собой векторы, содержащие полинуклеотид, кодирующий синтетические РНК-вирусные геномы. Термин «вектор» используется в данном документе для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной переносить, кодировать или транспортировать другую молекулу нуклеиновой кислоты. Перенесенная нуклеиновая кислота обычно встраивается в вектор молекулы нуклеиновой кислоты. Вектор может включать последовательности, которые направляют автономную репликацию в клетке, и/или может включать последовательности, достаточные для интеграции в ДНК клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления молекулу рекомбинантной РНК, кодирующую онколитический вирус, описанную в данном документе, получают с использованием одного или более векторов ДНК.

[00261] В некоторых вариантах осуществления синтетические РНК-вирусные геномы, описанные в данном документе, получают путем введения молекулы рекомбинантной ДНК (*например*, матрицы ДНК), содержащей полинуклеотид, кодирующий молекулу рекомбинантной РНК (*например*, посредством трансфекции, трансдукции, электропорации и т.п.) в подходящую клетку-хозяина *in vitro*. Подходящие клетки-хозяева включают клеточные линии насекомых и млекопитающих. Клетки-хозяева культивируют в течение соответствующего периода времени, чтобы обеспечить экспрессию полинуклеотидов и продукцию синтетических РНК-вирусных геномов. Затем синтетические РНК-вирусные геномы выделяют из клетки-хозяина и готовят для терапевтического применения (*например*, инкапсулируют в частицу). Схема синтеза *in vitro* РНК-вирусных геномов CVA21 с 3' и 5' рибозимами представлена на **Фиг. 10**. Та же схема применима к синтезу РНК-вирусных геномов (*например*, вирусных геномов CVA21 или SVV) с использованием других комбинаций соединительных последовательностей расщепления (*см.*, *например*, **Фиг. 11А**). Когда 3' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из сайта распознавания ферментом рестрикции, молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) может быть расщеплена соответствующим ферментом рестрикции перед процессом транскрипции *in vitro*, как показано на **Фиг. 11В**.

Промотор T7

[00262] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит промотор T7. В некоторых вариантах осуществления промотор T7 содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 91. В некоторых вариантах осуществления промотор T7 содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 91 с максимум 1, 2, 3 или 4 мутациями.

[00263] В некоторых вариантах осуществления промотор T7 размещен непосредственно перед лидерной последовательностью, без каких-либо дополнительных нуклеотидов между ними. В некоторых вариантах осуществления промотор T7 размещен непосредственно перед 5' соединительной последовательностью расщепления, без каких-либо дополнительных нуклеотидов между ними. В некоторых вариантах осуществления вирусный геном кодирует CVA21 или SVV.

Соединительные последовательности расщепления

[00264] В некоторых вариантах осуществления молекулы рекомбинантной РНК, содержащие синтетические РНК-вирусные геномы, описанные в данном документе, требуют дискретных 5'- и 3'-концов, которые являются нативными для вируса. Транскрипты РНК, продуцируемые РНК-полимеразой T7 *in vitro* или РНК Pol II млекопитающих, содержат 5'- и 3'-UTR млекопитающих и не содержат дискретных нативных концов, необходимых для продукции инфекционного РНК-вируса. Например, РНК-полимеразе T7 необходим остаток гуанозина на 5'-конце матричного полинуклеотида для инициации транскрипции. Однако SVV начинается с остатка уридина на 5'-конце. Таким образом, лидерная последовательность T7, которая необходима для транскрипции транскрипта SVV *in vitro*, должна быть удалена для создания нативного 5'-конца SVV, необходимого для получения функционального инфекционного SVV. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления молекулы рекомбинантной ДНК (*например*, матрицы ДНК), подходящие для применения в получении синтетических РНК-вирусных геномов, описанных в данном документе, требуют дополнительных невирусных 5'- и 3'-последовательностей, которые позволяют получить дискретные 5'- и 3'-концы, нативные для вируса. Такие последовательности в настоящем документе называются соединительными последовательностями расщепления (JCS, англ.: junctional cleavage sequences). В некоторых вариантах осуществления соединительные последовательности расщепления расщепляют РНК-полимеразу T7 или транскрипт РНК, кодируемый Pol II, в месте соединения вирусной РНК и последовательности мРНК млекопитающих, так что невирусные полинуклеотиды РНК удаляются из транскрипта, чтобы поддерживать

эндогенные 5'- и 3'-дискретные концы вируса (см. схему, показанную на **Фиг. 11А**). В некоторых вариантах осуществления соединительные последовательности расщепления действуют для создания соответствующих концов во время линейаризации ДНК-плазмиды, кодирующей синтетический вирусный геном (*например*, использование 3'-последовательностей распознавания ферментом рестрикции для получения соответствующего 3'-конца при линейаризации матрицы плазмиды и до транскрипции *in vitro* синтетического РНК-генома).

[00265] В некоторых вариантах осуществления молекулы рекомбинантной ДНК (*например*, матрицы ДНК), подходящие для применения при получении описанных в данном документе синтетических РНК-вирусных геномов, содержат по меньшей мере одну 5' соединительную последовательность расщепления и по меньшей мере одну 3' соединительную последовательность расщепления. В некоторых вариантах осуществления молекулы рекомбинантной ДНК (*например*, матрицы ДНК), подходящие для применения при получении описанных в данном документе синтетических РНК-вирусных геномов, содержат одну или более 5' соединительных последовательностей расщепления и по меньшей мере одну 3' соединительную последовательность расщепления. В некоторых вариантах осуществления молекулы рекомбинантной ДНК (*например*, матрицы ДНК), подходящие для применения при получении описанных в данном документе синтетических РНК-вирусных геномов, содержат по меньшей мере одну 5' соединительную последовательность расщепления и одну или более 3' соединительных последовательностей расщепления. В некоторых вариантах осуществления молекулы рекомбинантной ДНК (*например*, матрицы ДНК), подходящие для применения при получении описанных в данном документе синтетических РНК-вирусных геномов, содержат одну или более 5' соединительных последовательностей расщепления и одну или более 3' соединительных последовательностей расщепления. В некоторых вариантах осуществления молекулы рекомбинантной ДНК (*например*, матрицы ДНК), подходящие для применения при получении описанных в данном документе синтетических РНК-вирусных геномов, содержат две 5' соединительные последовательности расщепления и по меньшей мере одну 3' соединительную последовательность расщепления. В некоторых вариантах осуществления молекулы рекомбинантной ДНК (*например*, матрицы ДНК), подходящие для применения при получении описанных в данном документе синтетических РНК-вирусных геномов, содержат по меньшей мере одну 5' соединительную последовательность расщепления и две 3' соединительные последовательности расщепления.

[00266] Природу соединительных последовательностей расщепления и

удаление невирусной РНК из транскрипта вирусного генома можно осуществить различными методами. Например, в некоторых вариантах осуществления соединительные последовательности расщепления являются мишенями для молекул РНК-интерференции (РНКи). Термин «молекула РНК-интерференции», используемый в настоящем документе, относится к полинуклеотиду РНК, который опосредует деградацию последовательности мРНК-мишени через эндогенные пути сайленсинга генов (*например*, Dicer и РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC)). Примерные агенты РНК-интерференции включают микроРНК (miРНК), искусственные микроРНК (amiРНК), короткошпилечные РНК (кшРНК) и малые интерферирующие РНК (миРНК). Кроме того, любая система для расщепления транскрипта РНК в определенном месте, известная в настоящее время из уровня техники или определенная в будущем, может быть использована для создания дискретных концов, нативных для вируса.

[00267] В некоторых вариантах осуществления молекула РНКи представляет собой микроРНК. МикроРНК - это встречающаяся в природе малая некодирующая молекула РНК длиной около 18-25 нуклеотидов, которая по меньшей мере частично комплементарна последовательности мРНК-мишени. У животных гены микроРНК транскрибируются в первичную микроРНК (перв-микроРНК), которая является двухцепочечной и образует структуру типа «стебель-петля». Перв-микроРНК затем расщепляют в ядре микропроцессорным комплексом, состоящим из РНКазы III класса 2, Drosha и субъединицы микропроцессора, DCGR8, с образованием 70-100-нуклеотидного предшественника микроРНК (пре-микроРНК). Пре-микроРНК образует шпилечную структуру и транспортируется в цитоплазму, где под действием фермента РНКазы III, Dicer, превращается в двухцепочечную микроРНК из ~ 18-25 нуклеотидов. Хотя любая из цепей двухцепочечной структуры потенциально может действовать как функциональная микроРНК, обычно одна цепь микроРНК деградирует и только одна цепь нагружается на нуклеазу Argonaute (AGO) для создания эффекторного комплекса РНК-индуцированного сайленсинга (RISC), в котором взаимодействуют микроРНК и ее мРНК-мишень (Wahid *et al.*, 1803:11, 2010, 1231-1243). В некоторых вариантах осуществления 5' и/или 3' соединительные последовательности расщепления представляют собой целевые последовательности микроРНК.

[00268] В некоторых вариантах осуществления молекула РНКи представляет собой искусственную микроРНК (amiРНК), полученную из синтетической микроРНК, встроенной в транскрипт Pol II. (См., *например*, Liu *et al.*, Nucleic Acids Res (2008) 36:9; 2811-2834; Zeng *et al.*, Molecular Cell (2002), 9; 1327-1333; Fellman *et al.*, Cell Reports (2013) 5; 1704-1713). В некоторых вариантах осуществления 5' и/или 3' соединительные

последовательности расщепления представляют собой целевые последовательности amiРНК.

[00269] В некоторых вариантах осуществления молекула РНКи представляет собой молекулу миРНК. МиРНК относятся к двуцепочечным молекулам РНК, длина которых обычно составляет около 21-23 нуклеотидов. Двухцепочечная молекула миРНК обрабатывается в цитоплазме ассоциатами мультибелкового комплекса под названием комплекс РНК-индуцированного сайленсинга (RISC), в ходе чего смысловая цепь-«пассажир» ферментативно отщепляется от двухцепочечной структуры. Антисмысловая «направляющая» цепь, содержащаяся в активированной RISC, затем направляет RISC к соответствующей мРНК в силу комплементарности последовательности, и нуклеаза AGO разрезает мРНК-мишень, что приводит к специфическому геному сайленсингу. В некоторых вариантах осуществления молекула миРНК получена из молекулы шРНК. ШРНК - это одноцепочечные искусственные молекулы РНК длиной ~ 50-70 нуклеотидов, образующие структуры типа «стебель-петля». Экспрессия шРНК в клетках осуществляется путем введения полинуклеотида ДНК, кодирующего шРНК, с помощью плазмиды или вирусного вектора. Затем кшРНК транскрибируют в продукт, который имитирует структуру «стебель-петля» пре-микроРНК, а после ядерного экспорта шпилечная структура обрабатывается Dicer с образованием дуплексной молекулы миРНК, которая затем дополнительно обрабатывается RISC для обеспечения сайленсинга генов-мишеней. В некоторых вариантах осуществления 5' и/или 3' соединительные последовательности расщепления представляют собой целевые последовательности миРНК.

[00270] В некоторых вариантах осуществления соединительные последовательности расщепления представляют собой целевые последовательности направляющей РНК (нРНК). В таких вариантах осуществления нРНК могут быть сконструированы и введены с помощью эндонуклеазы Cas с активностью РНКазы (*например*, Cas13) для опосредованного расщепления транскрипта вирусного генома в точном месте соединения. В некоторых вариантах осуществления 5' и/или 3' соединительные последовательности расщепления представляют собой целевые последовательности направляющей РНК.

[00271] В некоторых вариантах осуществления соединительные последовательности расщепления представляют собой последовательности, кодирующие перв-микроРНК. При транскрипции полинуклеотида, кодирующего вирусный геном (*например*, молекулы рекомбинантной РНК), эти последовательности образуют структуру типа «стебель-петля» перв-микроРНК, которая затем расщепляется в ядре с помощью

Drosha для расщепления транскрипта в точном месте соединения. В некоторых вариантах осуществления 5' и/или 3' соединительные последовательности расщепления представляют собой целевые последовательности перв-микроРНК.

[00272] В некоторых вариантах осуществления соединительные последовательности расщепления представляют собой последовательности связывания праймера, которые облегчают расщепление эндорибонуклеазой РНКазой Н. В таких вариантах осуществления праймер, который отжигается с 5' и/или 3' соединительной последовательностью расщепления, добавляют в реакцию *in vitro* вместе с ферментом РНКазой Н. РНКазы Н специфически гидролизуют фосфодиэфирные связи РНК, которая гибридизуется с ДНК, что позволяет расщеплять синтетические промежуточные соединения РНК-генома в точной соединительной последовательности расщепления с получением необходимых 5'- и 3'-нативных концов.

[00273] В некоторых вариантах осуществления соединительные последовательности расщепления содержат или состоят из сайтов распознавания ферментом рестрикции и приводят к образованию дискретных концов вирусных транскриптов во время линейаризации прерванного синтеза РНК с матрицы плазмиды РНК-полимеразой T7. В некоторых вариантах осуществления соединительные последовательности расщепления представляют собой сайты распознавания ферментом рестрикции типа IIS. Ферменты рестрикции типа IIS включают специфическую группу ферментов, которые распознают асимметричные последовательности ДНК и расщепляют их на определенном расстоянии за пределами последовательности распознавания, обычно в пределах от 1 до 20 нуклеотидов. Типичные ферменты рестрикции типа IIS включают AclI, AlwI, BaeI, BbsI, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BcoDI, BfuAI, BmrI, BpmI, BpuEI, BsaI, BsaXI, BseRI, BsgI, BsmAI, BsmBI, BsmFI, BsmI, BspCNI, BspMI, BspQI, BsrDI, BsrI, BtgZI, BtsCI, BstI, CaspCI, EarI, EciI, Esp3I, FauI, FokI, HgaI, HphI, HpyAV, MboI, MlyI, MmeI, MnlI, NmeAIII, PleI, SapI и SfaNI. Последовательности распознавания этими ферментами рестрикции типа IIS известны в данной области техники. См. веб-сайт биологических лабораторий Новой Англии, расположенный по адресу neb.com/tools-and-resources/selection-charts/type-iis-restriction-enzymes. В некоторых вариантах осуществления соединительная последовательность расщепления содержит сайт распознавания ферментом рестрикции SapI. В некоторых вариантах осуществления соединительная последовательность расщепления содержит сайт распознавания ферментом рестрикции BsmBI. В некоторых вариантах осуществления соединительная последовательность расщепления содержит сайт распознавания ферментом рестрикции BsaI. Специалисту в данной области техники будет понятно, что, поскольку сайт

расщепления ферментами рестрикции типа IIS обычно находится за пределами сайта распознавания ферментом (например, смещен на 1-5 нуклеотидов), соответствующая соединительная последовательность расщепления может также содержать дополнительные нуклеотиды, необходимые соответствующему ферменту рестрикции для создания дискретного конца вирусного транскрипта (например, хвоста поли-А на 3'-конце).

[00274] В некоторых вариантах осуществления соединительные последовательности расщепления представляют собой последовательности, кодирующие лиганд-индуцируемые саморасщепляющиеся рибозимы, называемые «аптазимами». Аптазимы - это последовательности рибозимов, содержащие встроенный домен аптамера, специфичный для лиганда. Связывание лиганда с доменом аптамера запускает активацию ферментативной активности рибозима, что приводит к расщеплению транскрипта РНК. Примерные аптазимы включают теофиллин-зависимые аптазимы (*например*, рибозим типа «головки молотка», связанный с теофиллин-зависимым аптамером, описанные в Auslander *et al.*, Mol BioSyst. (2010) 6, 807-814), тетрациклин-зависимые аптазимы (*например*, рибозим типа «головки молотка», связанный с Tet-зависимым аптамером, описанные в Zhong *et al.*, eLife 2016;5:e18858 DOI: 10.7554/eLife.18858; Win and Smolke, PNAS (2007) 104; 14283-14288; Whittmann and Suess, Mol Biosyt (2011) 7; 2419-2427; Xiao *et al.*, Chem & Biol (2008) 15; 125-1137; и Beilstein *et al.*, ACS Syn Biol (2015) 4; 526-534), гуанин-зависимые аптазимы (*например*, рибозим типа «головки молотка», связанный с гуанин-зависимым аптамером, описанные в Nomura *et al.*, Chem Commun., (2012) 48(57); 7215-7217). В некоторых вариантах осуществления 5' и/или 3' соединительные последовательности расщепления представляют собой последовательности, кодирующие аптазимы.

[00275] В некоторых вариантах осуществления соединительные последовательности расщепления представляют собой целевые последовательности для молекулы РНКи (*например*, молекулы миРНК, молекулы кшРНК, молекулы микроРНК или молекулы атiРНК), молекулы нРНК или праймера РНКазы Н. В таких вариантах осуществления соединительная последовательность расщепления по меньшей мере частично комплементарна последовательности молекулы РНКи, молекулы нРНК или молекулы праймера. Методы выравнивания последовательности для сравнения и определения процента идентичности последовательности и процента комплементарности хорошо известны в данной области техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено, *например*, с помощью алгоритма гомологического выравнивания по Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol.

48:443, методом поиска сходства по Pearson and Lipman, (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, путем компьютеризированной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), путем ручного выравнивания и визуального осмотра (см., например, Brent *et al.*, (2003) Current Protocols in Molecular Biology), с помощью алгоритмов, известных в данной области, включая алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul *et al.*, (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402; и Altschul *et al.*, (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410, соответственно. Программное обеспечение для проведения BLAST-анализа находится в открытом доступе в Национальном центре биотехнологической информации.

[00276] В некоторых вариантах осуществления 5' соединительная последовательность расщепления и 3' соединительная последовательность расщепления относятся к одной группе (например, обе являются целевыми последовательностями РНКи, обе являются последовательностями, кодирующими рибозимы и т.д.). Например, в некоторых вариантах осуществления соединительные последовательности расщепления представляют собой целевые последовательности РНКи (например, целевые последовательности миРНК, кшРНК, amiРНК или микроРНК) и включены в 5' и 3' концы полинуклеотида, кодирующего вирусный геном (например, молекулу рекомбинантной РНК). В таких вариантах осуществления 5' и 3' целевые последовательности РНКи могут быть одинаковыми (т.е. мишенями для одной и той же миРНК, amiРНК или микроРНК) или разными (т.е. 5' последовательность является мишенью для одной миРНК, shamiРНК или микроРНК, а 3' последовательность является мишенью для другой миРНК, amiРНК или микроРНК). Например, в некоторых вариантах осуществления соединительные последовательности расщепления представляют собой целевые последовательности направляющей РНК и включены в 5' и 3' концы полинуклеотида, кодирующего вирусный геном (например, молекулу рекомбинантной РНК). В таких вариантах осуществления 5' и 3' целевая последовательность нРНК могут быть одинаковыми (т.е. мишенями для одной и той же нРНК) или разными (т.е. 5' последовательность является мишенью для одной нРНК, а 3' последовательность является мишенью для другой нРНК). Например, в некоторых вариантах осуществления соединительные последовательности расщепления представляют собой последовательности, кодирующие перв-микроРНК, и включены в 5' и 3' концы полинуклеотида, кодирующего вирусный геном (например, молекулы рекомбинантной РНК). Например, в некоторых вариантах осуществления соединительные последовательности расщепления представляют собой последовательности, кодирующие рибозим, и включены непосредственно в 5' и 3' концы последовательности

полинуклеотида, кодирующей вирусный геном (*например*, молекулу рекомбинантной РНК).

[00277] В некоторых вариантах осуществления 5' соединительная последовательность расщепления и 3' соединительная последовательность расщепления относятся к одной группе, но являются различными вариантами или типами. Например, в некоторых вариантах осуществления 5' и 3' соединительные последовательности расщепления могут быть целевыми последовательностями для молекулы РНКи, при этом 5' соединительная последовательность расщепления является целевой последовательностью миРНК, а 3' соединительная последовательность расщепления - целевой последовательностью микроРНК (или наоборот). В некоторых вариантах осуществления 5' и 3' соединительные последовательности расщепления могут быть последовательностями, кодирующими рибозимы, при этом 5' соединительная последовательность расщепления является последовательностью, кодирующей рибозим типа «головки молотка», а 3' соединительная последовательность расщепления является последовательностью, кодирующей рибозим вируса гепатита дельта.

[00278] В некоторых вариантах осуществления 5' соединительная последовательность расщепления и 3' соединительная последовательность расщепления являются разными типами. Например, в некоторых вариантах осуществления 5' соединительная последовательность расщепления представляет собой целевую последовательность РНКи (*например*, целевую последовательность миРНК, amiРНК или микроРНК), а 3' соединительная последовательность расщепления представляет собой последовательность рибозима, последовательность аптазима, последовательность перв-микроРНК или целевую последовательность нРНК. В некоторых вариантах осуществления 5' соединительная последовательность расщепления представляет собой последовательность рибозима, а 3' соединительная последовательность расщепления представляет собой целевую последовательность РНКи (*например*, целевую последовательность миРНК, amiРНК или микроРНК), последовательность аптазима, последовательность, кодирующую перв-микроРНК, или целевую последовательность нРНК. В некоторых вариантах осуществления 5' соединительная последовательность расщепления представляет собой последовательность аптазима, а 3' соединительная последовательность расщепления представляет собой целевую последовательность РНКи (*например*, целевую последовательность миРНК, amiРНК или микроРНК), последовательность рибозима, последовательность перв-микроРНК или целевую последовательность нРНК. В некоторых вариантах осуществления 5' соединительная последовательность расщепления представляет собой последовательность перв-

микроРНК, а 3' соединительная последовательность расщепления представляет собой целевую последовательность РНКи (*например*, целевую последовательность миРНК, амiРНК или микроРНК), последовательность рибозима, последовательность аптазима или целевую последовательность нРНК. В некоторых вариантах осуществления 5' соединительная последовательность расщепления представляет собой целевую последовательность нРНК, а 3' соединительная последовательность расщепления представляет собой целевую последовательность РНКи (*например*, целевую последовательность миРНК, амiРНК или микроРНК), последовательность рибозима, последовательность перв-микроРНК или последовательность аптазима.

[00279] Типичные расположения соединительных последовательностей расщепления относительно полинуклеотида, кодирующего синтетический вирусный геном, показаны ниже в **Таблицах 3 и 4**.

Таблица 3: Симметричные расположения соединительной последовательности расщепления (JCS)

5'	JCS		JCS	3'
	TS миРНК	синтетический геном	TS миРНК	
	miR-TS	синтетический геном	miR-TS	
	TS AmiR	синтетический геном	TS AmiR	
	TS нРНК	синтетический геном	TS нРНК	
	перв-miR	синтетический геном	перв-miR	
	рибозим	синтетический геном	рибозим	
	аптазим	синтетический геном	аптазим	
	TS праймера РНКазы Н	синтетический геном	TS праймера РНКазы Н	

Таблица 4: Асимметричные расположения JCS

5'	JCS		JCS	3'
	TS миРНК	синтетический геном	miR-TS	
	TS миРНК	синтетический геном	TS AmiR	
	TS миРНК	синтетический геном	TS нРНК	
	TS миРНК	синтетический геном	перв-miR	
	TS миРНК	синтетический геном	рибозим	

5'	JCS		JCS	3'
	TS миРНК	синтетический геном	аптазим	
	TS миРНК	синтетический геном	TS праймера РНКазы Н	
	TS миРНК	синтетический геном	Сайт распозн. ферм. рестр.	
	miR-TS	синтетический геном	TS миРНК	
	miR-TS	синтетический геном	TS AmiR	
	miR-TS	синтетический геном	TS нРНК	
	miR-TS	синтетический геном	перв-miR	
	miR-TS	синтетический геном	рибозим	
	miR-TS	синтетический геном	аптазим	
	miR-TS	синтетический геном	TS праймера РНКазы Н	
	miR-TS	синтетический геном	Сайт распозн. ферм. рестр.	
	TS AmiR	синтетический геном	TS миРНК	
	TS AmiR	синтетический геном	miR-TS	
	TS AmiR	синтетический геном	TS нРНК	
	TS AmiR	синтетический геном	перв-miR	
	TS AmiR	синтетический геном	рибозим	
	TS AmiR	синтетический геном	аптазим	
	TS AmiR	синтетический геном	TS праймера РНКазы Н	
	TS AmiR	синтетический геном	Сайт распозн. ферм. рестр.	
	TS нРНК	синтетический геном	TS миРНК	
	TS нРНК	синтетический геном	miR-TS	
	TS нРНК	синтетический геном	TS AmiR	
	TS нРНК	синтетический геном	перв-miR	
	TS нРНК	синтетический геном	рибозим	
	TS нРНК	синтетический	аптазим	

5'	<u>JCS</u>		<u>JCS</u>	3'
		геном		
	TS нРНК	синтетический геном	TS праймера РНКазы Н	
	TS нРНК	синтетический геном	Сайт распозн. ферм. рестр.	
	перв-miR	синтетический геном	TS миРНК	
	перв-miR	синтетический геном	miR-TS	
	перв-miR	синтетический геном	TS AmiR	
	перв-miR	синтетический геном	TS нРНК	
	перв-miR	синтетический геном	рибозим	
	перв-miR	синтетический геном	аптазим	
	перв-miR	синтетический геном	TS праймера РНКазы Н	
	перв-miR	синтетический геном	Сайт распозн. ферм. рестр.	
	рибозим	синтетический геном	TS миРНК	
	рибозим	синтетический геном	miR-TS	
	рибозим	синтетический геном	TS AmiR	
	рибозим	синтетический геном	TS нРНК	
	рибозим	синтетический геном	перв-miR	
	рибозим	синтетический геном	аптазим	
	рибозим	синтетический геном	TS праймера РНКазы Н	
	рибозим	синтетический геном	Сайт распозн. ферм. рестр.	
	аптазим	синтетический геном	TS миРНК	
	аптазим	синтетический геном	miR-TS	
	аптазим	синтетический геном	TS AmiR	
	аптазим	синтетический геном	TS нРНК	
	аптазим	синтетический геном	перв-miR	
	аптазим	синтетический геном	рибозим	

5'	JCS		JCS	3'
	аптазим	синтетический геном	TS праймера РНКазы Н	
	аптазим	синтетический геном	Сайт распозн. ферм. рестр.	
	TS праймера РНКазы Н	синтетический геном	TS миРНК	
	TS праймера РНКазы Н	синтетический геном	miR-TS	
	TS праймера РНКазы Н	синтетический геном	TS AmiR	
	TS праймера РНКазы Н	синтетический геном	TS нРНК	
	TS праймера РНКазы Н	синтетический геном	перв-miR	
	TS праймера РНКазы Н	синтетический геном	рибозим	
	TS праймера РНКазы Н	синтетический геном	аптазим	
	TS праймера РНКазы Н	синтетический геном	Сайт распозн. ферм. рестр.	

*«Сайт распозн. ферм. рестр.» относится к сайту распознавания ферментом рестрикции.

[00280] В некоторых вариантах осуществления соединительные последовательности расщепления представляют собой последовательности, кодирующие рибозимы, и опосредуют саморасщепление промежуточных продуктов синтетического РНК-генома с получением нативных дискретных 5'- и/или 3'-концов, необходимых для конечного синтетического РНК-вирусного генома и последующего получения инфекционных РНК-вирусов. Типичные рибозимы включают рибозим типа «головки молотка» (*например*, рибозимы типа «головки молотка», показанные на **Фиг. 5А**), рибозим сателлита Варкуда (VS), шпилечный рибозим, рибозим ветвления GIR1, рибозим *glmS*, рибозим *twister*, сестринский рибозим *twister* (*например*, сестринский *twister* 1 или сестринский *twister* 2), рибозим типа «пистолет» (*например*, рибозимы типа «пистолет», показанные на **Фиг. 6А-6С**, рибозим типа «пистолет» Env25 или рибозим типа «пистолет» из *Alistipes putredinis*), рибозим типа «топор» и рибозим вируса гепатита дельта. В некоторых вариантах осуществления 5' и/или 3' соединительные последовательности расщепления представляют собой последовательности, кодирующие рибозим.

[00281] В некоторых вариантах осуществления 5' соединительная последовательность расщепления содержит последовательность рибозима. В некоторых вариантах осуществления 5' последовательность рибозима выбрана из последовательности рибозима типа «головка молотка», последовательности рибозима

типа «пистолет» или последовательности сестринского рибозима twister.

[00282] В некоторых вариантах осуществления 5' соединительная последовательность расщепления содержит 5' последовательность рибозима типа «пистолет». В некоторых вариантах осуществления 5' последовательность рибозима типа «пистолет» получена из *P. polymuxa*. В некоторых вариантах осуществления 5' последовательность рибозима типа «пистолет» полученная из *P. polymuxa*, содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичной любой последовательности из SEQ ID NO: 16–19 и 23–24. В некоторых вариантах осуществления 5' последовательность рибозима типа «пистолет» содержит мотив P2, как показано на **Фиг. 6А** и 6С, который имеет длину четыре нуклеотида и расположен в области, соответствующей положениям нуклеиновых кислот 27-30 SEQ ID NO: 16–19 и 23–24. В некоторых вариантах осуществления 5' последовательность рибозима типа «пистолет», полученная из *P. polymuxa*, содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 17, при этом полинуклеотидная последовательность его мотива P2 представляет собой «ТТТА». В некоторых вариантах осуществления 5' последовательность рибозима типа «пистолет», полученная из *P. polymuxa*, содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 18, при этом полинуклеотидная последовательность его мотива P2 представляет собой «ТТТТ». В некоторых вариантах осуществления 5' последовательность рибозима типа «пистолет», полученная из *P. polymuxa*, содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 19, при этом полинуклеотидная последовательность его мотива P2 представляет собой «ТТGT». В некоторых вариантах осуществления 5' последовательность рибозима типа «пистолет»

включена в молекулу рекомбинантной ДНК для транскрипции *in vitro* РНК-вирусного генома вируса Коксаки (например, CVA21).

[00283] В некоторых вариантах осуществления 5' соединительная последовательность расщепления содержит 5' последовательность рибозима типа «пистолет». В некоторых вариантах осуществления 5' последовательность рибозима типа «пистолет» получена из *P. polynuxa*. В некоторых вариантах осуществления 5' последовательность рибозима типа «пистолет», полученная из *P. polynuxa*, содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 64 или 65. В некоторых вариантах осуществления 5' последовательность рибозима типа «пистолет» содержит мотив P2, который имеет длину четыре нуклеотида и расположен в области, соответствующей положениям нуклеиновых кислот 27-30 SEQ ID NO: 64 или 65. В некоторых вариантах осуществления 5' последовательность рибозима типа «пистолет», полученная из *P. polynuxa*, содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 64, при этом полинуклеотидная последовательность его мотива P2 представляет собой «ТCAA». В некоторых вариантах осуществления 5' последовательность рибозима типа «пистолет», полученная из *P. polynuxa*, содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 65, при этом полинуклеотидная последовательность его мотива P2 представляет собой «ТТАА». В некоторых вариантах осуществления 5' последовательность рибозима типа «пистолет» включена в молекулу рекомбинантной ДНК для транскрипции *in vitro* РНК-вирусного генома SVV (например, SVV-IRES-2).

[00284] В некоторых вариантах осуществления 5' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности рибозима типа «пистолет» Env25. В некоторых вариантах осуществления последовательность ДНК, кодирующая рибозим типа «пистолет» Env25, содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере

на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 96. В некоторых вариантах осуществления последовательность РНК рибозима типа «пистолет» Env25 содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 100.

[00285] В некоторых вариантах осуществления 5' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности рибозима типа «пистолет» из *Alistipes putredinis*. В некоторых вариантах осуществления последовательность ДНК, кодирующая рибозим типа «пистолет» из *Alistipes putredinis*, содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 97. В некоторых вариантах осуществления последовательность РНК рибозима типа «пистолет» из *Alistipes putredinis* содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 101.

[00286] В некоторых вариантах осуществления 5' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности сестринского рибозима twister 1. В некоторых вариантах осуществления последовательность ДНК, кодирующая сестринский рибозим twister 1, содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 98. В некоторых вариантах осуществления последовательность РНК сестринского рибозима twister 1 содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 100%.

99% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 102.

[00287] В некоторых вариантах осуществления 5' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности сестринского рибозима twister 2. В некоторых вариантах осуществления последовательность ДНК, кодирующая сестринский рибозим twister 2, содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 99. В некоторых вариантах осуществления последовательность РНК сестринского рибозима twister 2 содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 103.

Лидерная последовательность

[00288] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит лидерную последовательность между последовательностью промотора и 5' соединительной последовательностью расщепления. В некоторых вариантах осуществления присутствие лидерной последовательности способствует или обеспечивает правильный фолдинг расположенной ниже 5' соединительной последовательности расщепления (*например*, 5' последовательности рибозима).

[00289] В некоторых вариантах осуществления лидерная последовательность имеет длину около 5 п.н., около 10 п.н., около 15 п.н., около 20 п.н., около 25 п.н., около 30 п.н., около 35 п.н., около 40 п.н., около 45 п.н., около 50 п.н., около 55 п.н. около 60 п.н., около 65 п.н., около 70 п.н., около 75 п.н., около 80 п.н., около 85 п.н., около 90 п.н., около 95 п.н. или около 100 п.н., включая все диапазоны и поддиапазоны между ними. В некоторых вариантах осуществления лидерная последовательность имеет длину по меньшей мере 5 п.н., по меньшей мере 10 п.н., по меньшей мере 15 п.н., по меньшей мере 20 п.н., по меньшей мере 25 п.н., по меньшей мере 30 п.н., по меньшей мере 35 п.н., по меньшей мере 40 п.н., по меньшей мере 45 п.н., по меньшей мере 50 п.н., по меньшей мере 55 п.н. длиной по меньшей мере 60 п.н., по меньшей мере 65 п.н., по меньшей мере 70 п.н., по меньшей мере 75 п.н., по меньшей мере 80 п.н., по меньшей мере 85 п.н., по

меньшей мере 90 п.н., по меньшей мере 95 п.н. или по меньшей мере 100 п.н., включая все диапазоны и поддиапазоны между ними. В некоторых вариантах осуществления лидерная последовательность имеет длину менее 5 п.н., менее 10 п.н., менее 15 п.н., менее 20 п.н., менее 25 п.н., менее 30 п.н., менее 35 п.н., менее 40 п.н., менее 45 п.н., менее 50 п.н., менее 55 п.н. длиной менее 60 п.н., менее 65 п.н., менее 70 п.н., менее 75 п.н., менее 80 п.н., менее 85 п.н., менее 90 п.н., менее 95 п.н. или менее 100 п.н., включая все диапазоны и поддиапазоны между ними. В некоторых вариантах осуществления лидерная последовательность имеет длину около 50-70 п.н., около 40-60 п.н., около 60-80 п.н., около 40-80 п.н., около 30-70 п.н., около 50-90 п.н., около 30-90 п.н., около 20-60 п.н. или около 60-100 п.н., включая все диапазоны и поддиапазоны между ними. В некоторых вариантах осуществления лидерная последовательность имеет длину около 57 п.н. или около 55-60 п.н.

[00290] В некоторых вариантах осуществления лидерная последовательность содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичной любой последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 13-15. В некоторых вариантах осуществления лидерная последовательность содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности в соответствии с любой из SEQ ID NO: 13-15. В некоторых вариантах осуществления лидерная последовательность содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления лидерная последовательность содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления за лидерной последовательностью следует или непосредственно следует 5' последовательность рибозима типа «пистолет» (*например*, рибозима типа «пистолет» из *P. Polytuxa* или его варианта). В некоторых вариантах осуществления лидерная последовательность включена в молекулу рекомбинантной ДНК (*например*, матрицу ДНК) для транскрипции *in vitro* РНК-вирусного генома CVA21.

[00294] В некоторых вариантах осуществления за лидерной последовательностью следует или непосредственно следует 5' последовательность рибозима типа «пистолет» (*например*, рибозима типа «пистолет» в соответствии с SEQ ID NO: 64 или 65, или его варианта). В некоторых вариантах осуществления лидерная последовательность включена в молекулу рекомбинантной ДНК (*например*, матрицу ДНК) для транскрипции *in vitro* РНК-вирусного генома SVV.

Хвост поли-А

[00295] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит последовательность, кодирующую хвост полиА. В некоторых вариантах осуществления хвост поли-А прикреплен к 3'-концу синтетического РНК-вирусного генома. В некоторых вариантах осуществления хвост поли-А имеет длину 2-500 п.н. (т.е. 2-500 пА). В некоторых вариантах осуществления хвост поли-А имеет длину 2-100, 2-150, 2-200, 2-250, 2-300, 2-400 или 2-500 п.н., включая все диапазоны и поддиапазоны между ними. В некоторых вариантах осуществления хвост поли-А имеет длину около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200 п.н., включая все диапазоны и поддиапазоны между ними. В некоторых вариантах осуществления хвост поли-А имеет длину около 10-30, 20-40, 30-50, 40-60, 50-70, 60-80, 70-90, 80-100, 90-110, 100-120, 110-130, 120-140, 130-150, 140-160, 150-170, 160-180, 170-190 или 180-200 п.н., включая все диапазоны и поддиапазоны между ними. В некоторых вариантах осуществления хвост поли-А имеет длину около 65-75, 60-80, 55-85, 50-90, 45-95 или 40-100 п.н., включая все диапазоны и поддиапазоны между ними. В некоторых вариантах осуществления хвост поли-А имеет длину около 70 п.н. В некоторых вариантах осуществления более длинный хвост поли-А (*например*, длиной около 70 п.н.) улучшает емкость загрузки синтетического РНК-вирусного генома при хроматографии с олиго-dT по сравнению с соответствующим синтетическим РНК-вирусным геномом с более коротким хвостом поли-А (*например*, длиной около 30 п.н.). В некоторых вариантах осуществления емкость загрузки повышается по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80% по меньшей мере на 90%, по меньшей мере в 1 раз, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 7 раз или по меньшей мере в 10 раз по сравнению с синтетическим РНК-вирусным геномом с хвостом поли-А длиной около 30 п.н.

Неограничивающие примеры конструкций молекул рекомбинантной ДНК

[00296] В некоторых вариантах осуществления синтетические РНК-вирусные геномы, описанные в данном документе, получают *in vitro* путем транскрипции РНК *in vitro* (См., например, схему на **Фиг. 10**, **Фиг. 11А**, **Фиг. 11В** и **Фиг. 33**). Затем синтетические РНК-вирусные геномы очищают и готовят для терапевтического применения (например, инкапсулируют в липидную частицу).

[00297] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (например, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора (например, промотор полимеразы Т7); (ii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из последовательности рибозима; (iii) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном; и (iv) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из последовательности рибозима. В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (например, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора (например, промотор полимеразы Т7); (ii) 5' последовательность рибозима типа «головки молотка» (например, ННР дикого типа или модифицированную ННР, такую как представленная на **Фиг. 5А** и **Фиг. 5В**); (iii) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном; и (iv) 3' последовательность рибозима вируса гепатита дельта.

[00298] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (например, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора (например, промотор полимеразы Т7); (ii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из последовательности рибозима; (iii) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном; и (iv) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую сайт распознавания ферментом рестрикции. В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (например, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора (например, промотор полимеразы Т7); (ii) 5' последовательность рибозима типа «головки молотка» (например, ННР дикого типа или модифицированную ННР, такую как представленная на **Фиг. 5А** и **Фиг. 5В**); (iii) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном; и (iv) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции SapI.

[00299] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (например, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора (например, промотор полимеразы Т7); (ii) 5' соединительную последовательность

расщепления, содержащую или состоящую из последовательности рибозима; (iii) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном; и (iv) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции. В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора (*например*, промотор полимеразы Т7); (ii) 5' последовательность рибозима типа «головки молотка» (*например*, ННР дикого типа или модифицированную ННР, такую как представленная на **Фиг. 5А** и **Фиг. 5В**); (iii) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном; и (iv) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции BsaI.

[00300] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора (*например*, промотор полимеразы Т7); (ii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' последовательности рибозима типа «пистолет» (*например*, последовательности рибозима типа «пистолет» 1 или типа «пистолет» 2, представленная на **Фиг. 6В**); (iii) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном; и (iv) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции SapI.

[00301] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора (*например*, промотор полимеразы Т7); (ii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' последовательности рибозима типа «пистолет» (*например*, последовательности рибозима типа «пистолет» 1 или типа «пистолет» 2, представленной на **Фиг. 6В**); (iii) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном; и (iv) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции BsaI.

[00302] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора (*например*, промотор полимеразы Т7); (ii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' сайта связывания праймера РНКазы Н; (iii) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном; и (iv) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую сайт распознавания ферментом рестрикции. В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной

ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит полинуклеотид, содержащий от 5' к 3': (i) последовательность промотора (*например*, промотор полимеразы T7); (ii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' сайта связывания праймера РНКазы H; (iii) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном; и (iv) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции SapI.

[00303] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора (*например*, промотор полимеразы T7); (ii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' сайта связывания праймера РНКазы H; (iii) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном; и (iv) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую сайт распознавания ферментом рестрикции. В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит полинуклеотид, содержащий от 5' к 3': (i) последовательность промотора (*например*, промотор полимеразы T7); (ii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' сайта связывания праймера РНКазы H; (iii) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном; и (iv) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции BsaI.

[00304] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном представляет собой геном вируса Коксаки (CVA). В некоторых вариантах осуществления вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21. В некоторых вариантах осуществления штамм CVA21 представляет собой штамм EF. В некоторых вариантах осуществления штамм CVA21 представляет собой штамм KY.

[00305] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора (*например*, промотор полимеразы T7); (ii) необязательную лидерную последовательность; (iii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' последовательности рибозима типа «пистолет» (*например*, рибозим типа «пистолет» из *P. Polytuxa* или его вариант); (iv) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном; (v) хвост поли-А (*например*, длиной около 20-80 п.н. или длиной около 30-70 п.н.) и (vi) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции (*например*, для фермента рестрикции BsmBI или BsaI).

[00306] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной

ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора (*например*, промотор полимеразы T7); (ii) лидерную последовательность (*например*, SEQ ID NO: 14 или 15); (iii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' последовательности рибозима типа «пистолет» (*например*, рибозим типа «пистолет» из *P. Polymuxa* или его вариант); (iv) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном CVA21; (v) хвост поли-А (*например*, длиной около 20-80 п.н. или длиной около 30-70 п.н.) и (vi) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции BsmBI.

[00307] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора (*например*, промотор полимеразы T7); (ii) лидерную последовательность (*например*, SEQ ID NO: 14 или 15); (iii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' последовательности рибозима типа «пистолет» (*например*, рибозим типа «пистолет» из *P. Polymuxa* или его вариант); (iv) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном CVA21; (v) хвост поли-А (*например*, длиной около 20-80 п.н. или длиной около 30-70 п.н.) и (vi) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции BsaI.

[00308] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора (*например*, промотор полимеразы T7); (ii) лидерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 15; (iii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' последовательности рибозима типа «пистолет»; (iv) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном CVA21; (v) хвост поли-А и (vi) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции BsmBI, где комбинация 5' последовательности рибозима типа «пистолет» и хвоста поли-А выбрана из одного из вариантов осуществления E1-E68, представленных в Таблице 5А ниже.

[00309] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора (*например*, промотор полимеразы T7); (ii) лидерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 15; (iii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' последовательности рибозима типа «пистолет»; (iv) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном CVA21; (v) хвост поли-А и (vi) 3'

соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции BsaI, где комбинация 5' последовательности рибозима типа «пистолет» и хвоста поли-А выбрана из одного из вариантов осуществления E1-E68, представленных в Таблице 5А ниже.

[00310] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора (*например*, промотор полимеразы T7); (ii) лидерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 14; (iii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' последовательности рибозима типа «пистолет»; (iv) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном CVA21; (v) хвост поли-А и (vi) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции BsmBI, где комбинация 5' последовательности рибозима типа «пистолет» и хвоста поли-А выбрана из одного из вариантов осуществления E1-E68, представленных в Таблице 5А ниже.

[00311] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора (*например*, промотор полимеразы T7); (ii) лидерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 14; (iii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' последовательности рибозима типа «пистолет»; (iv) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном CVA21; (v) хвост поли-А и (vi) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции BsaI, где комбинация 5' последовательности рибозима типа «пистолет» и хвоста поли-А выбрана из одного из вариантов осуществления E1-E68, представленных в Таблице 5А ниже.

Таблица 5А: Неограничивающие варианты осуществления лидерной последовательности, 5'-рибозимной последовательности и хвоста поли-А в матрице ДНК для экспрессии вирусного генома CVA21

	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТТТА».	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТТТТ».
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 14; хвост поли-А длиной около 100 пА	Вариант осуществления E1	Вариант осуществления E2
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 14; хвост поли-А длиной около 90 пА	Вариант осуществления E3	Вариант осуществления E4
Лидерная последовательность в	Вариант	Вариант

	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТТТА».	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТТТТ».
соответствии с SEQ ID NO: 14; хвост поли-А длиной около 80 пА	осуществления E5	осуществления E6
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 14; хвост поли-А длиной около 70 пА	Вариант осуществления E7	Вариант осуществления E8
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 14; хвост поли-А длиной около 60 пА	Вариант осуществления E9	Вариант осуществления E10
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 14; хвост поли-А длиной около 50 пА	Вариант осуществления E11	Вариант осуществления E12
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 14; хвост поли-А длиной около 40 пА	Вариант осуществления E13	Вариант осуществления E14
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 14; хвост поли-А длиной около 30 пА	Вариант осуществления E15	Вариант осуществления E16
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 14; хвост поли-А длиной около 20 пА	Вариант осуществления E17	Вариант осуществления E18
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 14; хвост поли-А длиной около 80-100 пА	Вариант осуществления E19	Вариант осуществления E20
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 14; хвост поли-А длиной около 70-90 пА	Вариант осуществления E21	Вариант осуществления E22
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 14; хвост поли-А длиной около 60-80 пА	Вариант осуществления E23	Вариант осуществления E24
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 14; хвост поли-А длиной около 50-70 пА	Вариант осуществления E25	Вариант осуществления E26
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 14; хвост поли-А длиной около 40-60 пА	Вариант осуществления E27	Вариант осуществления E28
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 14; хвост поли-А длиной около 30-50 пА	Вариант осуществления E29	Вариант осуществления E30
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 14; хвост поли-А длиной около 20-40 пА	Вариант осуществления E31	Вариант осуществления E32
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 14; хвост поли-А длиной около 10-30 пА	Вариант осуществления E33	Вариант осуществления E34
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 15; хвост поли-А длиной около 100 пА	Вариант осуществления E35	Вариант осуществления E36

[illegible]

	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТТТА».	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТТТТ».
хвост поли-А длиной около 10-30 пА		

[00312] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора полимеразы T7; (ii) лидерную последовательность с соответствии с SEQ ID NO: 15; (iii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' последовательности рибозима типа «пистолет» в соответствии с SEQ ID NO: 18; (iv) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном CVA21; (v) хвост поли-А (*например*, хвост поли-А длиной около 70 п.н., около 60-80 п.н. или около 50-90 п.н.) и (vi) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции BsmBI.

[00313] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора полимеразы T7; (ii) лидерную последовательность с соответствии с SEQ ID NO: 15; (iii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' последовательности рибозима типа «пистолет» в соответствии с SEQ ID NO: 18; (iv) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном CVA21; (v) хвост поли-А (*например*, хвост поли-А длиной около 70 п.н., около 60-80 п.н. или около 50-90 п.н.) и (vi) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции BsaI.

[00314] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит полинуклеотид ДНК, который кодирует вирусный геном штамма CVA21-KY и содержит или состоит из последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид ДНК, кодирующий вирусный геном штамма CVA21-KY, содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 20.

[00315] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит полинуклеотид ДНК, который кодирует

вирусный геном штамма CVA21-KY и содержит или состоит из последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 93. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид ДНК, кодирующий вирусный геном штамма CVA21-KY, содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 93.

[00316] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит полинуклеотид ДНК, который кодирует вирусный геном штамма CVA21-EF и содержит или состоит из последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид ДНК, кодирующий вирусный геном штамма CVA21-EF, содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 21.

[00317] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит полинуклеотид ДНК, который кодирует вирусный геном штамма CVA21-EF и содержит или состоит из последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 95. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид ДНК, кодирующий вирусный геном штамма CVA21-EF, содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 95.

[00318] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит полинуклеотид ДНК, который кодирует вирусный геном штамма CVA21-Kuykendall и содержит или состоит из последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид ДНК, кодирующий вирусный геном штамма CVA21-Kuykendall, содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере

мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 22.

[00319] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит полинуклеотид ДНК, который кодирует вирусный геном штамма CVA21-Kuykendall и содержит или состоит из последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 94. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид ДНК, кодирующий вирусный геном штамма CVA21-Kuykendall, содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 94.

[00320] В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном представляет собой геном вируса долины Сенека (SVV).

[00321] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора (*например*, промотор полимеразы T7); (ii) необязательную лидерную последовательность; (iii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' последовательности рибозима типа «пистолет» (*например*, рибозим типа «пистолет» из *P. Polytuxa* или его вариант); (iv) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном; (v) хвост поли-А (*например*, длиной около 20-80 п.н. или длиной около 30-70 п.н.) и (vi) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции (*например*, для фермента рестрикции SapI или BsaI).

[00322] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора (*например*, промотор полимеразы T7); (ii) лидерную последовательность (*например*, любую из SEQ ID NO: 53-60 и 62-63); (iii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' последовательности рибозима типа «пистолет» (*например*, в соответствии с SEQ ID NO: 64 или 65 или их вариант); (iv) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном SVV; (v) хвост поли-А (*например*, длиной около 20-80 п.н. или длиной около 30-70 п.н.) и (vi) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции SapI.

[00323] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора (*например*, промотор полимеразы T7); (ii) лидерную последовательность (*например*, любую из SEQ ID NO: 53-60 и 62-63); (iii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' последовательности рибозима типа «пистолет» (*например*, в соответствии с SEQ ID NO: 64 или 65; (iv) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном SVV; (v) хвост поли-А (*например*, длиной около 20-80 п.н. или длиной около 30-70 п.н.), и (vi) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции BsaI.

[00324] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит 3' сайт распознавания ферментом рестрикции SapI после хвоста поли-А и не содержит сайт распознавания ферментом рестрикции SapI в полинуклеотиде, кодирующем синтетический РНК-вирусный геном SVV.

[00325] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит 3' сайт распознавания ферментом рестрикции BsaI после хвоста поли-А и не содержит сайт распознавания ферментом рестрикции BsaI в полинуклеотиде, кодирующем синтетический РНК-вирусный геном SVV.

[00326] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора (*например*, промотор полимеразы T7); (ii) лидерную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 53–60 и 62–63; (iii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' последовательности рибозима типа «пистолет»; (iv) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном SVV; (v) хвост поли-А и (vi) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции SapI, где комбинация лидерной последовательности, 5' последовательности рибозима типа «пистолет» и хвоста поли-А выбрана из одного из вариантов осуществления S1-S340, представленных в Таблице 5В ниже.

[00327] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора (*например*, промотор полимеразы T7); (ii) лидерную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 53–60 и 62–63; (iii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' последовательности рибозима типа «пистолет»; (iv) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном SVV;

(v) хвост поли-А и (vi) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции BsaI, где комбинация лидерной последовательности, 5' последовательности рибозима типа «пистолет» и хвоста поли-А выбрана из одного из вариантов осуществления S1-S340, представленных в Таблице 5В ниже.

Таблица 5В: Неограничивающие варианты осуществления лидерной последовательности, 5'-рибозимной последовательности и хвоста поли-А в матрице ДНК для экспрессии вирусного генома SVV

	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТCAA».	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «TTAA».
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 53; хвост поли-А длиной около 100 пА	Вариант осуществления S1	Вариант осуществления S2
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 53; хвост поли-А длиной около 90 пА	Вариант осуществления S3	Вариант осуществления S4
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 53; хвост поли-А длиной около 80 пА	Вариант осуществления S5	Вариант осуществления S6
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 53; хвост поли-А длиной около 70 пА	Вариант осуществления S7	Вариант осуществления S8
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 53; хвост поли-А длиной около 60 пА	Вариант осуществления S9	Вариант осуществления S10
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 53; хвост поли-А длиной около 50 пА	Вариант осуществления S11	Вариант осуществления S12
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 53; хвост поли-А длиной около 40 пА	Вариант осуществления S13	Вариант осуществления S14
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 53; хвост поли-А длиной около 30 пА	Вариант осуществления S15	Вариант осуществления S16
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 53; хвост поли-А длиной около 20 пА	Вариант осуществления S17	Вариант осуществления S18
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 53; хвост поли-А длиной около 80-100 пА	Вариант осуществления S19	Вариант осуществления S20
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 53; хвост поли-А длиной около 70-90 пА	Вариант осуществления S21	Вариант осуществления S22

	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТCAA».	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТТАА».
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 53; хвост поли-А длиной около 60-80 пА	Вариант осуществления S23	Вариант осуществления S24
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 53; хвост поли-А длиной около 50-70 пА	Вариант осуществления S25	Вариант осуществления S26
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 53; хвост поли-А длиной около 40-60 пА	Вариант осуществления S27	Вариант осуществления S28
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 53; хвост поли-А длиной около 30-50 пА	Вариант осуществления S29	Вариант осуществления S30
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 53; хвост поли-А длиной около 20-40 пА	Вариант осуществления S31	Вариант осуществления S32
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 53; хвост поли-А длиной около 10-30 пА	Вариант осуществления S33	Вариант осуществления S34
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 54; хвост поли-А длиной около 100 пА	Вариант осуществления S35	Вариант осуществления S36
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 54; хвост поли-А длиной около 90 пА	Вариант осуществления S37	Вариант осуществления S38
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 54; хвост поли-А длиной около 80 пА	Вариант осуществления S39	Вариант осуществления S40
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 54; хвост поли-А длиной около 70 пА	Вариант осуществления S41	Вариант осуществления S42
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 54; хвост поли-А длиной около 60 пА	Вариант осуществления S43	Вариант осуществления S44
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 54; хвост поли-А длиной около 50 пА	Вариант осуществления S45	Вариант осуществления S46
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 54; хвост поли-А длиной около 40 пА	Вариант осуществления S47	Вариант осуществления S48
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 54; хвост поли-А длиной около 30 пА	Вариант осуществления S49	Вариант осуществления S50
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 54; хвост поли-А длиной около 20 пА	Вариант осуществления S51	Вариант осуществления S52

	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТCAA».	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТТАА».
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 54; хвост поли-А длиной около 80-100 пА	Вариант осуществления S53	Вариант осуществления S54
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 54; хвост поли-А длиной около 70-90 пА	Вариант осуществления S55	Вариант осуществления S56
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 54; хвост поли-А длиной около 60-80 пА	Вариант осуществления S57	Вариант осуществления S58
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 54; хвост поли-А длиной около 50-70 пА	Вариант осуществления S59	Вариант осуществления S60
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 54; хвост поли-А длиной около 40-60 пА	Вариант осуществления S61	Вариант осуществления S62
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 54; хвост поли-А длиной около 30-50 пА	Вариант осуществления S63	Вариант осуществления S64
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 54; хвост поли-А длиной около 20-40 пА	Вариант осуществления S65	Вариант осуществления S66
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 54; хвост поли-А длиной около 10-30 пА	Вариант осуществления S67	Вариант осуществления S68
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 55; хвост поли-А длиной около 100 пА	Вариант осуществления S69	Вариант осуществления S70
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 55; хвост поли-А длиной около 90 пА	Вариант осуществления S71	Вариант осуществления S72
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 55; хвост поли-А длиной около 80 пА	Вариант осуществления S73	Вариант осуществления S74
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 55; хвост поли-А длиной около 70 пА	Вариант осуществления S75	Вариант осуществления S76
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 55; хвост поли-А длиной около 60 пА	Вариант осуществления S77	Вариант осуществления S78
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 55; хвост поли-А длиной около 50 пА	Вариант осуществления S79	Вариант осуществления S80
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 55; хвост поли-А длиной около 40 пА	Вариант осуществления S81	Вариант осуществления S82

	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТCAA».	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТТАА».
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 55; хвост поли-А длиной около 30 пА	Вариант осуществления S83	Вариант осуществления S84
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 55; хвост поли-А длиной около 20 пА	Вариант осуществления S85	Вариант осуществления S86
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 55; хвост поли-А длиной около 80-100 пА	Вариант осуществления S87	Вариант осуществления S88
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 55; хвост поли-А длиной около 70-90 пА	Вариант осуществления S89	Вариант осуществления S90
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 55; хвост поли-А длиной около 60-80 пА	Вариант осуществления S91	Вариант осуществления S92
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 55; хвост поли-А длиной около 50-70 пА	Вариант осуществления S93	Вариант осуществления S94
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 55; хвост поли-А длиной около 40-60 пА	Вариант осуществления S95	Вариант осуществления S96
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 55; хвост поли-А длиной около 30-50 пА	Вариант осуществления S97	Вариант осуществления S98
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 55; хвост поли-А длиной около 20-40 пА	Вариант осуществления S99	Вариант осуществления S100
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 55; хвост поли-А длиной около 10-30 пА	Вариант осуществления S101	Вариант осуществления S102
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56; хвост поли-А длиной около 100 пА	Вариант осуществления S103	Вариант осуществления S104
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56; хвост поли-А длиной около 90 пА	Вариант осуществления S105	Вариант осуществления S106
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56; хвост поли-А длиной около 80 пА	Вариант осуществления S107	Вариант осуществления S108
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56; хвост поли-А длиной около 70 пА	Вариант осуществления S109	Вариант осуществления S110
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56; хвост поли-А длиной около 60 пА	Вариант осуществления S111	Вариант осуществления S112

	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТCAA».	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТТАА».
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56; хвост поли-А длиной около 50 пА	Вариант осуществления S113	Вариант осуществления S114
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56; хвост поли-А длиной около 40 пА	Вариант осуществления S115	Вариант осуществления S116
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56; хвост поли-А длиной около 30 пА	Вариант осуществления S117	Вариант осуществления S118
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56; хвост поли-А длиной около 20 пА	Вариант осуществления S119	Вариант осуществления S120
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56; хвост поли-А длиной около 80-100 пА	Вариант осуществления S121	Вариант осуществления S122
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56; хвост поли-А длиной около 70-90 пА	Вариант осуществления S123	Вариант осуществления S124
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56; хвост поли-А длиной около 60-80 пА	Вариант осуществления S125	Вариант осуществления S126
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56; хвост поли-А длиной около 50-70 пА	Вариант осуществления S127	Вариант осуществления S128
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56; хвост поли-А длиной около 40-60 пА	Вариант осуществления S129	Вариант осуществления S130
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56; хвост поли-А длиной около 30-50 пА	Вариант осуществления S131	Вариант осуществления S132
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56; хвост поли-А длиной около 20-40 пА	Вариант осуществления S133	Вариант осуществления S134
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56; хвост поли-А длиной около 10-30 пА	Вариант осуществления S135	Вариант осуществления S136
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 57; хвост поли-А длиной около 100 пА	Вариант осуществления S137	Вариант осуществления S138
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 57; хвост поли-А длиной около 90 пА	Вариант осуществления S139	Вариант осуществления S140
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 57; хвост поли-А длиной около 80 пА	Вариант осуществления S141	Вариант осуществления S142

	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТCAA».	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТТАА».
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 57; хвост поли-А длиной около 70 пА	Вариант осуществления S143	Вариант осуществления S144
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 57; хвост поли-А длиной около 60 пА	Вариант осуществления S145	Вариант осуществления S146
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 57; хвост поли-А длиной около 50 пА	Вариант осуществления S147	Вариант осуществления S148
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 57; хвост поли-А длиной около 40 пА	Вариант осуществления S149	Вариант осуществления S150
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 57; хвост поли-А длиной около 30 пА	Вариант осуществления S151	Вариант осуществления S152
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 57; хвост поли-А длиной около 20 пА	Вариант осуществления S153	Вариант осуществления S154
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 57; хвост поли-А длиной около 80-100 пА	Вариант осуществления S155	Вариант осуществления S156
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 57; хвост поли-А длиной около 70-90 пА	Вариант осуществления S157	Вариант осуществления S158
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 57; хвост поли-А длиной около 60-80 пА	Вариант осуществления S159	Вариант осуществления S160
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 57; хвост поли-А длиной около 50-70 пА	Вариант осуществления S161	Вариант осуществления S162
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 57; хвост поли-А длиной около 40-60 пА	Вариант осуществления S163	Вариант осуществления S164
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 57; хвост поли-А длиной около 30-50 пА	Вариант осуществления S165	Вариант осуществления S166
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 57; хвост поли-А длиной около 20-40 пА	Вариант осуществления S167	Вариант осуществления S168
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 57; хвост поли-А длиной около 10-30 пА	Вариант осуществления S169	Вариант осуществления S170
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 58; хвост поли-А длиной около 100 пА	Вариант осуществления S171	Вариант осуществления S172

	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТCAA».	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТТАА».
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 58; хвост поли-А длиной около 90 пА	Вариант осуществления S173	Вариант осуществления S174
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 58; хвост поли-А длиной около 80 пА	Вариант осуществления S175	Вариант осуществления S176
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 58; хвост поли-А длиной около 70 пА	Вариант осуществления S177	Вариант осуществления S178
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 58; хвост поли-А длиной около 60 пА	Вариант осуществления S179	Вариант осуществления S180
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 58; хвост поли-А длиной около 50 пА	Вариант осуществления S181	Вариант осуществления S182
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 58; хвост поли-А длиной около 40 пА	Вариант осуществления S183	Вариант осуществления S184
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 58; хвост поли-А длиной около 30 пА	Вариант осуществления S185	Вариант осуществления S186
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 58; хвост поли-А длиной около 20 пА	Вариант осуществления S187	Вариант осуществления S188
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 58; хвост поли-А длиной около 80-100 пА	Вариант осуществления S189	Вариант осуществления S190
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 58; хвост поли-А длиной около 70-90 пА	Вариант осуществления S191	Вариант осуществления S192
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 58; хвост поли-А длиной около 60-80 пА	Вариант осуществления S193	Вариант осуществления S194
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 58; хвост поли-А длиной около 50-70 пА	Вариант осуществления S195	Вариант осуществления S196
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 58; хвост поли-А длиной около 40-60 пА	Вариант осуществления S197	Вариант осуществления S198
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 58; хвост поли-А длиной около 30-50 пА	Вариант осуществления S199	Вариант осуществления S200
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 58; хвост поли-А длиной около 20-40 пА	Вариант осуществления S201	Вариант осуществления S202

	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТCAA».	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТТАА».
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 58; хвост поли-А длиной около 10-30 пА	Вариант осуществления S203	Вариант осуществления S204
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 59; хвост поли-А длиной около 100 пА	Вариант осуществления S205	Вариант осуществления S206
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 59; хвост поли-А длиной около 90 пА	Вариант осуществления S207	Вариант осуществления S208
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 59; хвост поли-А длиной около 80 пА	Вариант осуществления S209	Вариант осуществления S210
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 59; хвост поли-А длиной около 70 пА	Вариант осуществления S211	Вариант осуществления S212
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 59; хвост поли-А длиной около 60 пА	Вариант осуществления S213	Вариант осуществления S214
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 59; хвост поли-А длиной около 50 пА	Вариант осуществления S215	Вариант осуществления S216
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 59; хвост поли-А длиной около 40 пА	Вариант осуществления S217	Вариант осуществления S218
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 59; хвост поли-А длиной около 30 пА	Вариант осуществления S219	Вариант осуществления S220
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 59; хвост поли-А длиной около 20 пА	Вариант осуществления S221	Вариант осуществления S222
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 59; хвост поли-А длиной около 80-100 пА	Вариант осуществления S223	Вариант осуществления S224
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 59; хвост поли-А длиной около 70-90 пА	Вариант осуществления S225	Вариант осуществления S226
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 59; хвост поли-А длиной около 60-80 пА	Вариант осуществления S227	Вариант осуществления S228
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 59; хвост поли-А длиной около 50-70 пА	Вариант осуществления S229	Вариант осуществления S230
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 59; хвост поли-А длиной около 40-60 пА	Вариант осуществления S231	Вариант осуществления S232

	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТCAA».	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТТАА».
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 59; хвост поли-А длиной около 30-50 пА	Вариант осуществления S233	Вариант осуществления S234
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 59; хвост поли-А длиной около 20-40 пА	Вариант осуществления S235	Вариант осуществления S236
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 59; хвост поли-А длиной около 10-30 пА	Вариант осуществления S237	Вариант осуществления S238
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 60; хвост поли-А длиной около 100 пА	Вариант осуществления S239	Вариант осуществления S240
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 60; хвост поли-А длиной около 90 пА	Вариант осуществления S241	Вариант осуществления S242
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 60; хвост поли-А длиной около 80 пА	Вариант осуществления S243	Вариант осуществления S244
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 60; хвост поли-А длиной около 70 пА	Вариант осуществления S245	Вариант осуществления S246
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 60; хвост поли-А длиной около 60 пА	Вариант осуществления S247	Вариант осуществления S248
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 60; хвост поли-А длиной около 50 пА	Вариант осуществления S249	Вариант осуществления S250
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 60; хвост поли-А длиной около 40 пА	Вариант осуществления S251	Вариант осуществления S252
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 60; хвост поли-А длиной около 30 пА	Вариант осуществления S253	Вариант осуществления S254
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 60; хвост поли-А длиной около 20 пА	Вариант осуществления S255	Вариант осуществления S256
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 60; хвост поли-А длиной около 80-100 пА	Вариант осуществления S257	Вариант осуществления S258
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 60; хвост поли-А длиной около 70-90 пА	Вариант осуществления S259	Вариант осуществления S260
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 60; хвост поли-А длиной около 60-80 пА	Вариант осуществления S261	Вариант осуществления S262

	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТCAA».	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТТАА».
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 60; хвост поли-А длиной около 50-70 пА	Вариант осуществления S263	Вариант осуществления S264
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 60; хвост поли-А длиной около 40-60 пА	Вариант осуществления S265	Вариант осуществления S266
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 60; хвост поли-А длиной около 30-50 пА	Вариант осуществления S267	Вариант осуществления S268
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 60; хвост поли-А длиной около 20-40 пА	Вариант осуществления S269	Вариант осуществления S270
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 60; хвост поли-А длиной около 10-30 пА	Вариант осуществления S271	Вариант осуществления S272
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 62; хвост поли-А длиной около 100 пА	Вариант осуществления S273	Вариант осуществления S274
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 62; хвост поли-А длиной около 90 пА	Вариант осуществления S275	Вариант осуществления S276
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 62; хвост поли-А длиной около 80 пА	Вариант осуществления S277	Вариант осуществления S278
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 62; хвост поли-А длиной около 70 пА	Вариант осуществления S279	Вариант осуществления S280
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 62; хвост поли-А длиной около 60 пА	Вариант осуществления S281	Вариант осуществления S282
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 62; хвост поли-А длиной около 50 пА	Вариант осуществления S283	Вариант осуществления S284
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 62; хвост поли-А длиной около 40 пА	Вариант осуществления S285	Вариант осуществления S286
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 62; хвост поли-А длиной около 30 пА	Вариант осуществления S287	Вариант осуществления S288
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 62; хвост поли-А длиной около 20 пА	Вариант осуществления S289	Вариант осуществления S290
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 62; хвост поли-А длиной около 80-100 пА	Вариант осуществления S291	Вариант осуществления S292

	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТCAA».	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТТАА».
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 62; хвост поли-А длиной около 70-90 пА	Вариант осуществления S293	Вариант осуществления S294
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 62; хвост поли-А длиной около 60-80 пА	Вариант осуществления S295	Вариант осуществления S296
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 62; хвост поли-А длиной около 50-70 пА	Вариант осуществления S297	Вариант осуществления S298
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 62; хвост поли-А длиной около 40-60 пА	Вариант осуществления S299	Вариант осуществления S300
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 62; хвост поли-А длиной около 30-50 пА	Вариант осуществления S301	Вариант осуществления S302
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 62; хвост поли-А длиной около 20-40 пА	Вариант осуществления S303	Вариант осуществления S304
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 62; хвост поли-А длиной около 10-30 пА	Вариант осуществления S305	Вариант осуществления S306
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 63; хвост поли-А длиной около 100 пА	Вариант осуществления S307	Вариант осуществления S308
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 63; хвост поли-А длиной около 90 пА	Вариант осуществления S309	Вариант осуществления S310
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 63; хвост поли-А длиной около 80 пА	Вариант осуществления S311	Вариант осуществления S312
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 63; хвост поли-А длиной около 70 пА	Вариант осуществления S313	Вариант осуществления S314
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 63; хвост поли-А длиной около 60 пА	Вариант осуществления S315	Вариант осуществления S316
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 63; хвост поли-А длиной около 50 пА	Вариант осуществления S317	Вариант осуществления S318
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 63; хвост поли-А длиной около 40 пА	Вариант осуществления S319	Вариант осуществления S320
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 63; хвост поли-А длиной около 30 пА	Вариант осуществления S321	Вариант осуществления S322

	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТCAA».	5' рибозим типа «пистолет» с мотивом P2 «ТТАА».
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 63; хвост поли-А длиной около 20 пА	Вариант осуществления S323	Вариант осуществления S324
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 63; хвост поли-А длиной около 80-100 пА	Вариант осуществления S325	Вариант осуществления S326
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 63; хвост поли-А длиной около 70-90 пА	Вариант осуществления S327	Вариант осуществления S328
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 63; хвост поли-А длиной около 60-80 пА	Вариант осуществления S329	Вариант осуществления S330
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 63; хвост поли-А длиной около 50-70 пА	Вариант осуществления S331	Вариант осуществления S332
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 63; хвост поли-А длиной около 40-60 пА	Вариант осуществления S333	Вариант осуществления S334
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 63; хвост поли-А длиной около 30-50 пА	Вариант осуществления S335	Вариант осуществления S336
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 63; хвост поли-А длиной около 20-40 пА	Вариант осуществления S337	Вариант осуществления S338
Лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 63; хвост поли-А длиной около 10-30 пА	Вариант осуществления S339	Вариант осуществления S340

[00328] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора полимеразы T7; (ii) лидерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 53; (iii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' последовательности рибозима типа «пистолет» в соответствии с SEQ ID NO: 64; (iv) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном SVV; (v) хвост поли-А (*например*, хвост поли-А длиной около 70 п.н., около 60-80 п.н. или около 50-90 п.н.) и (vi) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции SapI.

[00329] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора полимеразы T7; (ii) лидерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 53; (iii) 5'

соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' последовательности рибозима типа «пистолет» в соответствии с SEQ ID NO: 64; (iv) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном SVV; (v) хвост поли-А (например, хвост поли-А длиной около 70 п.н., около 60-80 п.н. или около 50-90 п.н.) и (vi) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции BsaI.

[00330] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора полимеразы T7; (ii) лидерную последовательность с соответствии с SEQ ID NO: 58; (iii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' последовательности рибозима типа «пистолет» в соответствии с SEQ ID NO: 64; (iv) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном SVV; (v) хвост поли-А (например, хвост поли-А длиной около 70 п.н., около 60-80 п.н. или около 50-90 п.н.) и (vi) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции SapI.

[00331] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора полимеразы T7; (ii) лидерную последовательность с соответствии с SEQ ID NO: 58; (iii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' последовательности рибозима типа «пистолет» в соответствии с SEQ ID NO: 64; (iv) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном SVV; (v) хвост поли-А (например, хвост поли-А длиной около 70 п.н., около 60-80 п.н. или около 50-90 п.н.) и (vi) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции BsaI.

[00332] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора полимеразы T7; (ii) лидерную последовательность с соответствии с SEQ ID NO: 58; (iii) 5' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' последовательности рибозима типа «пистолет» в соответствии с SEQ ID NO: 64; (iv) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном SVV; (v) хвост поли-А длиной около 70 п.н. и (vi) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции SapI.

[00333] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит от 5' к 3': (i) последовательность промотора полимеразы T7; (ii) лидерную последовательность с соответствии с SEQ ID NO: 58; (iii) 5'

соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из 5' последовательности рибозима типа «пистолет» в соответствии с SEQ ID NO: 64; (iv) полинуклеотид, кодирующий синтетический РНК-вирусный геном SVV; (v) хвост поли-А длиной около 70 п.н и (vi) 3' соединительную последовательность расщепления, содержащую или состоящую из сайта распознавания ферментом рестрикции BsaI.

[00334] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит полинуклеотид ДНК, который кодирует вирусный геном SVV и содержит или состоит из последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид ДНК, кодирующий вирусный геном штамма SVV, содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 52.

[00335] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК (*например*, матрица ДНК) содержит полинуклеотид ДНК, который кодирует вирусный геном SVV и содержит или состоит из последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 92. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид ДНК, кодирующий вирусный геном штамма SVV, содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% (включая все диапазоны и поддиапазоны между ними) идентичной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 92.

[00336] Типичные варианты осуществления матриц ДНК, кодирующих геномы SVV или CVA, представлены ниже в Таблице 18.

Таблица 18: Типичные структуры матриц ДНК

Промотор	Лидер	5'-JCS	Кодируемый геном	Хвост поли А	3'-JCS	Полная матрица
Промотор T7	SEQ ID NO: 15 (CVA21-L6)	SEQ ID NO: 18	Штамм CVA21 KY	70 AA	SEQ ID NO: 86 (BsmBI)	SEQ ID NO: 20
Промотор T7	SEQ ID NO: 15 (CVA21-L6)	SEQ ID NO: 18	Штамм CVA21 EF	70 AA	SEQ ID NO: 86 (BsmBI)	SEQ ID NO: 21
Промотор T7	SEQ ID NO: 15 (CVA21-L6)	SEQ ID NO: 18	Штамм CVA21 Kuykendall	70 AA	SEQ ID NO: 86 (BsmBI)	SEQ ID NO: 22

	L6)	18				
Промотор T7	SEQ ID NO: 15 (CVA21-L6)	SEQ ID NO: 18	Штамм CVA21 KY	70 AA	SEQ ID NO: 90 (BsaI)	SEQ ID NO: 93
Промотор T7	SEQ ID NO: 15 (CVA21-L6)	SEQ ID NO: 18	Штамм CVA21 EF	70 AA	SEQ ID NO: 90 (BsaI)	SEQ ID NO: 95
Промотор T7	SEQ ID NO: 15 (CVA21-L6)	SEQ ID NO: 18	Штамм CVA21 Kuykendall	70 AA	SEQ ID NO: 90 (BsaI)	SEQ ID NO: 94
Промотор T7	SEQ ID NO: 53 (SVV-L0)	SEQ ID NO: 64	SVV	70 AA	SEQ ID NO: 82 (SapI)	SEQ ID NO: 52
Промотор T7	SEQ ID NO: 58 (SVV-L5)	SEQ ID NO: 64	SVV	70 AA	SEQ ID NO: 82 (SapI)	SEQ ID NO: 92

Частицы, содержащие синтетические РНК-геномы

[00337] В некоторых вариантах осуществления синтетические РНК-геномы, описанные в данном документе, заключены в «частицы». Как используется в настоящем документе, частица относится к композиции вещества, полученной не из ткани, такой как липосомы, липоплексы, наночастицы, нанокапсулы, микрочастицы, микросферы, липидные частицы, экзосомы, везикулы и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления частицы являются небелковыми и неиммуногенными. В таких вариантах осуществления инкапсуляция описанных в данном документе синтетических РНК-геномов позволяет доставлять вирусный геном без индукции системного противовирусного иммунного ответа и смягчает действие нейтрализующих противовирусных антител. Кроме того, инкапсуляция синтетических РНК-геномов, описанных в данном документе, защищает геномы от деградации и облегчает введение в клетки-мишени-хозяева. В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложена наночастица, содержащая синтетический РНК-геном, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления наночастица представляет собой липидную наночастицу. В некоторых вариантах осуществления наночастица дополнительно содержит вторую молекулу РНК, кодирующую молекулу полезной нагрузки.

[00338] В некоторых вариантах осуществления частица является биоразлагаемой в организме субъекта. В таких вариантах осуществления множество доз

частиц может быть введено субъекту без накопления частиц в субъекте. Примеры подходящих частиц включают частицы полистирола, частицы полимера молочной и гликолевой кислоты PLGA, англ.: poly(lactic-co-glycolic acid), катионные полимерные частицы на основе полипептидов, частицы циклодекстрина, хитозан, частицы N,N,N-триметилхитозана, частицы на основе липидов, частицы полимера β -аминоэфира, частицы низкомолекулярного полиэтиленimina, частицы полифосфозфира, частицы дисульфидно-сшитого полимера, частицы полиамидамина, частицы полиэтиленimina (PEI, англ.: polyethylenimine) и стабилизированные частицы полипропиленсульфида PLURIONICS.

[00339] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, заключены в неорганические частицы. В некоторых вариантах осуществления неорганические частицы представляют собой золотые наночастицы (ЗНЧ), золотые наностержни (ЗНС), магнитные наночастицы (МНЧ), магнитные нанотрубки (МНТ), углеродные нанорога (УНР), углеродные фуллерены, углеродные нанотрубки (УНТ), наночастицы фосфата кальция (НСФК), наночастицы мезопористого кремнезема (НЧМК), нанотрубки кремнезема (НТК) или звездообразные полые наночастицы кремнезема (ЗПНЧ).

[00340] Предпочтительно, частицы, описанные в данном документе, имеют наноскопический размер, чтобы повысить растворимость, избежать клиренса фагоцитирующими клетками и возможных осложнений, вызванных агрегацией *in vivo*, и облегчить пиноцитоз. В некоторых вариантах осуществления частица имеет средний диаметр менее около 1000 нм. В некоторых вариантах осуществления частица имеет средний диаметр менее 500 нм. В некоторых вариантах осуществления частица имеет средний диаметр от около 30 до около 100 нм, от около 50 до около 100 нм или от около 75 до около 100 нм. В некоторых вариантах осуществления частица имеет средний диаметр от около 30 до около 75 нм или от около 30 до около 50 нм. В некоторых вариантах осуществления частица имеет средний диаметр от около 100 до около 500 нм. В некоторых вариантах осуществления частица имеет средний диаметр от около 200 до 400 нм. В некоторых вариантах осуществления частицы имеют средний размер около 350 нм.

Экзосомы

[00341] В некоторых вариантах осуществления синтетические РНК-геномы, описанные в данном документе, заключены в экзосомы. Экзосомы - это небольшие мембранные везикулы эндоцитарного происхождения, которые высвобождаются во внеклеточную среду после слияния мультивезикулярных тел с плазматической мембраной родительской клетки (*например*, клетки, из которой высвобождается экзосома, также называемой в данном документе клеткой-донором). Поверхность экзосомы включает

липидный бислой, полученный из клеточной мембраны родительской клетки, и может дополнительно включать мембранные белки, экспрессированные на поверхности родительской клетки. В некоторых вариантах осуществления экзосомы могут также содержать цитозоль из родительской клетки. Экзосомы производятся многими различными типами клеток, включая эпителиальные клетки, В- и Т-лимфоциты, тучные клетки (МК, англ.: mast cells) и дендритные клетки (ДК), и были обнаружены в плазме крови, моче, жидкости бронхоальвеолярного лаважа, эпителиальных клетках кишечника и опухолевых тканях. Поскольку состав экзосом зависит от типа родительской клетки, из которой они получены, не существует «специфических для экзосом» белков. Однако многие экзосомы включают белки, связанные с внутриклеточными везикулами, из которых экзосома произошла в родительских клетках (*например*, белки, связанные с эндосомами и лизосомами и/или экспрессируемые ими). Например, экзосомы могут быть обогащены молекулами презентации антигенов, такими как главный комплекс гистосовместимости I и II (ГКГС-I и ГКГС-II), тетраспанинами (*например*, CD63), несколькими белками теплового шока, компонентами цитоскелета, такими как актины и тубулины, белки, участвующие в слиянии внутриклеточных мембран, межклеточном взаимодействии (*например*, CD54), белки-переносчики сигнала и цитозольные ферменты.

[00342] Экзосомы могут опосредовать перенос клеточных белков из одной клетки (*например*, родительской клетки) в клетку-мишень или клетку-реципиент путем слияния мембраны экзосомы с плазматической мембраной клетки-мишени. Таким образом, модификация материала, инкапсулированного экзосомой, обеспечивает механизм, с помощью которого экзогенные агенты, такие как полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, могут быть введены в клетку-мишень. Экзосомы, которые были модифицированы для содержания одного или более экзогенных агентов (*например*, полинуклеотида, описанного в настоящем документе), называются в настоящем документе «модифицированными экзосомами». В некоторых вариантах осуществления модифицированные экзосомы получают путем введения экзогенного агента (*например*, полинуклеотида, описанного в настоящем документе) в родительскую клетку. В таких вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота вводится в родительские клетки, продуцирующие экзосомы, таким образом, что сама экзогенная нуклеиновая кислота или транскрипт экзогенной нуклеиновой кислоты включается в модифицированные экзосомы, полученные из родительской клетки. Экзогенные нуклеиновые кислоты могут быть введены в родительскую клетку с помощью средств, известных в данной области техники, например, трансдукции, трансфекции, трансформации, электропорации и/или микроинъекции экзогенных нуклеиновых кислот.

[00343] В некоторых вариантах осуществления модифицированные экзосомы получают путем прямого введения синтетического РНК-генома, описанного в настоящем документе, в экзосому. В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-геном, описанный в настоящем документе, вводят в интактную экзосому. Термин «интактные экзосомы» означает экзосомы, содержащие белки и/или генетический материал, полученные из родительской клетки, из которой они были получены. Методы получения интактных экзосом известны в данной области техники (см., например, Alvarez-Erviti L. *et al.*, Nat Biotechnol. 2011 Apr; 29(4):34-5; Ohno S, *et al.*, Mol Ther 2013 Jan; 21(1):185-91 и публикацию Европейского патента № 2010663).

[00344] В конкретных вариантах осуществления синтетические РНК-геномы вводят в пустые экзосомы. Термин «пустые экзосомы» означают экзосомы, в которых отсутствуют белки и/или генетический материал (например, ДНК или РНК), полученные из родительской клетки. Методы получения пустых экзосом (например, не содержащих генетический материал родительских клеток) известны в данной области техники, включая УФ-облучение, мутацию/удаление эндогенных белков, которые опосредуют загрузку нуклеиновых кислот в экзосомы, а также электропорацию и химическую обработку для открытия пор в мембранах экзосом таким образом, что эндогенный генетический материал выходит из экзосомы через открытые поры. В некоторых вариантах осуществления пустые экзосомы получают путем открытия экзосом путем обработки водным раствором с рН от около 9 до около 14 для получения экзосомальных мембран, удаления внутривезикулярных компонентов (например, внутривезикулярных белков и/или нуклеиновых кислот) и повторной сборки экзосомальных мембран с образованием пустых экзосом. В некоторых вариантах осуществления внутрипузырные компоненты (например, внутривезикулярные белки и/или нуклеиновые кислоты) удаляют с помощью ультрацентрифугирования или ультрацентрифугирования в градиенте плотности. В некоторых вариантах осуществления мембраны собирают с помощью соникации, механической вибрации, экструзии через пористые мембраны, электрического тока или комбинации одного или более из этих методов. В конкретных вариантах осуществления мембраны собирают с помощью соникации.

[00345] В некоторых вариантах осуществления, загрузка интактных или пустых экзосом синтетическим РНК-геномом, описанным в настоящем документе, для получения модифицированной экзосомы может быть достигнута с помощью обычных методов молекулярной биологии, таких как *in vitro* трансформация, трансфекция и/или микроинъекция. В некоторых вариантах осуществления экзогенные агенты (например, полинуклеотиды, описанные в настоящем документе) вводят непосредственно в

интактные или пустые экзосомы с помощью электропорации. В некоторых вариантах осуществления экзогенные агенты (*например*, полинуклеотиды, описанные в настоящем документе) вводят непосредственно в интактные или пустые экзосомы путем липофекции (*например*, трансфекции). Наборы для липофекции, подходящие для применения при получении экзосом в соответствии с настоящим изобретением, известны в данной области техники и коммерчески доступны (*например*, Реагент для трансфекции FuGENE[®] HD от Roche и ЛИПОФЕКТАМИН[™] 2000 от Invitrogen). В некоторых вариантах осуществления экзогенные агенты (*например*, полинуклеотиды, описанные в настоящем документе) вводят непосредственно в интактные или пустые экзосомы путем трансформации с использованием теплового шока. В таких вариантах осуществления экзосомы, выделенные из родительских клеток, охлаждают в присутствии двухвалентных катионов, таких как Ca^{2+} (в виде CaCl_2), чтобы пермеабилизовать экзосомальную мембрану. Затем экзосомы могут быть инкубированы с экзогенными нуклеиновыми кислотами и подвергнуты кратковременному тепловому шоку (*например*, инкубированы при 42°C в течение 30-120 секунд). В конкретных вариантах осуществления загрузка пустых экзосом экзогенными агентами (*например*, полинуклеотидами, описанными в настоящем документе) может быть достигнута путем смешивания или совместного инкубирования агентов с экзосомальными мембранами после удаления внутривезикулярных компонентов. Таким образом, модифицированные экзосомы, вновь собранные из экзосомальных мембран, будут включать экзогенные агенты во внутривезикулярном пространстве. Дополнительные методы получения инкапсулированных в экзосомы нуклеиновых кислот известны в данной области техники (*см.*, *например*, патенты США № 9889210; 9629929; и 9085778; международная публикации PCT № WO 2017/161010 и WO 2018/039119).

[00346] Экзосомы могут быть получены из множества различных родительских клеток, включая клеточные линии, клетки, полученные из костного мозга, и клетки, полученные из первичных образцов пациентов. Экзосомы, высвобожденные из родительских клеток, могут быть выделены из супернатантов культур родительских клеток способами, известными в данной области техники. Например, физические свойства экзосом могут быть использованы для их отделения от среды или другого исходного материала, включая отделение на основе электрического заряда (*например*, электрофоретическое разделение), размера (*например*, фильтрация, молекулярное просеивание и т.д.), плотности (*например*, обычное центрифугирование или в градиенте) и константы Сведберга (*например*, седиментация под воздействием внешней силы или без нее и т.д.). Альтернативно или дополнительно, выделение может быть основано на одном

или более биологических свойствах и включать методы, в которых могут использоваться поверхностные маркеры (*например*, для преципитации, обратимого связывания с твердой фазой, разделения FACS, специфического связывания с лигандом, неспецифического связывания с лигандом и т.д.). Анализ поверхностных белков экзосом может быть определен с помощью проточной цитометрии с использованием флуоресцентно меченых антител для связанных с экзосомой белков, таких как CD63. Дополнительные маркеры для характеристики экзосом описаны в международной публикации РСТ № WO 2017/161010. В дальнейших предполагаемых методах экзосомы также могут быть слиты с помощью химических и/или физических методов, включая ПЭГ-индуцированное слияние и/или ультразвуковое слияние.

[00347] В некоторых вариантах осуществления для выделения экзосом можно использовать эксклюзионную хроматографию. В некоторых вариантах осуществления экзосомы могут быть дополнительно выделены после хроматографического разделения методами центрифугирования (из одной или более фракций хроматографии), как это обычно известно в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления выделение экзосом может включать комбинации методов, которые включают дифференциальное центрифугирование, как описано ранее (см. Raposo, G. *et al.*, J. Exp. Med. 183, 1161-1172 (1996)), ультрацентрифугирование, мембранную фильтрацию по размеру, концентрирование и/или зональное центрифугирование, но не ограничиваются ими.

[00348] В некоторых вариантах осуществления экзосомальная мембрана включает один или более фосфолипидов, гликолипидов, жирных кислот, сфинголипидов, фосфоглицеридов, стерина, холестерина и фосфатидилсерина. Кроме того, мембрана может включать один или более полипептидов и один или более полисахаридов, таких как гликаны. Примерные композиции экзосомальных мембран и методы изменения относительного количества одного или более мембранных компонентов описаны в международной публикации РСТ № WO 2018/039119.

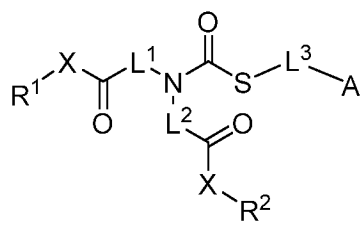
[00349] В некоторых вариантах осуществления частицы представляют собой экзосомы и имеют диаметр от около 30 до около 100 нм, от около 30 до около 200 нм или от около 30 до около 500 нм. В некоторых вариантах осуществления частицы являются экзосомами и имеют диаметр от около 10 нм до около 100 нм, от около 20 нм до около 100 нм, от около 30 нм до около 100 нм, от около 40 нм до около 100 нм, от около 50 нм до около 100 нм, от около 60 нм до около 100 нм, от около 70 нм до около 100 нм, от около 80 нм до около 100 нм, от около 90 нм до около 100 нм, от около 100 нм до около 200 нм, от около 100 нм до около 150 нм, от около 150 нм до около 200 нм, от около 100 нм до

около 250 нм, от около 250 нм до около 500 нм или от около 10 нм до около 1000 нм. В некоторых вариантах осуществления частицы представляют собой экзосомы и имеют диаметр от около 20 нм до 300 нм, от около 40 нм до 200 нм, от около 20 нм до 250 нм, от около 30 нм до 150 нм или от около 30 нм до 100 нм.

Соединения

Соединения формулы (I)

[00350] В различных вариантах осуществления, в данном документе представлены соединения формулы(I):



Формула (I)

или их фармацевтически приемлемые соли или сольваты, при этом:

A представляет собой $-N(CH_2R^{N1})(CH_2R^{N2})$ или 4-7-членное гетероциклическое кольцо, содержащее по меньшей мере один N, где 4-7-членное гетероциклическое кольцо необязательно замещено 0-6 R^3 ;

каждый X независимо представляет собой $-O-$, $-N(R^1)-$ или $-N(R^2)-$;

R^1 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенных C_1-C_{31} алифатических групп и стероида;

R^2 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенных C_1-C_{31} алифатических групп и стероида;

R^3 необязательно замещен C_1-C_6 алифатическими группами;

каждый из R^{N1} и R^{N2} независимо представляет собой водород, гидрокси- C_1-C_6 алкил, C_2-C_6 алкенил или C_3-C_7 циклоалкил;

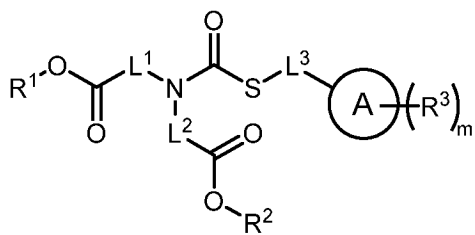
L^1 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенной C_1-C_{20} алкиленовой цепи и двухвалентной необязательно замещенной C_2-C_{20} алкениленовой цепи;

L^2 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенной C_1-C_{20} алкиленовой цепи и двухвалентной необязательно замещенной C_2-C_{20} алкениленовой цепи;

L^3 представляет собой связь, необязательно замещенную C_1-C_6 алкиленовую цепь или двухвалентный необязательно замещенный C_3-C_7 циклоалкилен.

[00351] В некоторых вариантах осуществления, когда A представляет собой $-N(CH_3)(CH_3)$ и X представляет собой O, L^3 не представляет собой C_1-C_6 алкиленовую цепь.

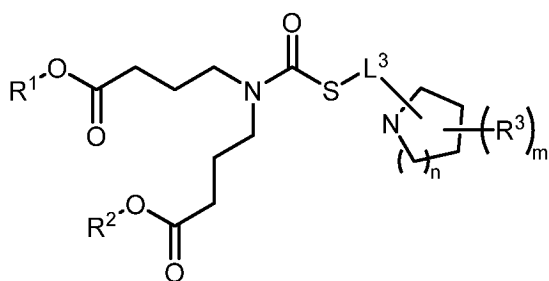
[00352] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает соединение формулы (I-a):



Формула (I-a)

или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где m равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, или 6.

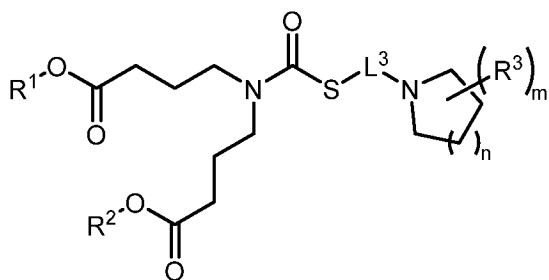
[00353] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает соединение формулы (I-b):



Формула (I-b)

или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где n равен 0, 1, 2 или 3; и m равен 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

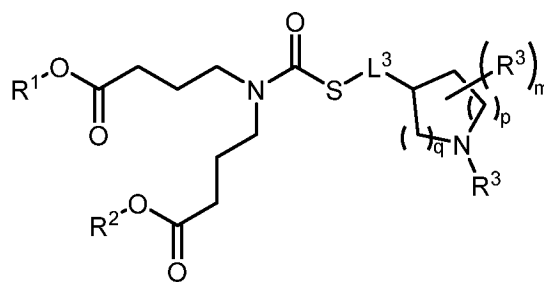
[00354] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает соединение формулы (I-bi):



Формула (I-bi)

или его фармацевтически приемлемую соль или сольват.

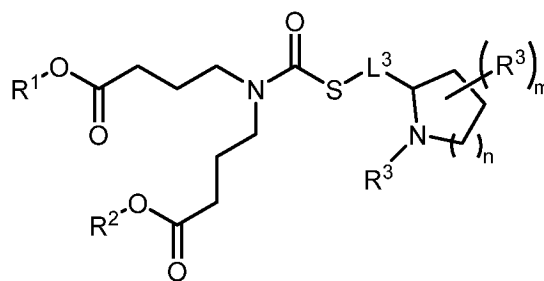
[00355] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает соединение формулы (I-bii):



Формула (I-bii)

или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где m равен 0, 1, 2 или 3; и каждый из p и q равен 0, 1, 2, или 3, и где $q + p$ меньше или равно 3.

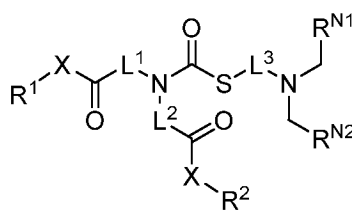
[00356] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает соединение формулы (I-biii):



Формула (I-biii)

или его фармацевтически приемлемую соль или сольват.

[00357] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает соединение формулы (I- c):



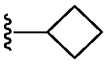
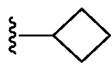
Формула (I-c)

или его фармацевтически приемлемую соль или сольват.

[00358] В некоторых вариантах осуществления A представляет собой $-N(CH_2R^{N1})(CH_2R^{N2})$ или необязательно замещенное 4-7-членное гетероциклическое кольцо, содержащее по меньшей мере один N .

[00359] В некоторых вариантах осуществления A представляет собой $-N(CH_2R^{N1})(CH_2R^{N2})$. В некоторых вариантах осуществления каждый из R^{N1} и R^{N2} независимо выбран из водорода, гидрокси- C_1 - C_3 алкилена, C_2 - C_4 алкенила или C_3 - C_4 циклоалкила.).

[00360] В некоторых вариантах осуществления каждый из R^{N1} и R^{N2}

независимо выбран из водорода, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, , или . В некоторых вариантах осуществления $\text{R}^{\text{N}1}$ и $\text{R}^{\text{N}2}$ являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления каждый из $\text{R}^{\text{N}1}$ и $\text{R}^{\text{N}2}$ представляют собой водород. В некоторых вариантах осуществления каждый из $\text{R}^{\text{N}1}$ и $\text{R}^{\text{N}2}$ представляет собой $\text{C}_2\text{-C}_4$ алкенил, например, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$. В некоторых вариантах осуществления каждый из $\text{R}^{\text{N}1}$ и $\text{R}^{\text{N}2}$ представляет собой гидроксид- $\text{C}_1\text{-C}_3$ алкилен, например, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$. В некоторых вариантах осуществления $\text{R}^{\text{N}1}$ и $\text{R}^{\text{N}2}$ различаются. В некоторых вариантах осуществления один из $\text{R}^{\text{N}1}$ и $\text{R}^{\text{N}2}$ представляет собой водород, а другой представляет собой $\text{C}_3\text{-C}_4$ циклоалкил. В некоторых вариантах осуществления один из $\text{R}^{\text{N}1}$ и $\text{R}^{\text{N}2}$ представляет собой водород, а другой представляет собой .

[00361] В некоторых вариантах осуществления А представляет собой необязательно замещенное 4-7-членное гетероциклическое кольцо, содержащее по меньшей мере один N. В некоторых вариантах осуществления А представляет собой необязательно замещенное 4-7-членное гетероциклическое кольцо, содержащее ровно один N. В некоторых вариантах осуществления А представляет собой незамещенное 4-7-членное гетероциклическое кольцо, содержащее по меньшей мере один N. В некоторых вариантах осуществления А представляет собой незамещенное 4-7-членное гетероциклическое кольцо, содержащее ровно один N. В некоторых вариантах осуществления А представляет собой необязательно замещенное 5-6-членное гетероциклическое кольцо, содержащее по меньшей мере один N. В некоторых вариантах осуществления А представляет собой незамещенное 5-6-членное гетероциклическое кольцо, содержащее по меньшей мере один N.

[00362] В некоторых вариантах осуществления А представляет собой необязательно замещенное 4-7-членное гетероциклическое кольцо, содержащее по меньшей мере один N, и атом N в А представляет собой третичный амин.

[00363] В некоторых вариантах осуществления А представляет собой необязательно замещенное 4-7-членное гетероциклическое кольцо, содержащее по меньшей мере один N, дополнительно содержащее один или более S. В некоторых вариантах осуществления А представляет собой необязательно замещенное 4-7-членное гетероциклическое кольцо, содержащее по меньшей мере один N, дополнительно содержащее ровно один S.

[00364] В некоторых вариантах осуществления А выбран из группы, состоящей из азетидина, пирролидина, пиперидина, азепана и тиоморфолина. В

некоторых вариантах осуществления А выбран из группы, состоящей из пирролидина и пиперидина.

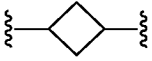
[00365] В некоторых вариантах осуществления, L^1 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенной C_1 - C_{20} алкиленовой цепи и двухвалентной необязательно замещенной C_1 - C_{20} алкениленовой цепи. В некоторых вариантах осуществления, L^2 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенной C_1 - C_{20} алкиленовой цепи и двухвалентной необязательно замещенной C_1 - C_{20} алкениленовой цепи. В некоторых вариантах осуществления L^1 представляет собой необязательно замещенную C_1 - C_{20} алкиленовую цепь. В некоторых вариантах осуществления L^2 представляет собой необязательно замещенную C_1 - C_{20} алкиленовую цепь.

[00366] В некоторых вариантах осуществления L^1 и L^2 являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления L^1 и L^2 являются различными.

[00367] В некоторых вариантах осуществления L^1 представляет собой необязательно замещенную C_1 - C_{10} алкиленовую цепь. В некоторых вариантах осуществления L^2 представляет собой необязательно замещенную C_1 - C_{10} алкиленовую цепь. В некоторых вариантах осуществления L^1 представляет собой необязательно замещенную C_1 - C_5 алкиленовую цепь. В некоторых вариантах осуществления L^2 представляет собой необязательно замещенную C_1 - C_5 алкиленовую цепь.

[00368] В некоторых вариантах осуществления каждый из L^1 и L^2 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$. В некоторых вариантах осуществления каждый из L^1 и L^2 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2-$. В некоторых вариантах осуществления каждый из L^1 и L^2 представляет собой $-CH_2CH_2-$.

[00369] В некоторых вариантах осуществления, L^3 представляет собой связь, необязательно замещенную C_1 - C_6 алкиленовую цепь или двухвалентный необязательно замещенный C_3 - C_6 циклоалкилен. В некоторых вариантах осуществления L^3 представляет собой связь. В некоторых вариантах осуществления L^3 представляет собой необязательно замещенную C_1 - C_6 алкиленовую цепь. В некоторых вариантах осуществления L^3 представляет собой необязательно замещенную C_1 - C_3 алкиленовую цепь. В некоторых вариантах осуществления L^3 представляет собой незамещенную C_1 - C_3 алкиленовую цепь. В некоторых вариантах осуществления L^3 представляет собой $-CH_2-$. В некоторых вариантах осуществления L^3 представляет собой $-CH_2CH_2-$. В некоторых вариантах осуществления L^3 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2-$. В некоторых вариантах осуществления L^3 представляет собой двухвалентный C_3 - C_6 циклоалкилен. В некоторых вариантах осуществления L^3 представляет собой

вариантах осуществления L^3 представляет собой .

[00370] В некоторых вариантах осуществления количество атомов углерода между S тиолата формулы (I) и N, содержащимся в A, составляет 2-10. В некоторых вариантах осуществления количество атомов углерода между S тиолата формулы (I) и N, содержащимся в A, составляет 2-8. В некоторых вариантах осуществления количество атомов углерода между S тиолата формулы (I) и N, содержащимся в A, составляет 2-5. В некоторых вариантах осуществления количество атомов углерода между S тиолата формулы (I) и N, содержащимся в A, составляет 2-4. В некоторых вариантах осуществления количество атомов углерода между S тиолата формулы (I) и N, содержащимся в A, составляет 2. В некоторых вариантах осуществления количество атомов углерода между S тиолата формулы (I) и N, содержащимся в A, составляет 3. В некоторых вариантах осуществления количество атомов углерода между S тиолата формулы (I) и N, содержащимся в A, составляет 4.

[00371] В некоторых вариантах осуществления, R^1 выбран из группы, состоящей из optionally замещенных C_1 - C_{31} алифатических групп и optionally замещенного стероида. В некоторых вариантах осуществления, R^2 выбран из группы, состоящей из optionally замещенных C_1 - C_{31} алифатических групп и optionally замещенного стероида. В некоторых вариантах осуществления R^1 представляет собой optionally замещенный C_1 - C_{31} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой optionally замещенный C_1 - C_{31} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^1 представляет собой optionally замещенный C_5 - C_{25} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой optionally замещенный C_5 - C_{25} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^1 представляет собой optionally замещенный C_{10} - C_{20} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой optionally замещенный C_{10} - C_{20} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^1 представляет собой optionally замещенный C_{10} - C_{20} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой optionally замещенный C_{10} - C_{20} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^1 представляет собой незамещенный C_{10} - C_{20} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой незамещенный C_{10} - C_{20} алкил.

[00372] В некоторых вариантах осуществления R^1 представляет собой необязательно замещенный C_{14} - C_{16} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой необязательно замещенный C_{14} - C_{16} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^1 представляет собой незамещенный C_{14} - C_{16} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой незамещенный C_{14} - C_{16} алкил.

[00373] В некоторых вариантах осуществления R^1 представляет собой

необязательно замещенный разветвленный C_3 - C_{31} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой optionally замещенный разветвленный C_3 - C_{31} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^1 представляет собой optionally замещенный разветвленный C_{10} - C_{20} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой optionally замещенный разветвленный C_{10} - C_{20} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^1 представляет собой optionally замещенный разветвленный C_{14} - C_{16} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой optionally замещенный разветвленный C_{14} - C_{16} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^1 представляет собой замещенный разветвленный C_3 - C_{31} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой замещенный разветвленный C_3 - C_{31} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^1 представляет собой замещенный разветвленный C_{10} - C_{20} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой замещенный разветвленный C_{10} - C_{20} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^1 представляет собой замещенный разветвленный C_{14} - C_{16} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой замещенный разветвленный C_{14} - C_{16} алкил.

[00374] В некоторых вариантах осуществления R^1 и R^2 являются одинаковыми.

[00375] В некоторых вариантах осуществления R^1 и R^2 являются различными. В некоторых вариантах осуществления R^1 представляет собой optionally замещенный C_6 - C_{20} алкенил, а R^2 представляет собой optionally замещенный C_{10} - C_{20} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^1 представляет собой C_6 - C_{20} алкенил, а R^2 представляет собой разветвленный C_{10} - C_{20} алкил.

[00376] В некоторых вариантах осуществления А представляет собой 4-7-членное гетероциклическое кольцо, содержащее по меньшей мере один N и optionally замещен 0-6 R^3 . В некоторых вариантах осуществления R^3 представляет собой optionally замещенную C_1 - C_6 алифатическую группу. В некоторых вариантах осуществления R^3 представляет собой optionally замещенную C_1 - C_3 алифатическую группу. В некоторых вариантах осуществления R^3 представляет собой optionally замещенный C_1 - C_6 алкил. В некоторых вариантах осуществления R^3 представляет собой optionally замещенный C_1 - C_3 алкил. В некоторых вариантах осуществления R^3 представляет собой незамещенный C_1 - C_6 алкил. В некоторых вариантах осуществления R^3 представляет собой незамещенный C_1 - C_3 алкил. В некоторых вариантах осуществления R^3 представляет собой optionally замещенный C_1 - C_6 алкенил. В некоторых вариантах осуществления R^3 представляет собой optionally замещенный C_1 - C_3 алкенил. В некоторых вариантах осуществления R^3 представляет собой

незамещенный C_1 - C_6 алкенил. В некоторых вариантах осуществления R^3 представляет собой незамещенный C_1 - C_3 алкенил.

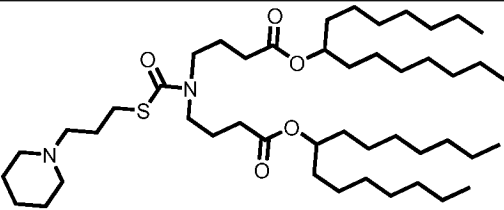
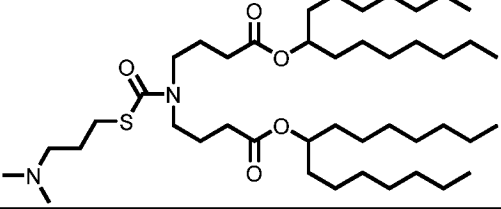
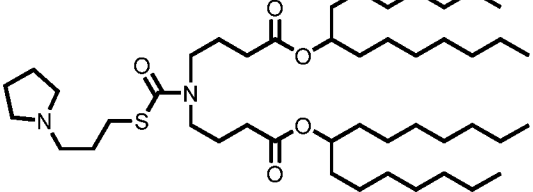
[00377] В некоторых вариантах осуществления R^3 замещен 1-3 C_3 - C_6 циклоалкилом. В некоторых вариантах осуществления R^3 замещен 1 C_3 - C_6 циклоалкилом. В некоторых вариантах осуществления R^3 замещен циклопропанилом. В некоторых вариантах осуществления R^3 замещен 1-3 $-OH$. В некоторых вариантах осуществления R^3 замещен 1 $-OH$.

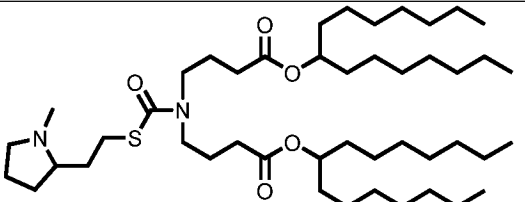
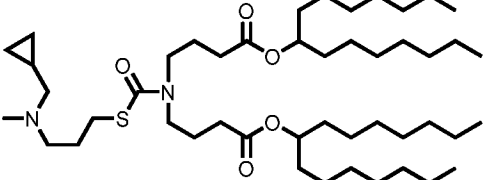
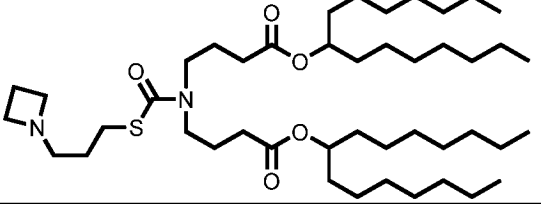
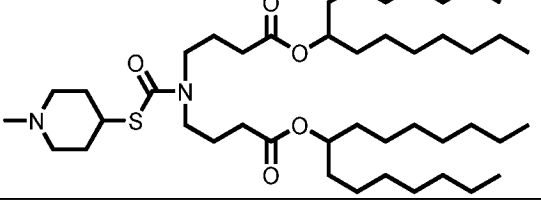
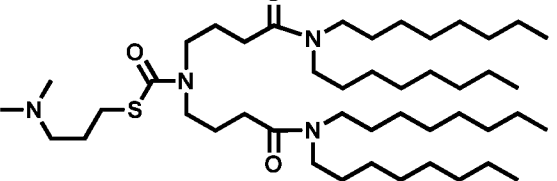
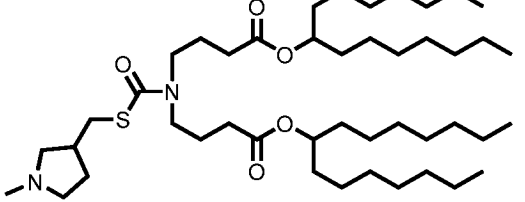
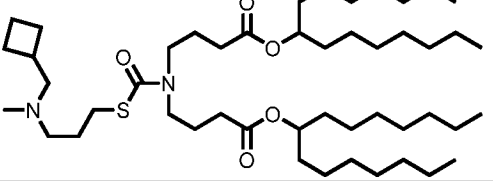
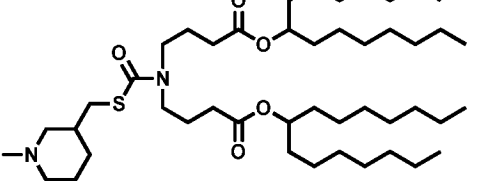
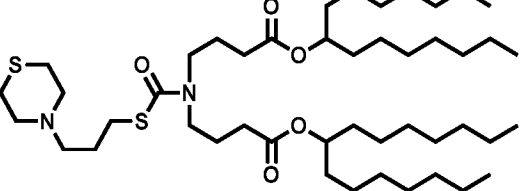
[00378] В некоторых вариантах осуществления m равен 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления m равен 0 или 1. В некоторых вариантах осуществления m равен 0. В некоторых вариантах осуществления m равен 1. В некоторых вариантах осуществления m равен 2. В некоторых вариантах осуществления m равен 3. В некоторых вариантах осуществления m равен 4. В некоторых вариантах осуществления m равен 5. В некоторых вариантах осуществления m равен 6.

[00379] В некоторых вариантах осуществления n равен 0, 1, 2, или 3. В некоторых вариантах осуществления n равен 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления n равен 0. В некоторых вариантах осуществления n равен 1. В некоторых вариантах осуществления n равен 2. В некоторых вариантах осуществления n равен 3.

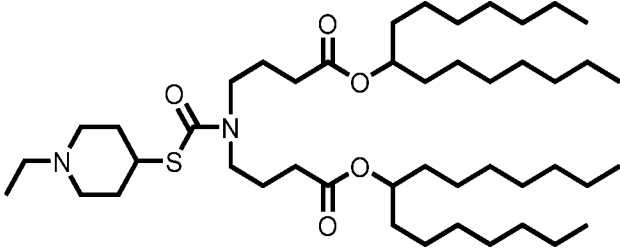
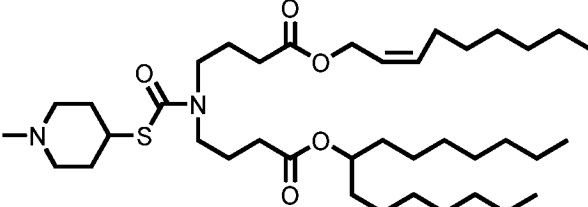
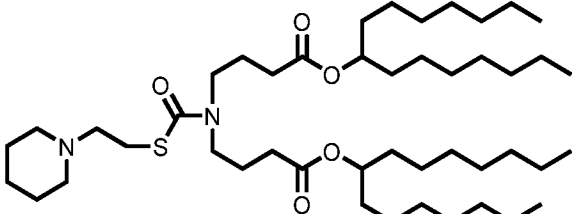
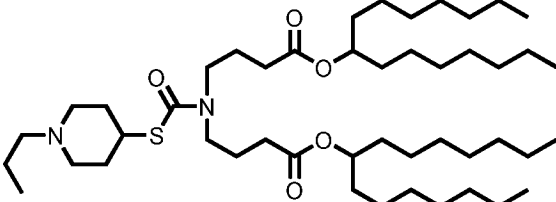
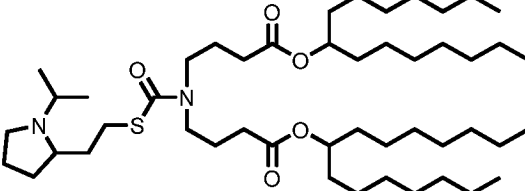
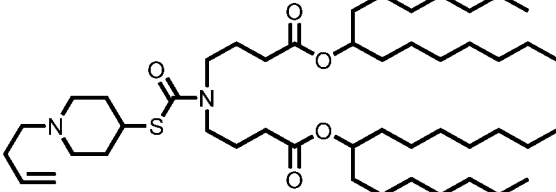
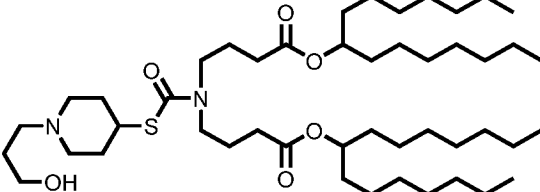
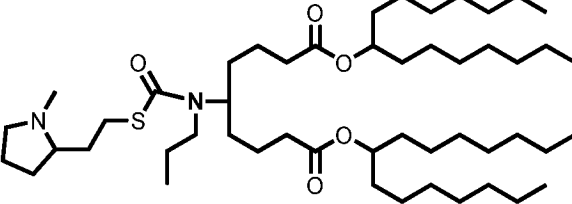
[00380] В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение, выбранное из **Таблицы 21**, или его фармацевтически приемлемую соль или сольват.

Таблица 21

№ соединения	Структура
CAT1	
CAT2	
CAT3	

CAT4	
CAT5	
CAT6	
CAT7	
CAT8	
CAT9	
CAT10	
CAT11	
CAT12	

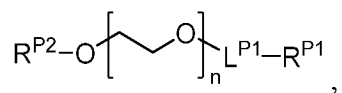
CAT13	
CAT14	
CAT15	
CAT16	
CAT17	
CAT18	
CAT19	
CAT20	
CAT21	

CAT22	
CAT23	
CAT24	
CAT25	
CAT26	
CAT27	
CAT28	
CAT29	

CAT30	
CAT31	
CAT32	
CAT33	
CAT34	
CAT35	

Соединения формулы (А):

[00381] В различных вариантах осуществления, в данном документе предложены соединения Формулы (А):



Формула (А)

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

n представляет собой целое число от 10 до 200, включая все конечные точки;

L^{P1} представляет собой $-[(CH_2)_{0-3}-C(O)O]_{1-3}-$, $-(CH_2)_{0-3}-C(O)O-(CH_2)_{1-3}-OC(O)-$ или $-C(O)N(H)-$;

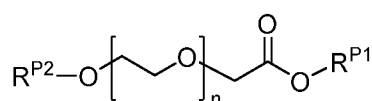
R^{P1} представляет собой C_5 - C_{25} алкил или C_5 - C_{25} алкенил; и

R^{P2} представляет собой водород или $-CH_3$.

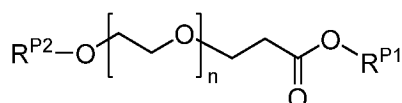
[00382] В некоторых вариантах осуществления Формула (A) не представляет собой $HO-(CH_2CH_2O)_n-C(O)N(H)-(CH_2)_{17}CH_3$.

[00383] В некоторых вариантах осуществления L^{P1} представляет собой $-CH_2C(O)O-$, $-CH_2CH_2C(O)O-$, $-CH_2C(O)OCH_2C(O)O-$, $-CH_2C(O)OCH_2CH_2OC(O)-$ или $-C(O)N(H)-$.

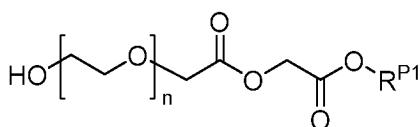
[00384] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (A-a), формулы (A-b), формулы (A-c), формулы (A-d) или формулы (A-e):



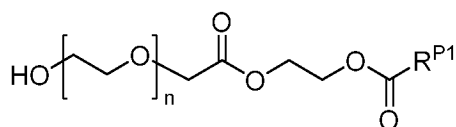
Формула (A-a)



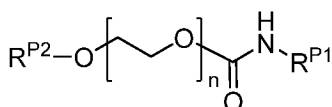
Формула (A-b)



Формула (A-c)



Формула (A-d)



Формула (A-e)

или их фармацевтически приемлемую соль.

[00385] В некоторых вариантах осуществления R^{P1} представляет собой C_6 - C_{24} , C_{10} - C_{20} , C_{10} - C_{18} , C_{10} - C_{16} , C_{10} - C_{14} , C_{10} - C_{12} , C_{12} - C_{20} , C_{12} - C_{18} , C_{12} - C_{16} , C_{12} - C_{14} , C_{14} - C_{20} , C_{14} - C_{18} , C_{14} - C_{16} , C_{16} - C_{20} , C_{16} - C_{18} , или C_{18} - C_{20} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^{P1} представляет собой C_{14} - C_{18} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^{P1} представляет собой C_{14} - C_{16} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^{P1} представляет собой C_{15} - C_{17} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^{P1} представляет собой C_{16} - C_{18} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^{P1} представляет собой C_6 , C_7 , C_8 , C_9 , C_{10} , C_{11} , C_{12} , C_{13} , C_{14} , C_{15} , C_{16} , C_{17} , C_{18} , C_{19} , C_{20} , C_{21} , C_{22} , C_{23} , или C_{24} алкил. В некоторых вариантах осуществления R^{P1} представляет собой C_6 - C_{24} , C_{10} - C_{20} , C_{10} - C_{18} , C_{10} - C_{16} , C_{10} - C_{14} , C_{10} - C_{12} , C_{12} - C_{20} , C_{12} - C_{18} , C_{12} - C_{16} , C_{12} - C_{14} , C_{14} - C_{20} , C_{14} - C_{18} , C_{14} - C_{16} , C_{16} - C_{20} , C_{16} - C_{18} , или C_{18} - C_{20} алкенил. В некоторых вариантах осуществления R^{P1} представляет собой C_{14} - C_{18} алкенил. В некоторых вариантах осуществления R^{P1} представляет собой C_{14} - C_{16} алкенил. В некоторых вариантах осуществления R^{P1}

представляет собой C_{15} - C_{17} алкенил. В некоторых вариантах осуществления R^{P1} представляет собой C_{16} - C_{18} алкенил. В некоторых вариантах осуществления R^{P1} представляет собой C_6 , C_7 , C_8 , C_9 , C_{10} , C_{11} , C_{12} , C_{13} , C_{14} , C_{15} , C_{16} , C_{17} , C_{18} , C_{19} , C_{20} , C_{21} , C_{22} , C_{23} , или C_{24} алкенил.

[00386] В некоторых вариантах осуществления R^{P2} представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления R^{P2} представляет собой $-CH_3$.

[00387] В некоторых вариантах осуществления n в среднем составляет от 10 до 200, от 10 до 180, от 10 до 160, от 10 до 140, от 10 до 120, от 10 до 100, от 10 до 80, от 10 до 60, от 10 до 40, от 10 до 20, от 20 до 200, от 20 до 180, от 20 до 160, от 20 до 140, от 20 до 120, от 20 до 100, от 20 до 80, от 20 до 60, от 20 до 40, от 40 до 200, от 40 до 180, от 40 до 160, от 40 до 140, от 40 до 120, от 40 до 100, от 40 до 80, от 40 до 60, от 60 до 200, от 60 до 180, от 60 до 160, от 60 до 140, от 60 до 120, от 60 до 100, от 60 до 80, от 80 до 200, от 80 до 180, от 80 до 160, от 80 до 140, от 80 до 120, от 80 до 100, от 100 до 200, от 100 до 180, от 100 до 160, от 100 до 140, от 100 до 120, от 120 до 200, от 120 до 180, от 120 до 160, от 120 до 140, от 140 до 200, от 140 до 180, от 140 до 160, от 160 до 200, от 160 до 180 или от 180 до 200. В некоторых вариантах осуществления n в среднем составляет 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200. В некоторых вариантах осуществления n составляет в среднем около 20. В некоторых вариантах осуществления n составляет в среднем около 40. В некоторых вариантах осуществления n составляет в среднем около 45. В некоторых вариантах осуществления n составляет в среднем около 50. В некоторых вариантах осуществления n составляет в среднем около 68. В некоторых вариантах осуществления n составляет в среднем около 75. В некоторых вариантах осуществления n составляет в среднем около 100.

[00388] В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (A) представляет собой соединение выбранное из группы, состоящей из:

$HO-(CH_2CH_2O)_n-CH_2C(O)O-(CH_2)_{17}CH_3$, n в среднем составляет около 45;

$H_3CO-(CH_2CH_2O)_n-CH_2C(O)O-(CH_2)_{17}CH_3$, n в среднем составляет около 45;

$HO-(CH_2CH_2O)_n-CH_2C(O)O-(CH_2)_{15}CH_3$, n в среднем составляет около 45;

$HO-(CH_2CH_2O)_n-CH_2C(O)O-(CH_2)_{13}CH_3$, n в среднем составляет около 45; и

$HO-(CH_2CH_2O)_n-C(O)N(H)-(CH_2)_{17}CH_3$, n в среднем составляет около 45;

или их фармацевтически приемлемую соль.

Альтернативные варианты осуществления изобретения

[00389] В альтернативном варианте осуществления описанные в данном документе соединения могут также содержать одну или более изотопных замен.

Например, водород может представлять собой ^2H (D или дейтерий) или ^3H (T или тритий); углерод может представлять собой, например, ^{13}C или ^{14}C ; кислород может представлять собой, например, ^{18}O ; азот может представлять собой, например, ^{15}N и тому подобное. В других вариантах осуществление конкретный изотоп (*например*, ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{18}O или ^{15}N) может составлять по меньшей мере 1%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,9% от общего содержания изотопов элемента, который занимает определенное положение в соединении.

Липидные наночастицы

[00390] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе синтетические РНК-вирусные геномы инкапсулированы в липидную наночастицу (ЛНЧ). В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ включает один или более липидов, таких как триглицериды (*например*, тристеарин), диглицериды (*например*, глицерил бахенат), моноглицериды (*например*, моностеарат глицерина), жирные кислоты (*например*, стеариновая кислота), стероиды (*например*, холестерин), и воски (*например*, цетил пальмитат). В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит один или более катионных липидов, один или более структурных липидов, и один или более вспомогательных липидов. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит один или более катионных липидов, холестерин и один или более нейтральных липидов.

[00391] В некоторых вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению используются для формирования наночастиц. В некоторых вариантах осуществления наночастица представляет собой липидную наночастицу (ЛНЧ). В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит ПЭГ-липид, ионизируемый липид, вспомогательный липид и структурный липид. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ, описанные в данном документе, составлены для доставки терапевтических средств нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ, описанные в данном документе, составлены для доставки молекул нуклеиновой кислоты нуждающемуся в этом субъекту.

[00392] Состав липидов в ЛНЧ значительно влияет на терапевтическое использование и эффективность конкретной ЛНЧ. Например, составы ЛНЧ, такие как SS-OC/холестерин/DSPC/PEG2k-DPG, обычно демонстрируют повышенную скорость

выведения при повторном внутривенном (в/в) введении, например, у мышей, нечеловекообразных приматов (NHP) и/или у людей и гораздо более короткое время кровотока *in vivo* после второй дозы, чем после первой дозы. Сокращение времени в кровотоке может негативно повлиять на эффективность доставки ЛНЧ, вероятно, из-за меньшего воздействия ЛНЧ на мишень. Поэтому, хотя такие составы могут быть полезны для доставки средств, которые не требуют многократного введения, их использование для доставки средств, требующих последующего введения, может быть ограничено этим сокращенным временем в кровотоке.

[00393] Остается потребность в составах ЛНЧ, которые демонстрируют регулируемую циркуляцию в кровотоке и воздействие на клетки-мишени, *например*, устойчивый кровоток и постоянное воздействие *in vivo* при повторном дозировании. В настоящем изобретении предложены такие составы ЛНЧ путем включения ионизируемого липида и/или ПЭГ-липид по настоящему изобретению в липидный состав ЛНЧ. Устойчивая циркуляция в кровотоке ЛНЧ по данному изобретению при повторном введении, следовательно, обеспечивает устойчивый терапевтический эффект инкапсулированных в нее синтетических РНК-вирусных геномов.

[00394] В некоторых вариантах осуществления в отсутствие ионизируемого липида и/или ПЭГ-липид по данному изобретению быстрый клиренс ЛНЧ и ее компонентов при повторном введении снижает эффективность доставки инкапсулированного синтетического РНК-вирусного генома в последующих дозах, поскольку организм может вывести ЛНЧ до высвобождения синтетического РНК-вирусного генома. В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид и/или ПЭГ-липид по данному изобретению при включении в ЛНЧ задерживает клиренс ЛНЧ при повторном введении, обеспечивая замедленное высвобождение и терапевтический эффект инкапсулированного синтетического РНК-вирусного генома.

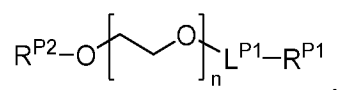
Полиэтиленгликоль (ПЭГ)-липид

[00395] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид по настоящему изобретению содержит гидрофильную головную группу и гидрофобный липидный хвост. В некоторых вариантах осуществления гидрофильная головная группа представляет собой фрагмент ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид по настоящему изобретению содержит монолипидный хвост. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид по настоящему изобретению содержит моноалкиллипидный хвост, моноалкениллипидный хвост, моноалкиниллипидный хвост или моноациллипидный хвост. В некоторых вариантах осуществления монолипидный хвост содержит эфирную группу, карбонильную группу или сложноэфирную группу. В некоторых вариантах

осуществления ПЭГ-липид по настоящему изобретению может содержать простой алкиловый эфир полиоксиэтилена, простой алкениловый эфир полиоксиэтилена или простой алкиниловый эфир полиоксиэтилена (такие молекулы также известны как молекулы BRIJ™ или Brij). В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид по настоящему изобретению может содержать сложный алкиловый эфир полиоксиэтилена, сложный алкениловый эфир полиоксиэтилена или сложный алкиниловый эфир полиоксиэтилена (такие молекулы также известны как молекулы MYRJ™).

[00396] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид может содержать ди-ациллипидные хвосты.

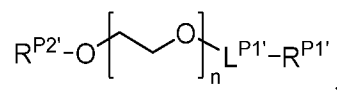
[00397] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (A)



Формула (A)

или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где переменные определены в данном документе.

[00398] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (A'):



Формула (A')

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

n представляет собой целое число от 10 до 200, включая все конечные точки;

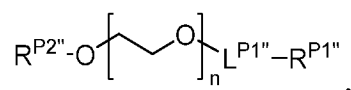
$L^{P1'}$ представляет собой связь, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{[(CH}_2\text{)}_{0-3}-\text{C}(\text{O})\text{O}]_{1-3}-$, $-(\text{CH}_2)_{0-3}-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_{1-3}-\text{OC}(\text{O})-$ или $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})-$;

$R^{P1'}$ представляет собой C_5 - C_{25} алкил или C_5 - C_{25} алкенил; и

$R^{P2'}$ представляет собой водород или $-\text{CH}_3$.

[00399] В некоторых вариантах осуществления $L^{P1'}$ представляет собой связь, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})-$ или $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})-$. В некоторых вариантах осуществления $R^{P1'}$ представляет собой R^{P1} . В некоторых вариантах осуществления $R^{P2'}$ представляет собой R^{P2} .

[00400] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (A''):



Формула (A'')

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

n представляет собой целое число от 10 до 200, включая все конечные точки;

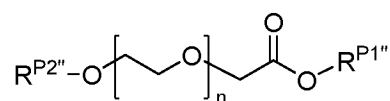
$L^{P1''}$ представляет собой связь, $-[(CH_2)_{0-3}-C(O)O]_{1-3}-$, $-(CH_2)_{0-3}-C(O)O-(CH_2)_{1-3}-OC(O)-$ или $-C(O)N(H)-$;

$R^{P1''}$ представляет собой C_5 - C_{25} алкил или C_5 - C_{25} алкенил; и

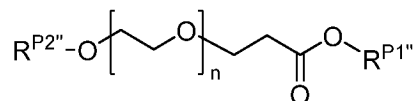
$R^{P2''}$ представляет собой водород или $-CH_3$.

[00401] В некоторых вариантах осуществления $L^{P1''}$ представляет собой связь, $-CH_2C(O)O-$, $-CH_2CH_2C(O)O-$, $-CH_2C(O)OCH_2C(O)O-$, $-CH_2C(O)OCH_2CH_2OC(O)-$ или $-C(O)N(H)-$.

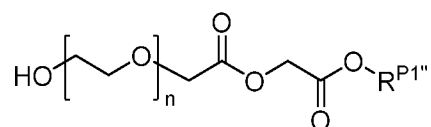
[00402] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (A''-a), формулы (A''-b), формулы (A''-c), формулы (A''-cd), формулы (A''-e) или формулы (A''-f):



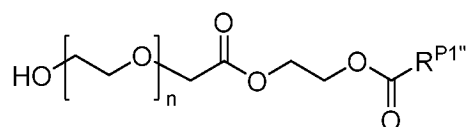
Формула (A''-a)



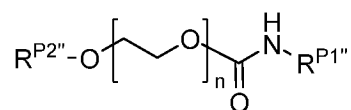
Формула (A''-b)



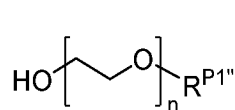
Формула (A''-c)



Формула (A''-d)



Формула (A''-e)

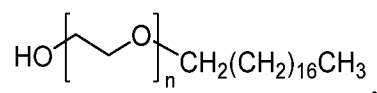


Формула (A''-f)

или их фармацевтически приемлемую соль.

[00403] В некоторых вариантах осуществления $R^{P1''}$ представляет собой R^{P1} .
В некоторых вариантах осуществления $R^{P2''}$ представляет собой R^{P2} .

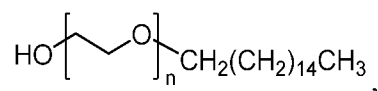
[00404] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (A''-f1):



Формула (A''-f1)

или их фармацевтически приемлемую соль.

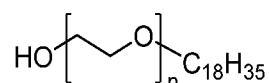
[00405] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (A''-f2):



Формула (A''-f2)

или их фармацевтически приемлемую соль.

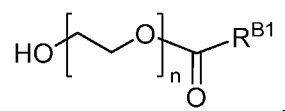
[00406] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (A''-f3):



Формула (A''-f3)

или их фармацевтически приемлемую соль.

[00407] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид по изобретению представляет собой соединение формулы (B):



Формула B

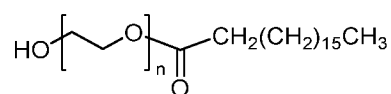
или его фармацевтически приемлемую соль, где:

n равно целому числу от 10 до 200, включая все конечные точки; и

R^{B1} представляет собой C₅-C₂₅ алкил или C₅-C₂₅ алкенил.

[00408] В некоторых вариантах осуществления R^{B1} представляет собой R^{P1}.

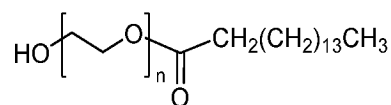
[00409] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (B-a):



Формула (B-a),

или их фармацевтически приемлемую соль.

[00410] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (B-b):



Формула (B-b),

или их фармацевтически приемлемую соль.

[00411] В некоторых вариантах осуществления n в среднем составляет от 10 до 200, от 10 до 180, от 10 до 160, от 10 до 140, от 10 до 120, от 10 до 100, от 10 до 80, от

10 до 60, от 10 до 40, от 10 до 20, от 20 до 200, от 20 до 180, от 20 до 160, от 20 до 140, от 20 до 120, от 20 до 100, от 20 до 80, от 20 до 60, от 20 до 40, от 40 до 200, от 40 до 180, от 40 до 160, от 40 до 140, от 40 до 120, от 40 до 100, от 40 до 80, от 40 до 60, от 60 до 200, от 60 до 180, от 60 до 160, от 60 до 140, от 60 до 120, от 60 до 100, от 60 до 80, от 80 до 200, от 80 до 180, от 80 до 160, от 80 до 140, от 80 до 120, от 80 до 100, от 100 до 200, от 100 до 180, от 100 до 160, от 100 до 140, от 100 до 120, от 120 до 200, от 120 до 180, от 120 до 160, от 120 до 140, от 140 до 200, от 140 до 180, от 140 до 160, от 160 до 200, от 160 до 180 или от 180 до 200. В некоторых вариантах осуществления n в среднем составляет 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200. В некоторых вариантах осуществления n составляет в среднем около 20. В некоторых вариантах осуществления n составляет в среднем около 40. В некоторых вариантах осуществления n составляет в среднем около 45. В некоторых вариантах осуществления n составляет в среднем около 50. В некоторых вариантах осуществления n составляет в среднем около 68. В некоторых вариантах осуществления n составляет в среднем около 75. В некоторых вариантах осуществления n составляет в среднем около 100.

[00412] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид содержит фрагмент ПЭГ со средней молекулярной массой от около 500 до около 10000 дальтон. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид содержит фрагмент ПЭГ со средней молекулярной массой от около 500 до около 5000 дальтон, от около 500 до около 4000 дальтон, от около 500 до около 3000 дальтон, от около 500 до около 2000 дальтон, от около 500 до около 1000 дальтон, от около 500 до около 800 дальтон, от около 500 до около 600 дальтон, от около 600 до около 5000 дальтон, от около 600 до около 4000 дальтон, от около 600 до около 3000 дальтон, от около 600 до около 2000 дальтон, от около 600 до около 1000 дальтон, от около 600 до около 800 дальтон, от около 800 до около 5000 дальтон, от около 800 до около 4000 дальтон, от около 800 до около 3000 дальтон, от около 800 до около 2000 дальтон, от около 800 до около 1000 дальтон, от около 1000 до около 5000 дальтон, от около 1000 до около 4000 дальтон, от около 1000 до около 3000 дальтон, от около 1000 до около 2000 дальтон, от около 2000 до около 5000 дальтон, от около 2000 до около 4000 дальтон, от около 2000 до около 3000 дальтон, от около 3000 до около 5000 дальтон, от около 3000 до около 4000 дальтон, от около 5000 до около 10000 дальтон, от около 5000 до около 7500 дальтон или от около 7500 до около 10000 дальтон. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-фрагмент ПЭГ-липида имеет среднюю молекулярную массу от около 1500 до около 2500 дальтон. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-фрагмент ПЭГ-липида имеет среднюю молекулярную массу от около 1000 до около 5000 дальтон. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид содержит

фрагмент ПЭГ со средней молекулярной массой около 500, около 600, около 800, около 1000, около 1500, около 2000, около 2500, около 3000, около 3500, около 4000, около 4500, около 5000, около 6000, около 7000, около 8000, около 9000 или около 10000 дальтон. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид содержит фрагмент ПЭГ со средней молекулярной массой по меньшей мере 500, по меньшей мере 1000, по меньшей мере 1500, по меньшей мере 2000, по меньшей мере 2500, по меньшей мере 3000, по меньшей мере 3500, по меньшей мере 4000, по меньшей мере 4500, по меньшей мере 5000, по меньшей мере 6000, по меньшей мере 7000, по меньшей мере 8000, по меньшей мере 9000 или по меньшей мере 10000 дальтон. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид содержит фрагмент ПЭГ со средней молекулярной массой не более 500, не более 1000, не более 1500, не более 2000, не более 2500, не более 3000, не более не более 3500, не более 4000, не более 4500, не более 5000, не более 6000, не более 7000, не более 8000, не более 9000 или не более 10000 дальтон. Все значения включают все конечные точки.

[00413] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой полиоксиэтилен (100) стеариловый эфир, полиоксиэтилен (20) цетиловый эфир, полиоксиэтилен (20) олеиловый эфир, полиоксиэтилен (20) стеариловый эфир или их смесь. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой полиоксиэтилен(100)стеарат, полиоксиэтилен(50)стеарат, полиоксиэтилен(40)стеарат, полиоксиэтиленпальмитат или их смесь.

[00414] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ПЭГ-липид представляет собой $\text{HO} \left[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O} \right]_n \text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ (BRIJ™ S100), имеющий номер CAS 9005-00, линейную формулу $\text{C}_{18}\text{H}_{37}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, где n равен 100. BRIJ™ S100 также известен как полиоксиэтилен (100) стеариловый эфир. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой $\text{HO-ПЭГ100-CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$.

[00415] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ПЭГ-липид представляет собой $\text{HO} \left[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O} \right]_n \text{CH}_2(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ (BRIJ™ C20), имеющий номер CAS 9004-95-9, линейную формулу $\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, где n равен 20. BRIJ™ C20 также известен как BRIJ™ 58 и, в общем случае, как гексадециловый эфир полиэтиленгликоля, цетиловый эфир полиоксиэтилена (20). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой $\text{HO-ПЭГ20-CH}_2(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$.

[00416] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ПЭГ-липид представляет собой $\text{HO} \left[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O} \right]_n \text{C}_{18}\text{H}_{35}$ (BRIJ™ O20), имеющий номер CAS

9004-98-2, линейную формулу $C_{18}H_{35}(OCH_2CH_2)_nOH$, где n равен 20. BRIJ™ O20 также известен под общим названием, как олеиловый эфир полиоксиэтилена (20). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой НО-ПЭГ20- $C_{18}H_{35}$.

[00417] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения

ПЭГ-липид представляет собой $HO-[CH_2CH_2O]_n-CH_2(CH_2)_{16}CH_3$ (BRIJ™ S20), имеющий номер CAS 9005-00-9, линейную формулу $C_{18}H_{37}(OCH_2CH_2)_nOH$, где n равен 20. BRIJ™ S20 также известен под общим названием, как октадециловый эфир полиэтиленгликоля или стеариловый эфир полиоксиэтилена (20). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой НО-ПЭГ20- $CH_2(CH_2)_{16}CH_3$.

[00418] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения

ПЭГ-липид представляет собой $HO-[CH_2CH_2O]_n-C(=O)CH_2(CH_2)_{15}CH_3$ (MYRJ™ S100), имеющий номер CAS 9004-99-3, линейную формулу $C_{17}H_{35}C(O)(OCH_2CH_2)_nOH$, где n равен 100. MYRJ™ S100 также известен под общим названием, как полиоксиэтилен (100) стеарат. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой НО-ПЭГ100- $CH_2(CH_2)_{15}CH_3$.

[00419] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения

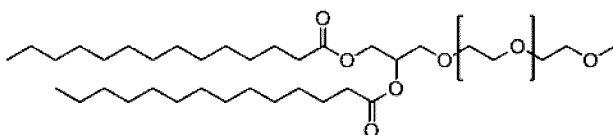
ПЭГ-липид представляет собой $HO-[CH_2CH_2O]_n-C(=O)CH_2(CH_2)_{15}CH_3$ (MYRJ™ S50), имеющий номер CAS 9004-99-3, линейную формулу $C_{17}H_{35}C(O)(OCH_2CH_2)_nOH$, где n равен 50. MYRJ™ S50 также известен под общим названием, как полиоксиэтилен (50) стеарат. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой НО-ПЭГ50- $CH_2(CH_2)_{15}CH_3$.

[00420] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения

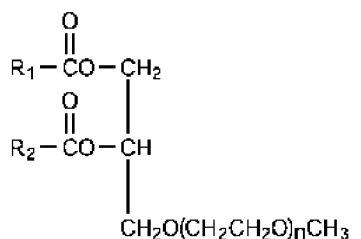
ПЭГ-липид представляет собой $HO-[CH_2CH_2O]_n-C(=O)CH_2(CH_2)_{15}CH_3$ (MYRJ™ S40), имеющий номер CAS 9004-99-3, линейную формулу $C_{17}H_{35}C(O)(OCH_2CH_2)_nOH$, где n равен 40. MYRJ™ S40 также известен под общим названием, как полиоксиэтилен (40) стеарат. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой НО-ПЭГ40- $CH_2(CH_2)_{15}CH_3$.

[00421] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения

ПЭГ-липид представляет собой



[00422] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ПЭГ-липид представляет собой:



[00423] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ПЭГ-липид может представлять собой ПЭГ-дилауроилглицерин, ПЭГ-димиристоилглицерин (PEG-DMG), ПЭГ-дипальмитоилглицерин, ПЭГ-дистеароилглицерин (PEG-DSPE), ПЭГ-дилаурилгликамид, ПЭГ-димиристилглицерин, ПЭГ-дипальмитоилгликамид, ПЭГ-дистеароилгликамид, ПЭГ-холестерин (1-[8'-(холест-5-ен-3[бета]-окси)карбоксамидо-3',6'-диоксооктанил]карбамоил-[омега]-метил-поли(этиленгликоль), PEG-DMB (3,4-дитетрадекоксилбензил-[омега]-метил-поли(этиленгликоль)эфир), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (PEG2k-DMG), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (PEG2k-DSPE), 1,2-дистеароил-sn-глицерин, метоксиполиэтиленгликоль (PEG2k-DSG), поли(этиленгликоль)-2000-диметакрилат (PEG2k-DMA) или 1,2-дистеарилоксипропил-3-амин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (PEG2k-DSA). В некоторых вариантах осуществления PEG-липид может представлять собой PEG2k-DMG. В некоторых вариантах осуществления PEG-липид может представлять собой PEG2k-DSG. В других вариантах осуществления ПЭГ-липид может представлять собой PEG2k-DSPE. В некоторых вариантах осуществления PEG-липид может представлять собой PEG2k-DMA. В других вариантах осуществления ПЭГ-липид может представлять собой PEG2k-C-DMA. В некоторых вариантах осуществления PEG-липид может представлять собой PEG2k-DSA. В других вариантах осуществления ПЭГ-липид может представлять собой PEG2k-C11. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид может представлять собой PEG2k-C14. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид может представлять собой PEG2k-C16. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид может представлять собой PEG2k-C18.

[00424] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид, имеющий один липидный хвост по настоящему изобретению (например, ПЭГ-липид формулы (A), (A'),

(А'') или (В)) может снижать ускоренное выведение из крови (АВС) при введении и/или повторном введении композиции ЛНЧ по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид, имеющий один липидный хвост по настоящему изобретению, может уменьшать или истощать ПЭГ-специфические антитела (*например*, анти-ПЭГ IgM), вырабатываемые иммунной системой субъекта при введении и/или повторном введении композиции ЛНЧ по настоящему изобретению.

[00425] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид содержит поли(этилен)гликолевую цепь длиной до 5 кДа, ковалентно присоединенную к липиду, включающему один или более C6-C20 алкилов. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой 1,2-дистеароил-сн-глицеро-3-фосфоэтаноламин-поли(этиленгликоль) (DSPE-ПЭГ) или 1,2-дистеароил-сн-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[амино(полиэтиленгликоль)] (DSPE-ПЭГ-амин). В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид выбран из 1,2-дистеароил-сн-глицеро-3-фосфоэтаноламина-N-[амино(полиэтиленгликоля)-5000] (DSPE-PEG5K); 1,2-дипальмитоил-рац-глицерин метоксиполиэтиленгликоля-2000 (DPG-PEG2K); 1,2-дистеароил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена-5000 (DSG-PEG5K); 1,2-дистеароил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена-2000 (DSG-PEG2K); 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена-5000 (DMG-PEG5K); и 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена-2000 (DMG-PEG2K). В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой DSPE-PEG5K. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой DPG-PEG2K. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой DSG-PEG2K. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой DMG-PEG2K. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой DSG-PEG5K. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой DMG-PEG5K.

[00426] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой расщепляемый ПЭГ-липид. Примеры производных ПЭГ с расщепляемыми связями включают производные, модифицированные пептидными связями (Kulkarni et al. (2014). Mmp-9 responsive PEG cleavable nanovesicles for efficient delivery of chemotherapeutics to pancreatic cancer. Mol Pharmaceutics 11:2390–9; Lin et al. (2015). Drug/dye-loaded, multifunctional peg-chitosan-iron oxide nanocomposites for methotrexate synergistically self-targeted cancer therapy and dual model imaging. ACS Appl Mater Interfaces 7:11908–20.), дисульфидными ключами (Yan et al (2014). A method to accelerate the gelation of disulfide-crosslinked hydrogels. Chin J Polym Sci 33:118–27; Wu & Yan (2015). Copper nanopowder catalyzed cross-coupling of diaryl disulfides with aryl iodides

in PEG-400. Synlett 26:537–42), винилэфирными связями, гидразонными связями (Kelly et al. (2016). Polymeric prodrug combination to exploit the therapeutic potential of antimicrobial peptides against cancer cells. Org Biomol Chem 14:9278–86.) и сложноэфирными связями (Xu et al. (2008). Esterase-catalyzed dePEGylation of pH-sensitive vesicles modified with cleavable PEG-lipid derivatives. J Control Release 130:238–45). См. также, Fang et al., (2017) Cleaveable PEGylation: a strategy for overcoming the “PEG dilemma” in efficient drug delivery. Drug Delivery 24:2, 22-32.

[00427] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой активированный ПЭГ-липид. Типичные активированные ПЭГ-липиды включают ПЭГ-NH₂, ПЭГ-MAL, ПЭГ-NHS и ПЭГ-ALD. Такие функционализированные ПЭГ-липиды пригодны при конъюгации нацеливающих фрагментов с липидными наночастицами для направления частиц к конкретной клетке-мишени или ткани-мишени (*например*, путем присоединения антигенсвязывающих молекул, пептидов, гликанов и т.д.). В некоторых вариантах осуществления функционализированный фрагмент (*например*, -NH₂, -MAL, -NHS, -ALD) добавляют к свободному концу ПЭГ-фрагмента ПЭГ-липид по данному изобретению (*например*, ПЭГ-липиду семейства BRIJ™ или MYRJ™)

Катионный липид

[00428] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ, представленная в данном документе, содержит один или более катионных липидов. В контексте данного документа термины «катионный липид» и «ионизируемый липид» используются взаимозаменяемо.

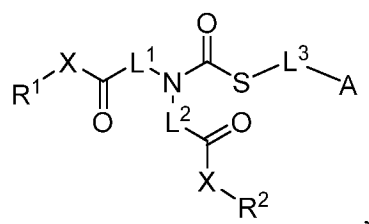
[00429] Катионные липиды относятся к любому из ряда видов липидов, которые несут суммарный положительный заряд при выбранном pH, таком как физиологический pH. Такие липиды включают, но не ограничиваются ими, 1,2-дилинолеилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLenDMA), диоктадецилдиметиламмоний (DODMA), дистеарилдиметиламмоний (DSDMA), N,N-диолеил-N,N-диметиламмоний хлорид, (DODAC); N-(2,3-диолеилокси)пропил-N,N,N-триметиламмоний хлорид (DOTMA); N,N-дистеарил-N,N-диметиламмоний бромид (DDAB); N-(2,3-диолеилокси)пропил-N,N,N-триметиламмонийхлорид (DOTAP); 3-(N-(N',N'-диметиламиноэтан)-карбамоил)холестерин (DC-Chol) и N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксиэтиламмоний бромид (DMRIE). *Например*, катионные липиды, которые имеют положительный заряд при pH ниже физиологического, включают, но не ограничиваются ими, DODAP, DODMA и DMDMA. В некоторых вариантах осуществления катионные

липиды включают алкильные цепи C₁₈, эфирные связи между головной группой и алкильными цепями, и от 0 до 3 двойных связей. К таким липидам относятся, *например*, DSDMA, DLinDMA, DLenDMA и DODMA.

[00430] В некоторых вариантах осуществления катионные липиды включают протонируемый третичный амин головной группы. Такие липиды в данном документе называются ионизируемыми липидами. Ионизируемые липиды относятся к видам липидов, состоящим из ионизируемой аминной головной группы и обычно содержащим рКа менее 7. Поэтому в средах с кислым pH ионизируемая аминная головная группа протонируется таким образом, что ионизируемый липид преимущественно взаимодействует с отрицательно заряженными молекулами (*например*, нуклеиновыми кислотами, такими как описанные в данном документе рекомбинантными полинуклеотидами), облегчая тем самым сборку и инкапсуляцию наночастиц. Поэтому в некоторых вариантах осуществления ионизируемые липиды могут увеличить загрузку нуклеиновых кислот в липидные наночастицы. В среде, где pH больше около 7 (*например*, физиологический pH $\approx$ 7,4), ионизируемый липид имеет нейтральный заряд. Когда частицы, содержащие ионизируемые липиды, попадают в среду эндосом с низким pH (*например*, pH < 7), ионизируемый липид снова протонируется и связывается с анионными эндосомальными мембранами, способствуя высвобождению содержимого, инкапсулированного частицей. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит ионизируемый липид, *например*, 7.SS-расщепляемый и pH-чувствительный липидоподобный материал (такой как COATSOME® серии SS).

[00431] В некоторых вариантах осуществления катионный липид ЛНЧ представляет собой DLinDMA, DLin-KC2-DMA, DLin-MC3-DMA (MC3), COATSOME® SS-LC (прежнее название: SS-18/4PE-13), COATSOME® SS-EC (прежнее название: SS-33/4PE-15), COATSOME® SS-OC, COATSOME® SS-OP, ди((Z)-нон-2-ен-1-ил)9-((4-диметиламино)бутаноил)окси)гептадекандиоат (L-319), N-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмонийхлорида (DOTAP) или их смеси.

[00432] В некоторых вариантах осуществления катионный липид ЛНЧ представляет собой соединение формулы (I):

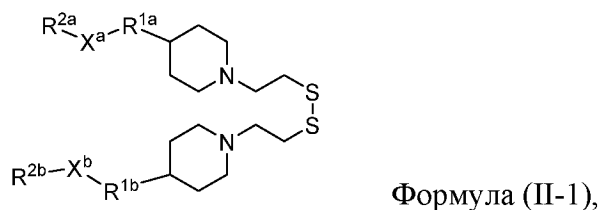


Формула (I)

или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где переменные определены в данном документе.

[00433] В некоторых вариантах осуществления катионный липид по изобретению представляет собой соединение, выбранное на **Таблицы 21** или его фармацевтически приемлемую соль.

[00434] В некоторых вариантах осуществления катионный липид ЛНЧ представляет собой соединение формулы (II-1):



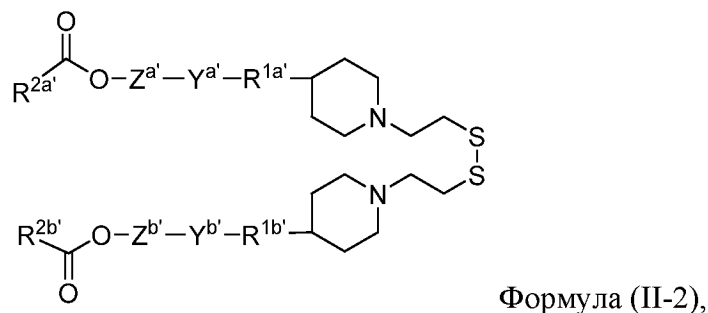
или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где:

каждый из R^{1a} и R^{1b} независимо представляет собой C_1 - C_8 алифатическую группу или $-O(C_1$ - C_8 алифатическую группу)-, где атом O, если он присутствует, связан с пиперидиновым кольцом;

Каждый из X^a и X^b независимо представляет собой $-C(O)O^*$, $-OC(O)^*$, $-C(O)N(R_x^1)^*$, $-N(R_x^1)C(O)^*$, $-O(C=O)N(R_x^1)^*$, $-N(R_x^1)(C=O)O^*$ или $-O-$, где $*$ указывает точку присоединения к R^{2a} или R^{2b} , соответственно, и где R_x^1 в каждом случае независимо выбран из водорода и необязательно замещенного C_1 - C_4 алкила; и

Каждый из R^{2a} и R^{2b} независимо представляет собой остаток стерола, остаток жирорастворимого витамина или C_{13} - C_{23} алифатическую группу.

[00435] В некоторых вариантах осуществления катионный липид ЛНЧ представляет собой соединение формулы (II-2):



или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где:

Каждый из $R^{1a'}$ и $R^{1b'}$ независимо представляет собой C_1 - C_8 алкилен или $-O(C_1$ - C_8 алкилен), где атом O, если он присутствует, связан с пиперидиновым кольцом;

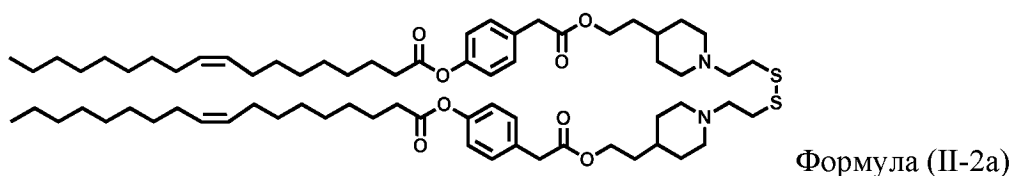
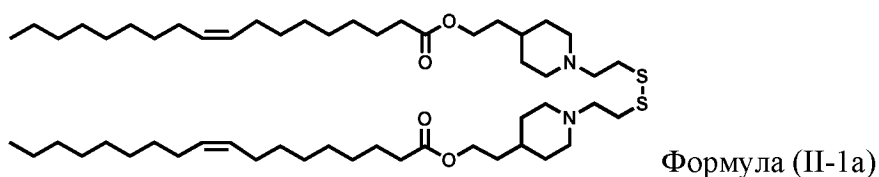
Каждый из Y^a и Y^b независимо представляет собой $-C(O)O^*$, $-OC(O)^*$, $-C(O)N(R_x^1)^*$, $-N(R_x^1)C(O)^*$, $-O(C=O)N(R_x^1)^*$, $-N(R_x^1)(C=O)O^*$, $-N(R_x^1)C(O)N(R_x^1)^*$ или $-O-$, где $*$ указывает точку присоединения к R^{2a} или R^{2b} , и где R_x^1 в каждом случае

независимо выбран из водорода и необязательно замещенного C₁-C₄ алкила;

Каждый из Z^{a'} и Z^{b'} независимо представляет собой необязательно замещенный арилен-C₀-C₈ алкилен или необязательно замещенный арилен-C₀-C₈ гетероалкилен, где алкиленовая или гетероалкиленовая группа связана с Y^{a'} и Y^{b'}, соответственно;

Каждый из R^{2a'} и R^{2b'} независимо представляет собой остаток стерола, остаток жирорастворимого витамина или C₁₂-C₂₂ алифатическую группу.

[00436] В некоторых вариантах осуществления катионный липид ЛНЧ представляет собой соединение формулы (II-1a) (COATSOME® SS-OC) или формулы (II-2a) (COATSOME® SS-OP):



[00437] В некоторых вариантах осуществления катионный липид ЛНЧ представляет собой соединение формулы или формулы (II-1a) (COATSOME® SS-OC). COATSOME® SS-OC также известен как SS-18/4PE-16.

[00438] В некоторых вариантах осуществления катионный липид ЛНЧ представляет собой соединение формулы или формулы (II-2a) (COATSOME® SS-OP).

[00439] В некоторых вариантах осуществления катионный липид ЛНЧ представляет собой 1,2-диолеил-3-триметиламмоний-пропан (DOTAP).

Вспомогательный липид

[00440] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ, описанные в данном документе, содержат один или более вспомогательных липидов. Термин «вспомогательный липид» относится к липиду, способному увеличивать доставку ЛНЧ к мишени, например, в клетку. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, предполагается, что вспомогательный липид может повышать стабильность и/или фузогенность мембраны липидной наночастицы. В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид представляет собой фосфолипид. В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид представляет собой заменитель или замену фосфолипида. В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид представляет собой алкилрезорцин.

[00441] В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид

представляет собой фосфатидилхолин (ФХ). В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид не представляет собой фосфатидилхолин (ФХ). В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид представляет собой фосфолипид или заменитель фосфолипида. В некоторых вариантах осуществления фосфолипид или заменитель фосфолипида может представлять собой, например, один или более насыщенных или (поли)ненасыщенных фосфолипидов или заменителей фосфолипида или их комбинацию. Как правило, фосфолипиды содержат фосфатную головную группу и один или более хвостов жирных кислот. В некоторых вариантах осуществления фосфолипид может включать одну или более кратных (*например*, двойных или тройных) связей (*т. е.*, одну или более ненасыщенных связей). В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид является некатионным.

[00442] Головная фосфатная группа может быть выбрана, например, из группы, состоящей, без ограничения, из фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилглицерина, фосфатидилсерина, фосфатидной кислоты, 2-лизофосфатидилхолина и сфингомиелина.

[00443] Хвост жирной кислоты может быть выбран, например, из группы, состоящей, без ограничения, из лауриновой кислоты, миристиновой кислоты, миристинолеиновой кислоты, пальмитиновой кислоты, пальмитолеиновой кислоты, стеариновой кислоты, олеиновой кислоты, линолевой кислоты, альфа-линоленовой кислоты, эруковой кислоты, фитановой кислоты, арахидиновой кислоты, арахидоновой кислоты, эйкозапентаеновой кислоты, бегеновой кислоты, докозапентаеновой кислоты и докозагексаеновой кислоты.

[00444] Фосфолипиды включают, но не ограничиваются этим, глицерофосфолипиды, такие как фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины, фосфатидилсерины, фосфатидилинозитолы, фосфатидилглицерины и фосфатидные кислоты. Фосфолипиды также включают фосфосфинголипид, такой как сфингомиелин.

[00445] В некоторых вариантах осуществления некатионный вспомогательный липид представляет собой аналог DSPC, заменитель DSPC, олеиновую кислоту или аналог олеиновой кислоты.

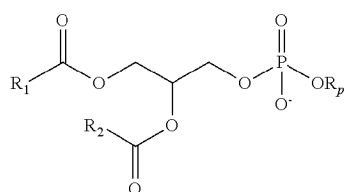
[00446] В некоторых вариантах осуществления некатионный вспомогательный липид представляет собой нефосфатидилхолиновый (ФХ) цвиттерионный липид, аналог DSPC, олеиновую кислоту, аналог олеиновой кислоты или заменитель 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC).

[00447] В некоторых вариантах осуществления фосфолипиды могут способствовать слиянию с мембраной. Например, катионный фосфолипид может

взаимодействовать с одним или более отрицательно заряженными фосфолипидами мембраны (*например*, клеточной или внутриклеточной мембраны). Слияние фосфолипида с мембраной может обеспечить прохождение одного или нескольких элементов липидсодержащей композиции через мембрану, обеспечивая, *например*, доставку одного или более элементов в клетку.

[00448] В некоторых вариантах осуществления головная фосфатная группа может быть выбрана из группы, состоящей, без ограничения, из фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилглицерина, фосфатидилсерина, фосфатидной кислоты, 2-лизофосфатидилхолина и сфингомиелина. Хвост жирной кислоты может быть выбран, например, из группы, состоящей, без ограничения, из лауриновой кислоты, миристиновой кислоты, миристинолеиновой кислоты, пальмитиновой кислоты, пальмитолеиновой кислоты, стеариновой кислоты, олеиновой кислоты, линолевой кислоты, альфа-линоленовой кислоты, эруковой кислоты, фитановой кислоты, арахидиновой кислоты, арахидоновой кислоты, эйкозапентаеновой кислоты, бегеновой кислоты, докозапентаеновой кислоты и докозагексаеновой кислоты.

[00449] В некоторых вариантах осуществления фосфолипид представляет собой соединение формулы (III):



Формула (III),

где: R_p представляет собой фосфатную головную группу, а R₁ и R₂ представляют собой хвосты жирных кислот с ненасыщенностью или без нее, которые могут быть одинаковыми или разными. Фосфатная головная группа может быть выбрана, например, из группы, состоящей, без ограничения, из фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилглицерина, фосфатидилсерина, фосфатидной кислоты, 2-лизофосфатидилхолина и сфингомиелина. Хвост жирной кислоты может быть выбран из неограничивающей группы, включающей лауриновую кислоту, миристиновую кислоту, миристолеую кислоту, пальмитиновую кислоту, пальмитолеиновую кислоту, стеариновую кислоту, олеиновую кислоту, линолеую кислоту, альфа-линоленовую кислоту, эруковую кислоту, фитановую кислоту, арахидиновую кислоту, арахидоновую кислоту, эйкозапентаеновую кислоту, бегеновую кислоту, докозапентаеновую кислоту и докозагексаеновую кислоту. Также предусмотрены не встречающиеся в природе формы, включая природные виды с модификациями и заменами, включая разветвление, окисление, циклизацию и алкины. Например, фосфолипид может быть функционализован

или перекрестно-сшит с одним или более алкинами (*например*, алкенильной группой, в которой одна или более двойных связей заменены тройной связью). При соответствующих условиях реакции алкиновая группа может подвергаться катализируемому медью циклоприсоединению при воздействии азидов. Такие реакции могут быть полезны для функционализации липидного бислоя ЛНЧ для облегчения проникновения через мембрану или клеточного распознавания или для конъюгации ЛНЧ с полезным компонентом, таким как нацеливающий фрагмент или фрагмент для визуализации (*например*, краситель).

[00450] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ включают один или более некатионных вспомогательных липидов (*например*, нейтральных липидов). Примеры нейтральных вспомогательных липидов включают (1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин) (DLPE), 1,2-дифитаноил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DiPPE), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC), 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DPPE), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DMPE), (1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфо-(1'-рац-глицерин) (DOPG), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DSPE), церамиды и сфингомиелины. В некоторых вариантах осуществления один или более вспомогательных липидов выбраны из 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DSPC); 1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (DLPE); 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DOPC); и 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (DOPE). В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид ЛНЧ содержит, состоит по существу из или состоит из 1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (DLPE) или 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (DOPE). В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит DSPC. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит DOPC. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит DLPE. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит DOPE.

[00451] В некоторых вариантах осуществления фосфолипид выбран из группы, состоящей, без ограничения, 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE), 1,2-дилинолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DLPC), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DMPC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC), 1,2-диундеканоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DUPC), 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (POPC), 1,2-ди-О-октадеценил-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:0 Diether PC), 1-олеоил-2-холестерилгемисукциноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (OChemPC), 1-

гексадецил-sn-глицеро-3-фосфохолин (C16 Lyso PC), 1,2-дилиноленоил-sn-глицеро-3-фосфохолин, (18:3 (cis) PC), 1,2-диарахидоноил-sn-глицеро-3-фосфохолин, (DAPC), 1,2-дидокозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин, (22:6 (cis) PC) 1,2-дифитаноил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (4ME 16,0 PE), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин, (DSPE), 1,2-дилинолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин, (PE(18:2/18:2), 1,2-дилиноленоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин, (PE 18:3 (9Z,12Z, 15Z), 1,2-диарахидоноил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин, (DAPE 18:3 (9Z,12Z, 15Z), 1,2-дидокозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (22:6 (cis) PE), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфо-рац-(1-глицерин) натриевая соль (DOPG) и сфингомиелин.

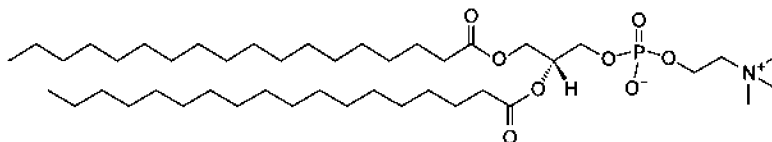
[00452] В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид выбран из группы, состоящей из дистеароил-sn-глицерофосфоэтанолламина, дистеароилфосфатидилхолина (DSPC), диолеоилфосфатидилхолина (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерина (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерина (DPPG), диолеоил-фосфатидилэтанолламина (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилхолина (POPC), пальмитоилолеоилфосфатидилэтанолламина (POPE), диолеоилфосфатидилэтанолламин 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилата (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтанолламина (DPPE), димиристоилфосфоэтанолламина (DMPE), дистеароилфосфатидилэтанолламина (DSPE), монометилфосфатидилэтанолламина, диметилфосфатидилэтанолламина, 18-1-транс PE, 1-стеароил-2-олеоилфосфатидилдиэтанолламина (SOPE), гидрогенизированного соевого фосфатидилхолина (HSPC), яичного фосфатидилхолина (EPC), диолеоилфосфатидилсерина (DOPS), сфингомиелина (SM), димиристоилфосфатидилхолина (DMPC), димиристоилфосфатидилглицерина (DMPG), дистеароилфосфатидилглицерина (DSPG), диерукоилфосфатидилхолина (DEPC), пальмитоилолеоилфосфатидилглицерина (POPG), диелаидоилфосфатидилэтанолламина (DEPE), лецитина, фосфатидилэтанолламина, лизолецитина, лизофосфатидилэтанолламина, фосфатидилсерина, фосфатидилинозитола, сфингомиелина, яичного сфингомиелина (ESM), цефалина, кардиолипина, фосфатидной кислоты, цереброзидов, дицетилфосфата, лизофосфатидилхолина, и дилинолеоилфосфатидилхолина.

[00453] В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид по настоящему изобретению представляет собой DSPC.

[00454] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ включает DSPC. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ включает DOPE. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ включает DMPE. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ включает как DSPC, так и DOPE.

[00455] В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид выбран из группы, состоящей из DSPC DMPE и DOPC или их комбинации.

[00456] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вспомогательный липид представляет собой



[00457] В некоторых вариантах осуществления фосфолипид по настоящему изобретению содержит модифицированный хвост. В некоторых вариантах осуществления фосфолипид представляет собой DSPC (1,2-диооктадеканоил-sn-глицеро-3-фосфохолин) или его аналог с модифицированным хвостом. Как описано в данном документе, «модифицированный хвост» может представлять собой хвост с более короткими или более длинными алифатическими цепями, алифатическими цепями с введенными разветвлениями, алифатическими цепями с введенными заместителями, алифатическими цепями, в которых один или более метиленов заменены циклическими или гетероатомными группами, или любой их комбинацией.

[00458] В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид по настоящему изобретению представляет собой альтернативный липид, который не является фосфолипидом.

[00459] В некоторых вариантах осуществления фосфолипид, применимый в настоящем изобретении, содержит модифицированный хвост. В некоторых вариантах осуществления фосфолипид, применимый в настоящем изобретении, представляет собой DSPC или его аналог, с модифицированным хвостом. Как описано в данном документе, «модифицированный хвост» может представлять собой хвост с более короткими или более длинными алифатическими цепями, алифатическими цепями с введенными разветвлениями, алифатическими цепями с введенными заместителями, алифатическими цепями, в которых один или более метиленов заменены циклическими или гетероатомными группами, или любой их комбинацией.

[00460] В некоторых вариантах осуществления фосфолипид, применимый в настоящем изобретении, содержит модифицированный фосфохолиновый фрагмент, где алкильная цепь, связывающая четвертичный амин с фосфорильной группой, не является этиленом (*например*, n не равно 2).

[00461] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по настоящему изобретению содержит олеиновую кислоту или аналог олеиновой кислоты в качестве вспомогательного липида. В некоторых вариантах осуществления аналог олеиновой

кислоты содержит хвост модифицированной олеиновой кислоты, модифицированный фрагмент карбоновой кислоты или и то, и другое. В некоторых вариантах осуществления аналог олеиновой кислоты представляет собой соединение, в котором фрагмент карбоновой кислоты олеиновой кислоты заменен другой группой.

[00462] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по настоящему изобретению содержит другую цвиттер-ионную группу вместо фосфолипида в качестве вспомогательного липида.

[00463] В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид по настоящему изобретению представляет собой встречающийся в природе мембранный липид. В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид по настоящему изобретению представляет собой 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-O-4'-(N,N,N-триметил)-гомосерин (DGTS), моногалактозилдиацилглицерин (MGDG), дигалактозилдиацилглицерин (DGDG), сульфохиновозилдиацилглицерин (SQDG), 1-пальмитоил-2-цис-9,10-метилгексадеканойл-sn-глицеро-3-фосфохолин (Cyclo PC) или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по настоящему изобретению содержит комбинацию вспомогательных липидов. В некоторых вариантах осуществления комбинация вспомогательных липидов не содержит DSPC. В некоторых вариантах осуществления комбинация вспомогательного липида содержит DSPC. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ, содержащие один или несколько мембранных липидов природного происхождения (*например*, DGTS), обладают улучшенными показателями трансфекции/доставки в печень молекулы-мишени, инкапсулированной в ЛНЧ, по сравнению с ЛНЧ, содержащими DSPC в качестве единственного вспомогательного липида.

[00464] В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид по изобретению представляет собой 5-гептадецилрезорцин или его производное.

Структурный липид

[00465] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по настоящему изобретению содержит один или более структурных липидов. Включение структурных липидов в липидную наночастицу может способствовать уменьшению агрегации других липидов в частице. Структурные липиды могут быть, но не ограничиваются ими, стеролами или липидами, содержащими фрагменты стеролов.

[00466] В некоторых вариантах осуществления структурный липид ЛНЧ представляет собой стерол (*например*, фитостеролы или зоостеролы). В некоторых вариантах осуществления стерол представляет собой холестерин или его аналог или производное. В некоторых вариантах осуществления стерол представляет собой

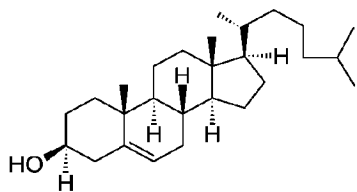
холестерин. В некоторых вариантах осуществления стерол представляет собой холестерин, β -ситостерол, фекостерол, эргостерол, ситостерол, кампестерол, стигмастерол, брассикастерол, эргостерол, томатидин, томатин, урсоловую кислоту, альфа-токоферол, включая их аналоги, соли или сложные эфиры, отдельно или в комбинации.

[00467] В некоторых вариантах осуществления структурный липид ЛНЧ представляет собой холестерин, кортикостероид (такой как, например, преднизолон, дексаметазон, преднизон и гидрокортизон) или их комбинацию.

[00468] В некоторых вариантах осуществления структурный липид ЛНЧ представляет собой фитостерол. В некоторых вариантах осуществления фитостерол представляет собой ситостерол, стигмастерол, кампестерол, ситостанол, кампестанол, брассикастерол, фукостерол, бета-ситостерол, стигмастанол, бета-ситостанол, эргостерол, лупеол, циклоартенол, А5-авенасерол, А7-авенасерол или А7-стигмастерол, включая их аналоги, соли или сложные эфиры, отдельно или в комбинации.

[00469] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит один или более фитостеролов. В некоторых вариантах осуществления фитостериновый компонент ЛНЧ представляет собой один фитостерол. В некоторых вариантах осуществления фитостериновый компонент ЛНЧ по настоящему изобретению представляет собой смесь различных фитостеролов (*например*, 2, 3, 4, 5 или 6 различных фитостеролов). В некоторых вариантах осуществления фитостериновый компонент ЛНЧ по настоящему изобретению представляет собой смесь одного или более фитостеролов и одного или более зоостеролов, такую как смесь фитостерола (*например*, ситостерола, такого как бета-ситостерол) и холестерина.

[00470] В некоторых вариантах осуществления изобретения структурный липид ЛНЧ представляет собой холестерин:



[00471] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит катионный липид и один или более вспомогательных липидов, при этом катионный липид представляет собой DOTAP. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит катионный липид и один или более вспомогательных липидов, при этом катионный липид представляет собой DLin-MC3-DMA (MC3). В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит катионный липид и один или более вспомогательных липидов, при этом

катионный липид представляет собой COATSOME® SS-EC. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит катионный липид и один или более вспомогательных липидов, при этом катионный липид представляет собой COATSOME® SS-LC. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит катионный липид и один или более вспомогательных липидов, при этом катионный липид представляет собой COATSOME® SS-OC. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит катионный липид и один или более вспомогательных липидов, при этом катионный липид представляет собой COATSOME® SS-OP. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит катионный липид и один или более вспомогательных липидов, при этом катионный липид представляет собой L-319. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ дополнительно содержит структурный липид. В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой холестерин.

[00472] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит катионный липид и один или более вспомогательных липидов. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит катионный липид и один или более вспомогательных липидов, при этом один или более вспомогательных липидов включают DLPE. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит катионный липид и один или более вспомогательных липидов, при этом один или более вспомогательных липидов включают DSPC. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит катионный липид и один или более вспомогательных липидов, при этом один или более вспомогательных липидов включают DOPE. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит катионный липид и один или более вспомогательных липидов, при этом один или более вспомогательных липидов включают DOPC. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ дополнительно содержит структурный липид. В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой холестерин.

[00473] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит катионный липид, вспомогательный липид и структурный липид. В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой холестерин. В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой DOTAP, а вспомогательный липид представляет собой DLPE. В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой MC3, а вспомогательный липид представляет собой DSPC. В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид представляет собой DOPE. В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид представляет собой DSPC. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит катионный липид, структурный липид и по меньшей мере

два вспомогательных липида, причем катионный липид представляет собой DOTAP, а по меньшей мере два вспомогательных липида включают DLPE и DSPE. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит катионный липид, структурный липид и по меньшей мере два вспомогательных липида, при этом катионный липид представляет собой MC3, а по меньшей мере два вспомогательных липида включают DSPC и DMG. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два вспомогательных липида включают DOPE и DSPE. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два вспомогательных липида включают DSPC и DMG. В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой холестерин. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит DOTAP, холестерин и DLPE. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит MC3, холестерин и DSPC. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит DOTAP, холестерин и DOPE. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит DOTAP, холестерин, DLPE и DSPE. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит MC3, холестерин, DSPC и DMG. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит DOTAP, холестерин, DLPE и DSPE-ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит MC3, холестерин, DSPC и DMG-ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит DOTAP, холестерин, DOPE и DSPE. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит DOTAP, холестерин, DOPE и DSPE-ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит SS-OC, DSPC, холестерин и DPG-ПЭГ (*например*, DPG-PEG2K). В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит SS-OC, DSPC, холестерин и ПЭГ-липид формулы (I) (*например*, BRIJ™ S100).

Молярное соотношение липидов в составе ЛНЧ

[00474] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по настоящему изобретению содержит от 40 мол.% до 70 мол.% катионного липида, до 50 мол.% вспомогательного липида, от 10 мол.% до 50 мол.% структурного липида и от 0,001 мол.% до 5 мол.% ПЭГ-липиды, включая все конечные точки. В некоторых вариантах осуществления общий мол.% катионного липида, вспомогательного липида, структурного липида и ПЭГ-липиды составляет 100%.

[00475] В некоторых вариантах осуществления мол.% катионного липида в ЛНЧ составляет 40-70 мол.%, 40-55 мол.%, 40-50 мол.%, 40-45 мол.%, 44-54 мол.%, 45-60 мол.%, 45-55 мол.%, 45-50 мол.%, 50-60 мол.%, 49-64 мол.%, 50-55 мол.% или 55-60 мол.%. В некоторых вариантах осуществления мол.% катионного липида в ЛНЧ составляет 44-54 мол.%. В некоторых вариантах осуществления мол.% катионного липида в ЛНЧ составляет 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59

или 60 мол.%. В некоторых вариантах осуществления мол.% катионного липида в ЛНЧ составляет около 40, около 41, около 42, около 43, около 44, около 45, около 46, около 47, около 48, около 49, около 50, около 51, , около 52, около 53, около 54, около 55, около 56, около 57, около 58, около 59 или около 60 мол.%. Все значения включают все конечные точки.

[00476] В некоторых вариантах осуществления мол.% структурного липида в ЛНЧ составляет 10-60 мол.%, 10-30 мол.%, 15-35 мол.%, 20-40 мол.%, 20-45 мол.%, 25-33 мол.%, 24-32 мол.%, 25-45 мол.%, 30-50 мол.%, 35-43 мол.%, 35-55 мол.% или 40-60 мол.%. В некоторых вариантах осуществления мол.% структурного липида в ЛНЧ составляет 20-45 мол.%. В некоторых вариантах осуществления мол.% структурного липида в ЛНЧ составляет 24-32 мол.%. В некоторых вариантах осуществления мол.% структурного липида в ЛНЧ составляет 25-33 мол.%. В некоторых вариантах осуществления мол.% структурного липида в ЛНЧ составляет 22-28 мол.%. В некоторых вариантах осуществления мол.% структурного липида в ЛНЧ составляет 35-45 мол.%. В некоторых вариантах осуществления мол.% структурного липида в ЛНЧ составляет 35-43 мол.%. В некоторых вариантах осуществления мол.% структурного липида в ЛНЧ составляет 10-60 мол.%. В некоторых вариантах осуществления мол % структурного липида в ЛНЧ составляет 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, or 60 мол %. В некоторых вариантах осуществления мол % структурного липида в ЛНЧ составляет около 10, около 11, около 12, около 13, около 14, около 15, около 16, около 17, около 18, около 19, около 20, около 21, около 22, около 23, около 24, около 25, около 26, около 27, около 28, около 29, около 30, около 31, около 32, около 33, около 34, около 35, около 36, около 37, около 38, около 39, около 40, около 41, около 42, около 43, около 44, около 45, около 46, около 47, около 48, около 49, около 50, около 51, около 52, около 53, около 54, около 55, около 56, около 57, около 58, около 59 или около 60 мол %. В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой холестерин. Все значения включают все конечные точки.

[00477] В некоторых вариантах осуществления мол.% вспомогательного липида в ЛНЧ составляет 1-50 мол.%. В некоторых вариантах осуществления мол.% вспомогательного липида в ЛНЧ составляет до 29 мол.%. В некоторых вариантах осуществления мол.% вспомогательного липида в ЛНЧ составляет 1-10 мол.%, 5-9 мол.%, 5-15 мол.%, 8-14 мол.%, 18-22%, 19-25 мол.%, 10-20 мол.%, 10-25 мол.%, 15-25 мол.%, 20-30 мол.%, 25-35 мол.%, 30-40 мол.% или 35-50 мол.%. В некоторых вариантах осуществления мол.% вспомогательного липида в ЛНЧ составляет 10-25 мол.%. В

некоторых вариантах осуществления мол.% вспомогательного липида в ЛНЧ составляет 5-9 мол.%. В некоторых вариантах осуществления мол.% вспомогательного липида в ЛНЧ составляет 8-14 мол.%. В некоторых вариантах осуществления мол.% вспомогательного липида в ЛНЧ составляет 18-22 мол.%. В некоторых вариантах осуществления мол.% вспомогательного липида в ЛНЧ составляет 19-25 мол.%. В некоторых вариантах осуществления мол.% вспомогательного липида в ЛНЧ составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 мол.%. В некоторых вариантах осуществления мол.% вспомогательного липида в ЛНЧ составляет около 1, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 11, около 12, около 13, около 14, около 15, около 16, около 17, около 18, около 19, около 20, около 21, около 22, около 23, около 24, около 25, около 26, около 27, около 28, около 29, около 30, около 31, около 32, около 33, около 34, около 35, около 36, около 37, около 38, около 39 или около 40 мол.%. В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид представляет собой DSPC. Все значения включают все конечные точки.

[00478] В некоторых вариантах осуществления мол.% ПЭГ-липид в ЛНЧ превышает 0 мол.% и составляет до 5 мол.% от общего количества липидов, присутствующих в ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления мол.% ПЭГ-липид составляет 0,1 мол.%, 0,2 мол.%, 0,25 мол.%, 0,3 мол.%, 0,4 мол.%, 0,5 мол.%, 0,6 мол.%, 0,7 мол.%, 0,8 мол.%, 0,9 мол.%, 1,0 мол.%, 1,1 мол.%, 1,2 мол.%, 1,3 мол.%, 1,4 мол.%, 1,5 мол.%, 1,6 мол.%, 1,7 мол.%, 1,8 мол.%, 1,9 мол.%, 2,0 мол.%, 2,1 мол.%, 2,2 мол.%, 2,3 мол.%, 2,4 мол.%, 2,5 мол.%, 2,6 мол.%, 2,7 мол.%, 2,8 мол.%, 2,9 мол.%, 3,0 мол.%, 3,1 мол.%, 3,2 мол.%, 3,3 мол.%, 3,4 мол.%, 3,5 мол.%, 4,0 мол.%, 4,5 мол.% или 5 мол.% от общего количества липидов, присутствующих в ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления мол.% ПЭГ-липид составляет около 0,1 мол.%, около 0,2 мол.%, около 0,25 мол.%, около 0,3 мол.%, около 0,4 мол.%, около 0,5 мол.%, около 0,6 мол.%, около 0,7 мол.%, около 0,8 мол.%, около 0,9 мол.%, около 1,0 мол.%, около 1,1 мол.%, около 1,2 мол.%, около 1,3 мол.%, около 1,4 мол.%, около 1,5 мол.%, около 1,6 мол.%, около 1,7 мол.%, около 1,8 мол.%, около 1,9 мол.%, около 2,0 мол.%, около 2,1 мол.%, около 2,2 мол.%, около 2,3 мол.%, около 2,4 мол.%, около 2,5 мол.%, около 2,6 мол.%, около 2,7 мол.%, около 2,8 мол.%, около 2,9 мол.%, около 3,0 мол.%, около 3,1 мол.%, около 3,2 мол.%, около 3,3 мол.%, около 3,4 мол.%, около 3,5 мол.%, около 4,0 мол.%, около 4,5 мол.% или около 5 мол.% от общего количества липидов, присутствующих в ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления мол.% ПЭГ-липид составляет по меньшей мере 0,1 мол.%, по меньшей мере 0,2 мол.%, по меньшей мере 0,25 мол.%, по меньшей мере 0,3

мол.%, по меньшей мере 0,4 мол.%, по меньшей мере 0,5 мол.%, по меньшей мере 0,6 мол.%, по меньшей мере 0,7 мол.%, по меньшей мере 0,8 мол.%, по меньшей мере 0,9 мол.%, по меньшей мере 1,0 мол.%, по меньшей мере 1,1 мол.%, по меньшей мере 1,2 мол.%, по меньшей мере 1,3 мол.%, по меньшей мере 1,4 мол.%, по меньшей мере 1,5 мол.%, по меньшей мере 1,6 мол.%, по меньшей мере 1,7 мол.%, по меньшей мере 1,8 мол.%, по меньшей мере 1,9 мол.%, по меньшей мере 2,0 мол.%, по меньшей мере 2,1 мол.%, по меньшей мере 2,2 мол.%, по меньшей мере 2,3 мол.%, по меньшей мере 2,4 мол.%, по меньшей мере 2,5 мол.%, по меньшей мере 2,6 мол.%, по меньшей мере 2,7 мол.%, по меньшей мере 2,8 мол.%, по меньшей мере 2,9 мол.%, по меньшей мере 3,0 мол.%, по меньшей мере 3,1 мол.%, по меньшей мере 3,2 мол.%, по меньшей мере 3,3 мол.%, по меньшей мере 3,4 мол.%, по меньшей мере 3,5 мол.%, по меньшей мере 4,0 мол.%, по меньшей мере 4,5 мол.% или по меньшей мере 5 мол.% от общего количества липидов, присутствующих в ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления мол.% ПЭГ-липидов составляет не более 0,1 мол.%, не более 0,2 мол.%, не более 0,25 мол.%, не более 0,3 мол.%, не более 0,4 мол.%, не более 0,5 мол.%, не более 0,6 мол.%, не более 0,7 мол.%, не более 0,8 мол.%, не более 0,9 мол.%, не более 1,0 мол.%, не более 1,1 мол.%, не более 1,2 мол.%, не более 1,3 мол.%, не более 1,4 мол.%, не более 1,5 мол.%, не более 1,6 мол.%, не более 1,7 мол.%, не более 1,8 мол.%, не более 1,9 мол.%, не более 2,0 мол.%, не более 2,1 мол.%, не более 2,2 мол.%, не более 2,3 мол.%, не более 2,4 мол.%, не более 2,5 мол.%, не более 2,6 мол.%, не более 2,7 мол.%, не более 2,8 мол.%, не более 2,9 мол.%, не более 3,0 мол.%, не более 3,1 мол.%, не более 3,2 мол.%, не более 3,3 мол.%, не более 3,4 мол.%, не более 3,5 мол.%, не более 4,0 мол.%, не более 4,5 мол.% или не более 5 мол.% от общего количества липидов, присутствующих в ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления мол.% ПЭГ-липидов составляет от 0,1 мол.% до 4 мол.% от общего количества липидов, присутствующих в ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления мол.% ПЭГ-липидов составляет от 0,1 мол.% до 2 мол.% от общего количества липидов, присутствующих в ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления мол.% ПЭГ-липидов составляет от 0,2 мол.% до 0,8 мол.%, от 0,4 мол.% до 0,6 мол.%, 0,7 мол.% до 1,3 мол.%, от 1,2 мол.% до 1,8 мол.% или от 1 мол.% до 3,5 мол.% от общего количества липидов, присутствующих в ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления мол.% ПЭГ-липидов составляет 0,1-0,7 мол.%, 0,2-0,8 мол.%, 0,3-0,9 мол.%, 0,4-0,8 мол.%, 0,4-0,6 мол.%, 0,4-1 мол.%, 0,5-1,1 мол.%, 0,6-1,2 мол.%, 0,7-1,3 мол.%, 0,8-1,4 мол.%, 0,9-1,5 мол.%, 1-3,5 мол.%, 1-1,6 мол.%, 1,1-1,7 мол.%, 1,2-1,8 мол.%, 1,3-1,9 мол.%, 1,4-2 мол.%, 1,5-2,1 мол.%, 1,6-2,2 мол.%, 1,7-2,3 мол.%, 1,8-2,4 мол.%, 1,9-2,5 мол.%, 2-2,6 мол.%, 2,4-3,8 мол.% или 2,6-3,4 мол.% от общего количества липидов, присутствующих в ЛНЧ. Все

значения включают все конечные точки.

[00479] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по данному изобретению содержит 44-60 мол.% катионного липида, 19-25 мол.% вспомогательного липида, 25-33 мол.% структурного липида и 0,2-0,8 мол.% ПЭГ-липид, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по данному изобретению содержит 44-54 мол.% катионного липида, 19-25 мол.% вспомогательного липида, 24-32 мол.% структурного липида и 1,2-1,8 мол.% ПЭГ-липид, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по данному изобретению содержит 44-54 мол.% катионного липида, 8-14 мол.% вспомогательного липида, 35-43 мол.% структурного липида и 1,2-1,8 мол.% ПЭГ-липид, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по данному изобретению содержит 45-55 мол.% катионного липида, 5-9 мол.% вспомогательного липида, 36-44 мол.% структурного липида и 2,5-3,5 мол.% ПЭГ-липид, включая конечные точки.

[00480] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по настоящему изобретению содержит один или более катионных липидов по настоящему изобретению, один или более вспомогательных липидов по настоящему изобретению, один или более структурных липидов по настоящему изобретению и один или более ПЭГ-липидов по настоящему изобретению, выраженных в мол % от общего количества липидов (или диапазон мол % от общего количества липидов) в ЛНЧ в соответствии с **Таблицей 6** ниже. В некоторых вариантах осуществления общий мол % этих четырех липидных компонентов равен 100%. В некоторых вариантах осуществления общий мол % этих четырех липидных компонентов составляет менее 100%. В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой соединение формулы (I) или соединение, выбранное из **таблицы 21**. В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой холестерин. В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид представляет собой DSPC. В некоторых вариантах осуществления изобретения ПЭГ-липид имеет формулу (A), формулу (A') или формулу (A'').

Таблица 6: Мол % липидных компонентов в ЛНЧ

Катионный липид (мол %)	Структурный липид (мол %)	Вспомогательный липид (мол %)	ПЭГ-липид (мол %)
49	28,5	22	0,5
47-52	27-30	21-23	0,4-0,6
44-54	25-32	19-25	0,2-0,8
44-54	25-33	19-25	0,2-0,8
49	27,5	22	1,5

47-52	26-29	21-23	1,3-1,7
44-54	24-31	19-25	1,1-1,9
44-54	24-32	19-25	1,2-1,8
49	39,5	11	0,5
47-52	38-41	11-13	0,4-0,6
44-54	36-43	9-15	0,2-0,8
49	38,5	11	1,5
47-52	37-40	11-13	1,3-1,7
44-54	35-42	9-15	1,1-1,9
44-54	35-43	8-14	1,2-1,8
20-60	10-60	≥ 20	0,5
20-60	10-60	≥ 20	0,3-0,7
20-60	10-60	≥ 20	0,1-0,9
20-60	10-60	10	1,5
20-60	10-60	8-12	1,3-1,7
20-60	10-60	6-14	1,1-1,9
50	40	7	3
45-55	35-45	5-9	2,5-3,5
54,5	25	20	0,5
50-60	22-28	18-22	0,3-0,7
54,6	25,1	20,1	0,25
44,5	50	5	0,5
40	50	8,75	1,25
60	25	14,5	0,5
60	34,3	5	0,7
50	42,5	7	0,5
58	33,5	7	1,5
58	34,5	7	0,5
35-65	25-55	5-25	0,3-3
49	28,5	22	0,5
40	39,5	20	0,5
40	50	8,75	1,25
60	34,3	5	0,7
54,6	25,1	20,1	0,25
50,1	42,6	7	0,24

[00481] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по данному изобретению содержит 44-54 мол.% катионного липида, 19-25 мол.% вспомогательного липида, 25-33 мол.% структурного липида и 0,2-0,8 мол.% ПЭГ-липиды, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по данному изобретению содержит 44-54 мол. % соединения формулы (II-1a), 19-25 мол. % DSPC, 25-33 мол. % холестерина и 0,2-0,8 мол. % ПЭГ-липиды, выбранного из HO-PEG100-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₄CH₃, HO-PEG20-C₁₈H₃₅, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃,

HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃ и HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, включая конечные точки.

[00482] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по данному изобретению содержит 44-54 мол.% катионного липида, 19-25 мол.% вспомогательного липида, 24-32 мол.% структурного липида и 1,2-1,8 мол.% ПЭГ-липид, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по данному изобретению содержит 44-54 мол. % соединения формулы (II-1a), 19-25 мол. % DSPC, 24-32 мол. % холестерина и 1,2-1,8 мол. %. ПЭГ-липид, выбранного из HO-PEG100-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₄CH₃, HO-PEG20-C₁₈H₃₅, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃ и HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, включая конечные точки.

[00483] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по данному изобретению содержит 44-54 мол. % катионного липида, 8-14 мол. % вспомогательного липида, 35-43 мол. % структурного липида и 1,2-1,8 мол. % ПЭГ-липид, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по данному изобретению содержит 44-54 мол. % соединения формулы (II-1a), 8-14 мол. % DSPC, 35-43 мол. % холестерина и 1,2-1,8 мол. %. ПЭГ-липид, выбранного из HO-PEG100-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₄CH₃, HO-PEG20-C₁₈H₃₅, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃ и HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, включая конечные точки.

[00484] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит SS-OC, DSPC, холестерин (Chol) и ПЭГ-липид, при этом соотношение SS-OC:DSPC:Chol:ПЭГ-липид (в процентах от общего содержания липидов) составляет около A:B:C:D, где A = 40 мол. % - 60 мол. %, B = 10 мол. % - 25 мол. %, C = 20 мол. % - 30 мол. % и D = 0 мол. % - 3 мол. % и где A+B+C+D = 100 мол.%. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит SS-OC, DSPC, холестерин (Chol) и ПЭГ-липид, при этом соотношение SS-OC:DSPC:Chol:ПЭГ-липид (в процентах от общего содержания липидов) составляет около A:B:C:D, где A = 45 мол. % - 50 мол. %, B = 20 мол. % - 25 мол. %, C = 25 мол. % - 30 мол. % и D = 0 мол. % - 1 мол. % и где A+B+C+D = 100 мол.%. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит SS-OC, DSPC, холестерин (Chol) и ПЭГ-липид, при этом соотношение SS-OC:DSPC:Chol:ПЭГ-липид (в процентах от общего содержания липидов) составляет около 49:22:28,5:0,5. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (A), формулы (A') или формулы (A''). В

некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид выбран из группы, состоящей из BRIJ™ S100, BRIJ™ S20, BRIJ™ O20 и BRIJ™ C20. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой BRIJ™ S100.

[00485] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ включает DOTAP, холестерин (Chol) и DLPE, при этом соотношение DOTAP:Chol:DLPE (в процентах от общего содержания липидов) составляет около 50:35:15. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ включает DOTAP, холестерин (Chol) и DLPE, при этом соотношение DOTAP:Chol:DOPE (в процентах от общего содержания липидов) составляет около 50:35:15. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ включает DOTAP, холестерин (Chol), DLPE, DSPE-ПЭГ, при этом соотношение DOTP:Chol:DLPE (в процентах от общего содержания липидов) составляет около 50:35:15, и при этом частица включает около 0,2 мол. % DSPE-ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ включает MC3, холестерин (Chol), DSPC и DMG-ПЭГ, при этом соотношение MC3:Chol:DSPC:DMG-ПЭГ (в процентах от общего содержания липидов) составляет около 49:38,5:11:1,5.

[00486] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит SS-OC, DSPC, холестерин (Chol) и DPG-PEG2K, при этом соотношение SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K (в процентах от общего содержания липидов) составляет около A:B:C:D, где A = 40 мол. % - 60 мол. %, B = 10 мол. % - 25 мол. %, C = 20 мол. % - 30 мол. % и D = 0 мол. % - 3 мол. % и где A+B+C+D = 100 мол.%. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит SS-OC, DSPC, холестерин (Chol) и DPG-PEG2K, при этом соотношение SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K (в процентах от общего содержания липидов) составляет около A:B:C:D, где A = 45 мол. % - 50 мол. %, B = 20 мол. % - 25 мол. %, C = 25 мол. % - 30 мол. % и D = 0 мол. % - 1 мол. % и где A+B+C+D = 100 мол.%. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит SS-OC, DSPC, холестерин (Chol) и DPG-PEG2K, при этом соотношение SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K (в процентах от общего содержания липидов) составляет около 49:22:28,5:0,5.

[00487] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит SS-OC, DSPC, холестерин (Chol) и DPG-PEG2K, при этом соотношение SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K (в процентах от общего содержания липидов) составляет около A:B:C:D, где A = 40 мол. % - 60 мол. %, B = 10 мол. % - 30 мол. %, C = 20 мол. % - 45 мол. % и D = 0 мол. % - 3 мол. % и где A+B+C+D = 100 мол.%. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит SS-OC, DSPC, холестерин (Chol) и DPG-PEG2K, при этом соотношение SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K (в процентах от общего содержания липидов) составляет около A:B:C:D, где A = 40 мол. % - 60 мол. %, B = 10 мол. % - 30 мол. %, C = 25 мол. % - 45 мол. % и D = 0 мол. % - 3 мол. % и где A+B+C+D = 100 мол.%. В некоторых вариантах

осуществления ЛНЧ содержит SS-OC, DSPC, холестерин (Chol) и DPG-PEG2K, при этом соотношение SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K (в процентах от общего содержания липидов) составляет около A:B:C:D, где A = 45 мол. % - 55 мол. %, B = 10 мол. % - 20 мол. %, C = 30 мол. % - 40 мол. % и D = 1 мол. % - 2 мол. % и где A+B+C+D = 100 мол.%. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит SS-OC, DSPC, холестерин (Chol) и DPG-PEG2K, при этом соотношение SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K (в процентах от общего содержания липидов) составляет около A:B:C:D, где A = 45 мол. % - 50 мол. %, B = 10 мол. % - 15 мол. %, C = 35 мол. % - 40 мол. % и D = 1 мол. % - 2 мол. % и где A+B+C+D = 100 мол.%. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит SS-OC, DSPC, холестерин (Chol) и DPG-PEG2K, при этом соотношение SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K (в процентах от общего содержания липидов) составляет 49:11:38,5:1,5.

[00488] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит SS-OC, DSPC, холестерин (Chol) и DPG-PEG2K, при этом соотношение SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K (в процентах от общего содержания липидов) составляет около A:B:C:D, где A = 45 мол. % - 65 мол. %, B = 5 мол. % - 20 мол. %, C = 20 мол. % - 45 мол. % и D = 0 мол. % - 3 мол. % и где A+B+C+D = 100 мол.%. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит SS-OC, DSPC, холестерин (Chol) и DPG-PEG2K, при этом соотношение SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K (в процентах от общего содержания липидов) составляет около A:B:C:D, где A = 50 мол. % - 60 мол. %, B = 5 мол. % - 15 мол. %, C = 30 мол. % - 45 мол. % и D = 0 мол. % - 3 мол. % и где A+B+C+D = 100 мол.%. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит SS-OC, DSPC, холестерин (Chol) и DPG-PEG2K, при этом соотношение SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K (в процентах от общего содержания липидов) составляет около A:B:C:D, где A = 55 мол. % - 60 мол. %, B = 5 мол. % - 15 мол. %, C = 30 мол. % - 40 мол. % и D = 1 мол. % - 2 мол. % и где A+B+C+D = 100 мол.%. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит SS-OC, DSPC, холестерин (Chol) и DPG-PEG2K, при этом соотношение SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K (в процентах от общего содержания липидов) составляет около A:B:C:D, где A = 55 мол. % - 60 мол. %, B = 5 мол. % - 10 мол. %, C = 30 мол. % - 35 мол. % и D = 1 мол. % - 2 мол. % и где A+B+C+D = 100 мол.%. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит SS-OC, DSPC, холестерин (Chol) и DPG-PEG2K, при этом соотношение SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K (в процентах от общего содержания липидов) составляет 58:7:33,5:1,5.

[00489] В некоторых вариантах осуществления наночастица покрыта гликозаминогликаном (ГАГ) для того, чтобы модулировать или облегчить поглощение наночастицы клетками-мишенями. ГАГ может представлять собой гепарин/сульфат гепарина, сульфат хондроитина/сульфат дермантана, сульфат кератина или гиалуроновую

кислоту (ГК). В конкретном варианте осуществления поверхность наночастицы покрыта ГК и нацеливает частицы на поглощение опухолевыми клетками. В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица покрыта три-пептидом аргинин-глицин-аспартат (RGD-пептиды) (См. Ruoslahti, *Advanced Materials*, 24, 2012, 3747-3756 и Bellis *et al.*, *Biomaterials*, 32(18), 2011, 4205-4210).

Свойства композиций ЛНЧ

[00490] В изобретении предложены композиции (например, фармацевтические композиции), содержащие множество ЛНЧ, как описано в данном документе. В данном документе также предложены композиции, содержащие ЛНЧ, как описано в данном документе, и инкапсулированные молекулы.

[00491] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по настоящему изобретению может снижать иммунный ответ *in vivo* по сравнению с контрольной ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления контрольная ЛНЧ представляет собой ЛНЧ, содержащую ПЭГ-липид, не относящийся к формуле (A), формуле (A') или формуле (A''). В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид контрольной ЛНЧ представляет собой PEG2k-DPG. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид контрольной ЛНЧ представляет собой PEG2k-DMG. В некоторых вариантах осуществления контрольная ЛНЧ имеет такое же молярное соотношение ПЭГ-липида, что и ЛНЧ по данному изобретению. В некоторых вариантах осуществления контрольная ЛНЧ идентична ЛНЧ по настоящему изобретению, за исключением того, что контрольная ЛНЧ содержит ПЭГ-липид, который не относится к формуле (A), формуле (A') или формуле (A'') (*например*, контрольная ЛНЧ может содержать PEG2k-DPG или PEG2k-DMG в качестве ПЭГ-липида).

[00492] В некоторых вариантах осуществления контрольная ЛНЧ представляет собой ЛНЧ, содержащую катионный липид, который не относится к формуле (I). В некоторых вариантах осуществления катионный липид контрольной ЛНЧ представляет собой SS-OC. В некоторых вариантах осуществления контрольная ЛНЧ имеет такое же молярное соотношение катионного липида, что и ЛНЧ по данному изобретению. В некоторых вариантах осуществления контрольная ЛНЧ идентична ЛНЧ по настоящему изобретению, за исключением того, что контрольная ЛНЧ содержит липид, который не относится к формуле или формуле (I) (*например*, контрольная ЛНЧ может содержать SS-OC в качестве катионного липида).

[00493] В некоторых вариантах осуществления снижение иммунного ответа может представлять собой снижение ускоренного клиренса из крови (ABC). В некоторых вариантах осуществления ABC связан с секрецией природного IgM и/или анти-ПЭГ IgM.

В контексте данного документа термин «естественный IgM» относится к циркулирующему IgM в сыворотке крови, который существует независимо от известного воздействия на иммунную систему (*например*, воздействия ЛНЧ по настоящему изобретению). Термин «снижение ABC» относится к любому снижению ABC по сравнению с контрольной ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления снижение ABC может представлять собой снижение скорости выведения ЛНЧ при приеме второй или последующей дозы по сравнению с контрольной ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления снижение может составлять по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % или 100 %. В некоторых вариантах осуществления снижение составляет от около 10% до около 100%, от около 10 до около 50%, от около 20 до около 100%, от около 20 до около 50%, от около 30 до около 100%, от около 30 до около 50%, от около 40% до около 100%, от около 40 до около 80%, от около 50 до около 90% или от около 50 до около 100%. В некоторых вариантах осуществления снижение ABC можно измерить по увеличению или устойчивому определяемому уровню инкапсулированного синтетического РНК-вирусного генома после второго или последующего введения. В некоторых вариантах осуществления снижение ABC может привести к увеличению (*например*, 2-кратному, 3-кратному, 4-кратному, 5-кратному или большему увеличению) уровня инкапсулированного синтетического РНК-вирусного генома по сравнению с уровнем инкапсулированного синтетического РНК-вирусного генома после введения контрольной ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления сниженный уровень ABC связан с более низким уровнем анти-ПЭГ IgM в сыворотке.

[00494] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ по настоящему изобретению может задерживать выведение ЛНЧ и ее компонентов при повторном дозировании по сравнению с контрольной ЛНЧ, которая может выводиться до высвобождения инкапсулированной молекулы. Соответственно, ЛНЧ по настоящему изобретению может повышать эффективность доставки инкапсулированной молекулы (*например*, синтетического РНК-вирусного генома) в последующих дозах.

[00495] В некоторых вариантах осуществления средний размер (т.е., средний внешний диаметр) ЛНЧ составляет от около 50 нм до около 500 нм. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеют средний размер от около 50 нм до около 200 нм, от около 100 нм до около 200 нм, от около 150 нм до около 200 нм, от около 50 нм до около 100 нм, от около 50 нм до около 150 нм, от около 100 нм до около 150 нм, от около 200 нм до около 250 нм, от около 250 нм до около 300 нм, от около 300 нм до около 400 нм, от около 150 нм до около 500 нм, от около 200 нм до около 500 нм, около от около 300 нм до

около 500 нм, от около 350 нм до около 500 нм, от около 400 нм до около 500 нм, от около 425 нм до около 500 нм, от около 450 нм до около 500 нм или от около 475 нм до около 500 нм. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеют средний размер около 50 нм, 60 нм, 70 нм, 80 нм, 90 нм, 100 нм, 110 нм, около 120 или около 125 нм. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеют средний размер около 100 нм. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеют средний размер от 50 нм до 150 нм. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеют средний размер (средний внешний диаметр) от 50 нм до 150 нм, от 50 нм до 125 нм, от 50 нм до 100 нм, от 50 нм до 75 нм, от 75 нм до 150 нм, от 75 нм до 125 нм, от 75 нм до 100 нм, от 100 нм до 150 нм, от 100 нм до 125 нм или от 125 нм до 150 нм. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеют средний размер от 70 нм до 90 нм, от 80 нм до 100 нм, от 90 нм до 110 нм, от 100 нм до 120 нм, от 110 нм до 130 нм, от 120 нм до 140 нм или от 130 до 150 нм. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеют средний размер от 90 нм до 110 нм. Все значения включают конечные точки.

[00496] В некоторых вариантах осуществления средний размер (*т.е.*, средний внешний диаметр) ЛНЧ составляет от около 50 нм до около 150 нм. В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложена терапевтическая композиция, содержащая множество липидных наночастиц, где множество ЛНЧ имеют средний размер от около 60 нм до около 130 нм. В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложена терапевтическая композиция, содержащая множество липидных наночастиц, где множество ЛНЧ имеют средний размер от около 70 нм до около 120 нм. В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложена терапевтическая композиция, содержащая множество липидных наночастиц, где множество ЛНЧ имеют средний размер около 70 нм. В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложена терапевтическая композиция, содержащая множество липидных наночастиц, где множество ЛНЧ имеют средний размер около 80 нм. В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложена терапевтическая композиция, содержащая множество липидных наночастиц, где множество ЛНЧ имеют средний размер около 90 нм. В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложена терапевтическая композиция, содержащая множество липидных наночастиц, где множество ЛНЧ имеют средний размер около 100 нм. В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложена терапевтическая композиция, содержащая множество липидных наночастиц, где множество ЛНЧ имеют средний размер около 110 нм. Все значения включают конечные точки.

[00497] В некоторых вариантах осуществления эффективность инкапсуляции

синтетического РНК-вирусного генома с помощью ЛНЧ составляет около 70 %, около 75 %, около 80 %, около 85 %, около 90 %, около 91 %, около 92 %, около 93 %, около 94 %, около 95 %, около 96 %, около 97 %, около 98 %, около 99 % или 100 %. В некоторых вариантах осуществления около 70%, около 75%, около 80%, около 90%, около 95%, около 97%, около 98% или около 99% множества ЛНЧ содержат инкапсулированный синтетический РНК-вирусный геном. В некоторых вариантах осуществления эффективность инкапсуляции синтетического РНК-вирусного генома с помощью ЛНЧ составляет не менее 70 %, не менее 75 %, не менее 80 %, не менее 85 %, не менее 90 %, не менее 91 %, не менее 92 %, не менее 93 %, не менее 94 %, не менее 95 %, не менее 96 %, не менее 97 %, не менее 98 %, не менее 99 % или 100 %. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% множества ЛНЧ содержат инкапсулированный синтетический РНК-вирусный геном. В некоторых вариантах осуществления от около 70% до 100%, от около 75% до 100%, от около 80% до 100%, от около 85% до 100%, от около 90% до 100%, от около 91% до 100%, от около 92% до 100%, от около 93% до 100%, от около 94% до 100%, от около 95% до 100%, от около 96% до 100%, от около 97% до 100%, от около 98% до 100%, от около 99% до 100% множества ЛНЧ содержат инкапсулированный синтетический РНК-вирусный геном.

[00498] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеют нейтральный заряд (*например*, средний дзета-потенциал от около 0 мВ до 1 мВ). В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеют средний дзета-потенциал от около 40 мВ до около -40 мВ. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеют средний дзета-потенциал от около 40 мВ до около 0 мВ. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеют средний дзета-потенциал от около 35 мВ до около 0 мВ, от около 30 мВ до около 0 мВ, от около 25 мВ до около 0 мВ, от около 20 мВ до около 0 мВ, от около 15 мВ до около 0 мВ, от около 10 мВ до около 0 мВ или от около 5 мВ до около 0 мВ. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеют средний дзета-потенциал от около 20 мВ до около -40 мВ. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеют средний дзета-потенциал от около 20 мВ до около -20 мВ. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеют средний дзета-потенциал от около 10 мВ до около -20 мВ. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеют средний дзета-потенциал от около 10 мВ до около -10 мВ. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеют средний дзета-потенциал около 10 мВ, около 9 мВ, около 8 мВ, около 7 мВ, около 6 мВ, около 5 мВ, около 4 мВ, около 3 мВ, около 2 мВ, около 1 мВ, около 0 мВ, около -1 мВ, около -2 мВ, около -3 мВ, около -4 мВ, около -5 мВ, около -6 мВ, около -7

мВ, около -8 мВ, около -9 мВ, около -9 мВ или около -10 мВ.

[00499] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеют средний дзета-потенциал от около 0 мВ до -20 мВ. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеют средний дзета-потенциал менее, чем около -20 мВ. Например, в некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеют средний дзета-потенциал менее чем около -30 мВ, менее чем около 35 мВ или менее чем около -40 мВ. В некоторых вариантах осуществления средний дзета-потенциал ЛНЧ составляет от около -50 мВ до около -20 мВ, от около -40 мВ до около -20 мВ или от около -30 мВ до около -20 мВ. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеют средний дзета-потенциал около 0 мВ, около -1 мВ, около -2 мВ, около -3 мВ, около -4 мВ, около -5 мВ, около -6 мВ, около -7 мВ, около -8 мВ, около -9 мВ, около -10 мВ, около -11 мВ, около -12 мВ, около -13 мВ, около -14 мВ, около -15 мВ, около -16 мВ, около -17 мВ, около -18 мВ, около -19 мВ, около -20 мВ, около -21 мВ, около -22 мВ, около -23 мВ, около -24 мВ, около -25 мВ, около -26 мВ, около -27 мВ, около -28 мВ, около -29 мВ, около -30 мВ, около -31 мВ, около -32 мВ, около -33 мВ, около -34 мВ, около -35 мВ, около -36 мВ, около -37 мВ, около -38 мВ, около -39 мВ или около -40 мВ. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеют средний дзета-потенциал менее, чем около -20 мВ, менее, чем около -30 мВ, менее, чем около 35 мВ или менее, чем около -40 мВ.

[00500] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанную в данном документе, и имеет массовое соотношение липида (Л) к нуклеиновой кислоте (Н) от около 10:1 до около 60:1. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанную в данном документе, и имеет массовое соотношение липида (Л) и нуклеиновой кислоты (Н) около 20:1. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанную в данном документе, и имеет массовое соотношение липида (Л) и нуклеиновой кислоты (Н) около 30:1. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанную в данном документе, и имеет массовое соотношение липида (Л) и нуклеиновой кислоты (Н) около 40:1. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанную в данном документе, и имеет массовое соотношение L:N около 15:1, около 16:1, около 17:1, около 18:1, около 19:1, около 20:1, около 21:1, около 22:1, около 23:1, около 24:1, около 25:1, около 26:1, около 27:1, около 28:1, около 29:1, около 30:1, около 31:1, около 32:1, около 33:1, около 34:1, около 35:1, около 36:1, около 237:1, около 28:1, около 39:1, около 40:1, около 41:1, около 42:1, около 43:1, около 44:1 или около 45:1.

[00501] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеет массовое соотношение липида (Л) к молекуле нуклеиновой кислоты (Н) от 10:1 до 60:1, от 20:1 до 60:1, от 30:1 до 60:1, от 40:1 до 60:1, от 50:1 до 60:1, от 10:1 до 50:1, от 20:1 до 50:1, от 30:1 до 50:1, от 40:1 до 50:1, от 10:1 до 40:1, от 20:1 до 40:1, от 30:1 до 40:1, от 10:1 до 30:1, от 20:1 до 30:1 или от 10:1 до 20:1, включая все конечные точки. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеет массовое соотношение молекул липид:нуклеиновая кислота от 30:1 до 40:1. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеет массовое соотношение молекул липид:нуклеиновая кислота от 30:1 до 36:1.

[00502] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанную в данном документе, и имеет массовое соотношение липида (Л) к нуклеиновой кислоте (Н) от около 10:1 до около 60:1. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанную в данном документе, и имеет массовое соотношение липида (Л) и нуклеиновой кислоты (Н) около 20:1. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанную в данном документе, и имеет массовое соотношение липида (Л) и нуклеиновой кислоты (Н) около 30:1 (Л:Н). В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанную в данном документе, и имеет массовое соотношение липида (Л) и нуклеиновой кислоты (Н) около 40:1 (Л:Н). В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанную в данном документе, и имеет массовое соотношение L:N около 15:1, около 16:1, около 17:1, около 18:1, около 19:1, около 20:1, около 21:1, около 22:1, около 23:1, около 24:1, около 25:1, около 26:1, около 27:1, около 28:1, около 29:1, около 30:1, около 31:1, около 32:1, около 33:1, около 34:1, около 35:1, около 36:1, около 237:1, около 28:1, около 39:1, около 40:1, около 41:1, около 42:1, около 43:1, около 44:1 или около 45:1.

[00503] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит молекулу нуклеиновой кислоты и имеет соотношение липид-азот-фосфат (N:P) от 1 до 25. В некоторых вариантах осуществления N:P составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25. В некоторых вариантах осуществления N:P составляет от 1 до 25, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 5 до 25, от 5 до 20, от 5 до 15, от 5 до 10, от 10 до 25, от 10 до 20, от 10 до 15, от 15 до 25, от 15 до 20 или от 20 до 25. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит молекулу нуклеиновой кислоты и имеет соотношение липид-азот-фосфат (N:P) 14.

[00504] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий онколитический вирус, причем кодируемый

онколитический вирус способен уменьшать размер опухоли, удаленной от места введения ЛНЧ субъекту. Например, как показано в примерах, представленных в данном документе, внутривенное введение описанных в данном документе ЛНЧ приводит к репликации вируса в опухолевой ткани и уменьшению размера опухоли. Эти данные указывают на то, что ЛНЧ по данному изобретению способны локализоваться в опухолях или раковых тканях, удаленных от места введения ЛНЧ. Такие эффекты позволяют использовать описанные в данном документе онколитические вирусы, инкапсулированные в ЛНЧ, для лечения опухолей, которые труднодоступны и поэтому не подходят для внутриопухолевой доставки лекарств.

Способ приготовления ЛНЧ

[00505] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложены способы получения композиции липидных наночастиц (ЛНЧ), содержащих молекулу нуклеиновой кислоты, включающие стадии:

- (a) разведение молекулы нуклеиновой кислоты до желаемой концентрации в водном растворе;
- (b) смешивание органической липидной фазы, содержащей все липидные компоненты ЛНЧ, с водной фазой, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, с использованием микрофлюидного потока для образования ЛНЧ;
- (c) диализ ЛНЧ против буфера для удаления органического растворителя;
- (d) концентрирование ЛНЧ до целевого объема; и
- (e) необязательное фильтрование через стерильный фильтр.

[00506] В некоторых вариантах осуществления органическую липидную фазу и водную фазу смешивают в соотношении от 1:1 (об:об) до 1:10 (об:об). В некоторых вариантах осуществления органическую липидную фазу и водную фазу смешивают в соотношении 1:1 (об:об), 1:2 (об:об), 1:3 (об:об), 1:4 (об:об), 1:5 (об:об), 1:6 (об:об), 1:7 (об:об), 1:8 (об:об), 1:9 (об:об) или 1:10 (об:об). В некоторых вариантах осуществления органическую липидную фазу и водную фазу смешивают в соотношении от 1:1 (об:об) до 1:3 (об:об), от 1:2 (об:об) до 1:4 (об:об), от 1:3 (об:об) до 1:5 (об:об), от 1:4 (об:об) до 1:6 (об:об), от 1:5 (об:об) до 1:7 (об:об), от 1:6 (об:об) до 1:8 (об:об), от 1:7 (об:об) до 1:9 (об:об) или от 1:8 (об:об) до 1:10 (об:об). В некоторых вариантах осуществления органическую липидную фазу и водную фазу смешивают в соотношении от 1:3 (об:об) до 1:5 (об:об). В некоторых вариантах осуществления органическую липидную фазу и водную фазу смешивают в соотношении 1:3 (об:об). В некоторых вариантах осуществления органическую липидную фазу и водную фазу смешивают в соотношении 1:5 (об:об).

[00507] В некоторых вариантах осуществления общая скорость микрожидкостного потока составляет 5-20 мл/мин. В некоторых вариантах осуществления общая скорость микрожидкостного потока составляет 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 мл/мин. В некоторых вариантах осуществления общая скорость микрожидкостного потока составляет 9-20 мл/мин. В некоторых вариантах осуществления общая скорость микрожидкостного потока составляет 11-13 мл/мин.

[00508] В некоторых вариантах осуществления растворителем в органической липидной фазе на стадии (b) является этанол. В некоторых вариантах осуществления на стадии (b) к органической липидной фазе подводят тепло. В некоторых вариантах осуществления к органической липидной фазе на стадии (b) применяют температуру около 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80°C. В некоторых вариантах осуществления изобретения на стадии (b) органическую липидную фазу подвергают нагреванию до 60 °C. В некоторых вариантах осуществления органическую липидную фазу на стадии (b) не подвергают нагреванию.

[00509] В некоторых вариантах осуществления водный раствор на стадии (a) имеет pH от 1 до 7. В некоторых вариантах осуществления водный раствор на стадии (a) имеет pH от 1 до 3, от 2 до 4, от 3 до 5, от 4 до 6 или от 5 до 7. В некоторых вариантах осуществления водный раствор на стадии (a) имеет pH 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5 или 7. В некоторых вариантах осуществления водный раствор на стадии (a) имеет pH 3. В некоторых вариантах осуществления водный раствор на стадии (a) имеет pH 5.

[00510] В некоторых вариантах осуществления общая концентрация липидов составляет от около 5 мМ до 80 мМ. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация липидов составляет около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80 мМ. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация липидов составляет около 20 мМ. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация липидов составляет около 40 мМ.

[00511] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ, полученная данным способом, имеет соотношение липид-азот-фосфат (N:P) от 1 до 25. В некоторых вариантах осуществления N:P составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25. В некоторых вариантах осуществления N:P составляет от 1 до 25, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 5 до 25, от 5 до 20, от 5 до 15, от 5 до 10, от 10 до 25, от 10 до 20, от 10 до 15, от 15 до 25, от 15 до 20 или от 20 до 25. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит молекулу нуклеиновой кислоты и имеет соотношение липид-азот-фосфат (N:P) 14.

[00512] В некоторых вариантах осуществления буфер на стадии (c) имеет

нейтральный pH (*например*, 1х PBS, pH 7,2). В некоторых вариантах осуществления на стадии (d) для концентрирования используется центробежная фильтрация.

[00513] В некоторых вариантах осуществления эффективность инкапсуляции в способе по настоящему изобретению составляет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%. В некоторых вариантах осуществления эффективность инкапсуляции в способе по настоящему изобретению составляет по меньшей мере 90%. В некоторых вариантах осуществления эффективность инкапсуляции в способе по настоящему изобретению составляет по меньшей мере 95%. В некоторых вариантах осуществления эффективность инкапсуляции определяется RiboGreen.

[00514] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ, полученные способом по настоящему изобретению, имеют средний размер (*т.е.* средний внешний диаметр) от около 50 нм до около 500 нм. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеют средний размер от около 50 нм до около 200 нм, от около 100 нм до около 200 нм, от около 150 нм до около 200 нм, от около 50 нм до около 100 нм, от около 50 нм до около 150 нм, от около 100 нм до около 150 нм, от около 200 нм до около 250 нм, от около 250 нм до около 300 нм, от около 300 нм до около 400 нм, от около 150 нм до около 500 нм, от около 200 нм до около 500 нм, около от около 300 нм до около 500 нм, от около 350 нм до около 500 нм, от около 400 нм до около 500 нм, от около 425 нм до около 500 нм, от около 450 нм до около 500 нм или от около 475 нм до около 500 нм. В некоторых вариантах осуществления множество ЛНЧ имеют средний размер около 50 нм, 60 нм, 70 нм, 80 нм, 90 нм, 100 нм, 110 нм, около 120 или около 125 нм. В некоторых вариантах осуществления множество ЛНЧ имеют средний размер около 100 нм. В некоторых вариантах осуществления множество ЛНЧ имеют средний размер от 50 нм до 150 нм. В некоторых вариантах осуществления множество ЛНЧ имеют средний размер (средний внешний диаметр) от 50 нм до 150 нм, от 50 нм до 125 нм, от 50 нм до 100 нм, от 50 нм до 75 нм, от 75 нм до 150 нм, от 75 нм. до 125 нм, от 75 нм до 100 нм, от 100 нм до 150 нм, от 100 нм до 125 нм или от 125 нм до 150 нм. В некоторых вариантах осуществления множество ЛНЧ имеют средний размер от 70 нм до 90 нм, от 80 нм до 100 нм, от 90 нм до 110 нм, от 100 нм до 120 нм, от 110 нм до 130 нм, от 120 нм до 140 нм или от 130 до 150 нм. В некоторых вариантах осуществления множество ЛНЧ имеют средний размер от 90 нм до 110 нм.

[00515] В некоторых вариантах осуществления индекс полидисперсности множества ЛНЧ составляет от 0,01 до 0,3. В некоторых вариантах осуществления индекс

полидисперсности множества ЛНЧ составляет от 0,1 до 0,15. В некоторых вариантах осуществления индекс полидисперсности множества ЛНЧ составляет около 0,01, около 0,02, около 0,03, около 0,04, около 0,05, около 0,06, около 0,07, около 0,08, около 0,09, около 0,10, около 0,11, около 0,12, около 0,13, около 0,14, около 0,15, около 0,16, около 0,17, около 0,18, около 0,19, около 0,20, около 0,21, около 0,22, около 0,23, около 0,24, около 0,25, около 0,26, около 0,27, около 0,28, около 0,29, или около 0,30. В некоторых вариантах осуществления индекс полидисперсности множества ЛНЧ составляет около 0,10, около 0,11, около 0,12, около 0,13, около 0,14 или около 0,15. В некоторых вариантах осуществления средний диаметр и/или полидисперсность определяют способом динамического рассеяния света.

Молекулы полезной нагрузки

[00516] В некоторых вариантах осуществления частицы содержат синтетический РНК-вирусный геном и дополнительно содержат полинуклеотид рекомбинантной РНК, кодирующий молекулу полезной нагрузки. В некоторых вариантах осуществления частицы представляют собой липидные наночастицы и содержат синтетический РНК-вирусный геном и дополнительно содержат полинуклеотид рекомбинантной РНК, кодирующий молекулу полезной нагрузки. В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном в частице (*например*, ЛНЧ) содержит полинуклеотид рекомбинантной РНК, кодирующий молекулу полезной нагрузки. В некоторых вариантах осуществления частица (*например*, ЛНЧ) содержит 1) синтетический РНК-вирусный геном (который может кодировать или не кодировать молекулу полезной нагрузки) и 2) второй полинуклеотид рекомбинантной РНК, кодирующий молекулу полезной нагрузки. В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном и второй полинуклеотид рекомбинантной РНК, кодирующий молекулу полезной нагрузки, не связаны в частице (*например*, ЛНЧ). В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном и второй полинуклеотид рекомбинантной РНК, кодирующий молекулу полезной нагрузки, связаны нековалентно. В некоторых вариантах осуществления синтетический РНК-вирусный геном и второй полинуклеотид рекомбинантной РНК, кодирующий молекулу полезной нагрузки, ковалентно связаны посредством ковалентной связи, отличной от обычной 3', 5'-фосфодиэфирной связи. В некоторых вариантах осуществления одна или более целевых последовательностей микроРНК включены в 3'- или 5'-UTR полинуклеотида РНК, кодирующего молекулу полезной нагрузки. В некоторых вариантах осуществления одну или более целевых последовательностей микроРНК встраивают в полинуклеотид, кодирующий молекулу полезной нагрузки. В таких вариантах осуществления трансляция и последующая

экспрессия полезной нагрузки не происходит или существенно снижается в клетках, в которых экспрессируется соответствующая микроРНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид рекомбинантной РНК, кодирующий молекулу полезной нагрузки, представляет собой репликон.

[00517] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка представляет собой цитотоксический пептид. Как используется в настоящем документе, «цитотоксический пептид» относится к белку, способному вызывать гибель клетки при экспрессии в клетке-хозяине и/или гибель соседней клетки при секреции клеткой-хозяином. В некоторых вариантах осуществления цитотоксический пептид представляет собой каспазу, р53, дифтерийный токсин (ДТ), экзотоксин A *Pseudomonas* (PEA), белки, инактивирующие рибозим (RIP) типа I (*например*, сапорин и гелонин), RIP типа II (*например*, рицин), шига-подобный токсин 1 (Stt1), фоточувствительные реактивные формы кислорода (*например* KillerRed). В некоторых вариантах осуществления цитотоксический пептид кодируется суицидальным геном, приводящим к гибели клеток путем апоптоза, например, геном каспазы.

[00518] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка представляет собой иммуномодулирующий пептид. Как используется в настоящем документе, «иммуномодулирующий пептид» - это пептид, способный модулировать (*например*, активировать или ингибировать) конкретный иммунный рецептор и/или путь. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующие пептиды могут действовать на любые клетки млекопитающих, включая иммунные клетки, клетки тканей и стромальные клетки. В предпочтительном варианте осуществления иммуномодулирующий пептид действует на иммунную клетку, такую как Т-клетка, НК-клетка, NKT Т-клетка, В-клетка, дендритная клетка, макрофаг, базофил, тучная клетка или эозинофил. Примерные иммуномодулирующие пептиды включают антигенсвязывающие молекулы, такие как антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, цитокины, хемокины, растворимые рецепторы, лиганды рецепторов клеточной поверхности, двухкомпонентные пептиды и ферменты.

[00519] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка представляет собой цитокин, такой как IL-1, IL-12, IL-15, IL-18, IL-36γ, TNFα, IFNα, IFNβ, IFNγ или TNFSF14. В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка представляет собой хемокин, такой как CXCL10, CXCL9, CCL21, CCL4 или CCL5. В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка представляет собой лиганд для рецептора клеточной поверхности, такой как лиганд NKG2D, лиганд нейропилина, лиганд Flt3, лиганд CD47 (*например*, SIRP1α). В некоторых вариантах осуществления полезная

нагрузка представляет собой растворимый рецептор, например, растворимый рецептор цитокина (*например*, IL-13R, TGF β R1, TGF β R2, IL-35R, IL-15R, IL-2R, IL-12R и рецепторы интерферона) или растворимый рецептор врожденного иммунитета (*например*, толл-подобные рецепторы, рецепторы комплемента и т.д.). В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка представляет собой доминантный агонистический мутант белка, участвующего во внутриклеточном РНК- и/или ДНК-сенсинге (*например*, доминантный агонистический мутант STING, RIG-1 или MDA-5).

[00520] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка представляет собой антигенсвязывающую молекулу, такую как антитело или его антигенсвязывающие фрагменты (*например*, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), F(ab) и т.д.). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула специфически связывается с рецептором клеточной поверхности, таким как рецептор иммунной контрольной точки (*например*, PD-1, PD-L1 и CTLA4) или дополнительные рецепторы клеточной поверхности, участвующие в росте и активации клеток (*например*, OX40, CD200R, CD47, CSF1R, TREM2, 4-1BB, CD40 и NKG2D).

[00521] В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой полипептид скорпиона, такой как хлоротоксин, VmKn-2, неопладин 1, неопладин 2 и маурипорин. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой полипептид змеи, такой как контортростатин, апоксин-I, ботропстоксин-I, BJcuL, ONAP-1, родостомин, drCT-I, CTX-III, B1L и ACTX-6. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой полипептид паука, такой как латарцин и гиалуронидаза. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой полипептид пчелы, такой как мелиттин и апамин. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой полипептид лягушки, такой как PsT-1, PdT-1 и PdT-2.

[00522] В некоторых вариантах осуществления полезная молекула представляет собой фермент. В некоторых вариантах осуществления фермент способен модулировать микроокружение опухоли путем изменения внеклеточного матрикса. В таких вариантах осуществления фермент может включать матриксную металлопротеазу (*например*, MMP9), коллагеназу, гиалуронидазу, желатиназу или эластазу, но не ограничиваться этим. В некоторых вариантах осуществления фермент является частью системы генно-направленной ферментной пролекарственной терапии (GDEPT), такой как тимидинкиназа вируса простого герпеса, цитозиндеаминаза, нитроредуктаза, карбоксипептидаза G2, фосфоорилаза пуриновых нуклеозидов или цитохром P450. В некоторых вариантах осуществления фермент способен индуцировать или активировать

сигнальные пути гибели клеток в клетке-мишени (*например*, каспазу). В некоторых вариантах осуществления фермент способен расщеплять внеклеточный метаболит или мРНК (*например*, аденозиндезаминазу или аргиназу или 15-гидроксипростагландиндегидрогеназу).

[00523] В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой MLKL. В некоторых вариантах осуществления полипептид MLKL содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 104. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки содержит или состоит из домена 4HB MLKL. В некоторых вариантах осуществления домен MLKL 4HB содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной аминокислотам 1-120 SEQ ID NO: 104.

[00524] В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой гасдермин D (GSDMD). В некоторых вариантах осуществления гасдермин D (GSDMD) содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки содержит или состоит из N-концевого фрагмента гасдермина D. В некоторых вариантах осуществления N-концевой фрагмент гасдермина D содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной аминокислотам 1-233 SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки содержит мутацию, соответствующую L192A SEQ ID NO: 105.

[00525] В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой гасдермин E (GSDME). В некоторых вариантах осуществления гасдермин E (GSDME) содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере

мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 106. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки содержит или состоит из N-концевого фрагмента гасдермина E. В некоторых вариантах осуществления N-концевой фрагмент гасдермина E содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной аминокислотам 1-237 SEQ ID NO: 106.

[00526] В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой HMGB1. В некоторых вариантах осуществления полипептид HMGB1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 107. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки содержит или состоит из домена Вох В HMGB1. В некоторых вариантах осуществления домен Вох В HMGB1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной аминокислотам 96-162 SEQ ID NO: 107.

[00527] В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой SMAC/Diablo. В некоторых вариантах осуществления полипептид SMAC/Diablo содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 108. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной аминокислотам 56-239 SEQ ID NO: 108.

[00528] В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой мелитин. В некоторых вариантах осуществления мелитин содержит

или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 109.

[00529] В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой оксидазу L-аминокислот (LAAO). В некоторых вариантах осуществления оксидаза L-аминокислот (LAAO) содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 110.

[00530] В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой дезинтегрин. В некоторых вариантах осуществления дезинтегрин содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 111.

[00531] В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой TRAIL(TNFSF10) В некоторых вариантах осуществления полипептид TRAIL(TNFSF10) содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 112.

[00532] В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой нитроредуктазу. В некоторых вариантах осуществления нитроредуктаза представляет собой NfsB (*например*, из *E. coli*). В некоторых вариантах осуществления NfsB содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления нитроредуктаза представляет собой NfsA (*например*, из *E. coli*). В некоторых вариантах осуществления NfsA содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по

меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 114.

[00533] В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой белок FAST реовируса. В некоторых вариантах осуществления белок FAST реовируса представляет собой ARV p14, BRV p15 или гибрид p14-p15. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой ARV p14. В некоторых вариантах осуществления полипептид ARV p14 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 115. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой BRV p15. В некоторых вариантах осуществления полипептид BRV p15 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 116. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой гибрид p14-p15. В некоторых вариантах осуществления гибрид p14-p15 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 117.

[00534] В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой лептин/FOSL2. В некоторых вариантах осуществления лептин/FOSL2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 118.

[00535] В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой аденозиндезаминазу 2 (ADA2). В некоторых вариантах осуществления аденозиндезаминаза (ADA2) содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%

идентичной SEQ ID NO: 119.

[00536] В некоторых вариантах осуществления полезная молекула представляет собой α -1,3-галактозилтрансферазу. В некоторых вариантах осуществления α -1,3-галактозилтрансфераза содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 120.

[00537] В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой IL-2. В некоторых вариантах осуществления IL-2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 121.

[00538] В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой IL-7. В некоторых вариантах осуществления IL-7 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 122.

[00539] В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой IL12. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки содержит бета-субъединицу IL-12, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 123. В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки содержит альфа-субъединицу IL-12, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 124.

[00540] В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой IL18. В некоторых вариантах осуществления IL18 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере

мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 125.

[00541] В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой IL-21. В некоторых вариантах осуществления IL-21 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 126.

[00542] В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой IL-36γ. В некоторых вариантах осуществления IL-36γ содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 127.

[00543] В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой IFNγ. В некоторых вариантах осуществления IFNγ содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 128.

[00544] В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой CCL21. В некоторых вариантах осуществления CCL21 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 129.

[00545] В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки кодируется полинуклеотидной молекулой в соответствии с одним из вариантов осуществления, представленных в **Таблице 20** ниже.

Таблица 20: Неограничивающие варианты осуществления конфигураций полезной нагрузки

Полезная нагрузка	Вирусный геном CVA (например, CVA21), кодирующий полезную нагрузку	ЛНЧ, содержащая вирусный геном CVA (например, CVA21) и вторую молекулу РНК, кодирующую полезную нагрузку.	Вирусный геном SVV, кодирующий полезную нагрузку	ЛНЧ, содержащая вирусный геном SVV и вторую молекулу РНК, кодирующую полезную нагрузку.
MLKL	x	x	x	x
Домен 4HB MLKL	x	x	x	x
Гасдермин D	x	x	x	x
Гасдермин D с L192A	x	x	x	x
N-концевой фрагмент гасдермина D	x	x	x	x
N-концевой фрагмент гасдермина D с L192A	x	x	x	x
Гасдермин E	x	x	x	x
N-концевой фрагмент гасдермина E	x	x	x	x
HMGB1	x	x	x	x
Домен Box B HMGB1	x	x	x	x
SMAC/Diablo	x	x	x	x
Мелитин	x	x	x	x
Оксидаза L-аминокислот (LAAO)	x	x	x	x
дезинтегрин	x	x	x	x
TRAIL (TNFSF10)	x	x	x	x
нитроредуктаза	x	x	x	x
NfsB	x	x	x	x
NfsA	x	x	x	x
белок FAST реовируса	x	x	x	x
ARV p14	x	x	x	x
BRV p15	x	x	x	x

Полезная нагрузка	Вирусный геном CVA (например, CVA21), кодирующий полезную нагрузку	ЛНЧ, содержащая вирусный геном CVA (например, CVA21) и вторую молекулу РНК, кодирующую полезную нагрузку.	Вирусный геном SVV, кодирующий полезную нагрузку	ЛНЧ, содержащая вирусный геном SVV и вторую молекулу РНК, кодирующую полезную нагрузку.
гибрид p14-p15	x	x	x	x
Лептин/FOSL2	x	x	x	x
Аденозиндезамин аза 2 (ADA2)	x	x	x	x
альфа-1,3-галактозилтрансфераза	x	x	x	x
IL-2	x	x	x	x
IL-7	x	x	x	x
IL-12	x	x	x	x
бета-субъединица IL-12	x	x	x	x
альфа-субъединица IL-12	x	x	x	x
IL-18	x	x	x	x
IL-21	x	x	x	x
IL-36-гамма	x	x	x	x
IFN-гамма	x	x	x	x
CCL21	x	x	x	x

*Каждый «х» указывает на вариант осуществления

[00546] В некоторых вариантах осуществления молекула полезной нагрузки представляет собой двухкомпонентный пептид. Как используется в настоящем документе, «двухкомпонентный пептид» относится к мультимерному белку, состоящему из первого домена, способного связывать антиген клеточной поверхности, экспрессированный на нераковой эффекторной клетке, и второго домена, способного связывать антиген клеточной поверхности, экспрессированный клеткой-мишенью (*например*, раковой клеткой, опухолевой клеткой или эффекторной клеткой другого типа). В некоторых вариантах осуществления отдельные полипептидные домены двухкомпонентного полипептида могут содержать антитело или его связывающий фрагмент (*например*, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) или F(ab)), нанотело, диатело, флекситело, антитело DOCK-AND-LOCK™ или моноклональное антиидиотипическое

антитело (mAb2). В некоторых вариантах осуществления структура двухкомпонентных полипептидов может представлять собой антитело с двумя вариабельными доменами (DVD-IgTM), Tandab®, биспецифический активатор Т-клеток (BiTETM), DuoBody® или переориентирующий полипептид с двойной аффинностью (DART). В некоторых вариантах осуществления двухкомпонентный полипептид представляет собой BiTE и содержит домен, который специфически связывается с антигеном, представленным в Таблице 8 и/или 9. Примерные BiTE приведены ниже в Таблице 7.

Таблица 7. Валидированные BiTE, используемые в доклинических и клинических исследованиях

Мишень	Название	Целевое заболевание	Клинический статус	Ссылки
CD19	Блинатумомаб/MT-103/MEDI-538	НХЛ, ОЛЛ	Фаза I/II/III	1, 2, 3, 4, 5, 6
EpCAM	MT110	Солидные опухоли	Фаза I	7, 8, 9, 10
CEA	MT111/MEDI-565	Аденокарцинома ЖКТ	Фаза I	11, 12
PSMA	BAY2010112/AMG112	Предстательная железа	Фаза I	13
CD33	AMG330	AML	Доклинический	14, 15
EGFR	Антитела C-BiTE и P-BiTE	Колоректальный рак	Доклинический	16
Her2	FynomAb, COVA420, HER2-BsAb	Карцинома молочной железы и желудка	Доклинический	17, 18
EphA2	bscEphA2xCD3	Множественные солидные опухоли	Доклинический	19
MCSP	MCSP-BiTE	Меланома	Доклинический	20
ADAM17	A300E	Рак простаты	Доклинический	21
PSCA	CD3-PSCA(MB1)	Рак простаты	Доклинический	22
17-A1	CD3/17-1A-биспецифический	Колоректальный рак	Доклинический	23
Лиганды NKG2D	scFv-NKG2D, huNKG2D-OKT3	Множественные опухоли жидких тканей и солидные опухоли	Доклинический	24, 25
DLL3	AMG757	Мелкоклеточный рак легких	Клиническое выявление	26

[00547] В некоторых вариантах осуществления антиген клеточной поверхности, экспрессируемый на эффекторной клетке, выбран из Таблицы 8 ниже. В некоторых вариантах осуществления антиген клеточной поверхности, экспрессируемый

на опухолевой клетке или эффекторной клетке, выбран из Таблицы 9 ниже. В некоторых вариантах осуществления антиген клеточной поверхности, экспрессируемый на опухолевой клетке, является опухолевым антигеном. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген выбран из CD19, EpCAM, CEA, PSMA, CD33, EGFR, Her2, EphA2, MCSP, ADAM17, PSCA, 17-A1, лиганда NKGD2, CSF1R, FAP, GD2, DLL3, TROP2, нектин 4 или нейропиллина. В других вариантах осуществления антиген представляет собой вирусный антиген, связанный с развитием рака. В некоторых вариантах осуществления вирусный антиген, связанный с развитием рака, представляет собой HBV-core (ядерный антиген гепатита В), HBV-pol, HbS-Ag, HPV E6, HPV E7, большой Т-антиген полиомавируса клеток Меркеля или антиген EBNA2 или BZLF1 вируса Эпштейна-Барра. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген выбран из перечисленных в Таблице 9.

Таблица 8: Примерные целевые антигены эффекторных клеток

Т-клетка		НКТ-клетка	НК-клетка	Другие
CD3	CD30	CD3	CD16	CD48
CD3 γ	CD38	CD3 γ	CD94/NKG2 (например, NKG2D)	LIGHT
CD3 δ	CD40	CD3 δ	NKp30	CD44
CD3 ϵ	CD57	CD3 ϵ	NKp44	CD45
CD3 ξ	CD69	CD3 ξ	NKp46	IL-1R2
CD2	CD70	инвариантный TKP	KAR	IL-1R α
CD4	CD73			IL-1R α 2
CD5	CD81			IL-13R α 2
CD6	CD82			IL-15R α
CD7	CD96			CCR5
CD8	CD134			CCR8
CD16	CD137			
CD25	CD152			
CD27	CD278			
CD28				

Таблица 9: Примерные целевые антигены эффекторных клеток

Антигены клеток-мишеней			
8H9	CRISP3	Lewis-Y	Fas
GnT-V, β 1,6-N	DC-SIGN	LIV-1 (SLC39A6)	SOX2
AFP	DHFR	Livin	STEAP1
ART1	EGP40	LAMP1	SLITRK6
ART4	EZH2	MAGEA3	NaPi2a
ABCG2	EpCAM	MAGEA4	SOX1

Антигены клеток-мишеней			
B7-H3	EphA2	MAGEB6	SOX11
B7-H4	EphA2/Eck	MAGEA1	SPANXA1
B7-H6	EGFRvIII	MART-1	SART-1
BCMA	Е-кадгерин	MCSP	SSX4
В-циклин	EGP2	MME	SSX5
ВМІ1	ETA	Мезотелин (MSLN)	Сурвивин
CA-125	ERBB3	MAPK1	SSX2
кадгерин	ERBB3/4	MUC16	TAG72
CABYR	ERBB4	MUC1	TEM1
CTAG2	EPO	MRP-3	TEM8
CA6	F3	MyoD-1	TSGA10
CAIX	FAR	NCAM	TSSK6
CEA	FBP	нектин 4	тиреоглобулин
CEACAM5	FTHL17	Нестин	рецептор трансферрина
CEACAM6	фетальный AchR	NEP	TACSTD2 (TROP2)
Cav-1	FAP	NY-ESO-1	TMEM97
CD10	FGFR3	hHLA-A	TRP-2
CD117	FR-a	H60	TULP2
CD123	Fra-1/Fosl 1	OLIG2	TROP2
CD133	GAGE1	5T4	тирозиназа
CD138	GD2	p53	TRP1
CD15	GD3	P-кадгерин	UPAR
CD171	Glil	PB	VEGF
CD19	GP100	P-гликопротеин	рецепторы VEGF
CD20	GPA33	PMCT (SLC13A5)	VEGRR2
CD21		PRAME	BRAF
CD22	Глипикан-3	PROX1	WT-1
CD30	HIV gp120	PSA	XAGE2
CD33	HLA-A	PSCA	ZNF165
CD37	HLA-A2	PSMA	интегрин $\alpha_v\beta_6$
CD38	HLA-AI	PSC1	β -катенин
CD44v6	HLA-B	PVRL4	катепсин В
CD44v7/8	HLA-C	Ras	CSAG2
CD74	HMW-MAA	ROR1	CTAG2
Cd79b	Her2/Neu	SART2	EGFR
CD124 (IL-4R)	Her3	SART3	EGP40
CDH3	u70/80	онкофетальные варианты фибронектина	EZH2
Ki-67	LICAM	тенаascin	HIV sp120
CSPG4	ULBP1	LICAM	легкая цепь каппа
CALLA	ULBP2	Rae-1 α	LDHC
CSAG2	ULBP3	Rae-1 β	TRP-1

Антигены клеток-мишеней			
COX-2	ULBP6	Rae-1 δ	Fas-L
Лямбда	MICA	Rae-1 γ	DLL3
LAYN	MICB	PDGF	
LeuM-1	Her3	TROP2	
KDR	EGF		
CD47	SIRP1 α		

Фармацевтические композиции и способы применения

[00548] Один аспект изобретения относится к фармацевтическим композициям, содержащим молекулы рекомбинантной РНК, описанные в данном документе, или частицам, содержащим молекулу рекомбинантной РНК, описанную в данном документе, и способам лечения рака. В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены способы лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту эффективного количества вируса CVA21-EF, CVA21-KY или SVV, или соответствующего РНК-вирусного генома. Композиции, описанные в настоящем документе, могут быть получены любым способом, подходящим для желаемого способа доставки. Как правило, составы включают все физиологически приемлемые композиции, включая производные или пролекарства, сольваты, стереоизомеры, рацематы или таутомеры с любыми фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями и/или эксципиентами.

[00549] Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент» включает в себя, без ограничения, любой адъювант, носитель, эксципиент, глидант, подсластитель, разбавитель, консервант, краситель/пигмент, усилитель вкуса, поверхностно-активное вещество, смачивающий агент, диспергирующий агент, суспендирующий агент, стабилизатор, изотонический агент, растворитель, поверхностно-активное вещество или эмульгатор, который был одобрен Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США как приемлемый для использования для людей или домашних животных. Типичные фармацевтически приемлемые носители включают сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлоза и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; трагакант; солод; желатин; тальк; масло какао, воски, животные и растительные жиры, парафины, силиконы, бентониты, кремниевая кислота, оксид цинка; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как

этилолеат и этиллаурат; агар; буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновая кислота; апирогенная вода; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; фосфатные буферные растворы; и любые другие совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах, но не ограничиваются ими.

[00550] «Фармацевтически приемлемая соль» включает соли присоединения кислоты и соли присоединения основания. Фармацевтически приемлемые соли включают соли присоединения кислоты (образованные со свободными аминогруппами белка) и которые образованы с неорганическими кислотами, такими как, например, соляная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота и тому подобное. и органические кислоты, такие как, но не ограничиваясь этим, уксусная кислота, 2,2-дихлоруксусная кислота, адипиновая кислота, альгиновая кислота, аскорбиновая кислота, аспарагиновая кислота, бензолсульфоновая кислота, бензойная кислота, 4-ацетамидобензойная кислота, камфорная кислота, камфора-10-сульфоновая кислота, каприновая кислота, капроновая кислота, каприловая кислота, угольная кислота, коричная кислота, лимонная кислота, цикламинная кислота, додецилсульфоновая кислота, этан-1,2 -дисульфоновая кислота, этансульфоновая кислота, 2-гидроксиэтансульфоновая кислота, муравьиная кислота, фумаровая кислота, галактаровая кислота, гентизиновая кислота, глюкогептоновая кислота, глюконовая кислота, глюкуроновая кислота, глутаминовая кислота, глутаровая кислота, 2-оксоглутаровая кислота, глицерофосфорная кислота, гликолевая кислота, гиппуровая кислота, изомасляная кислота, молочная кислота, лактобионовая кислота, лауриновая кислота, малеиновая кислота, яблочная кислота, малоновая кислота, миндальная кислота, метансульфоновая кислота, муциновая кислота, нафталин-1,5-дисульфоокислота, нафталин- 2-сульфоокислота, 1-гидрокси-2-нафтойная кислота, никотиновая кислота, олеиновая кислота, оротовая кислота, щавелевая кислота, пальмитиновая кислота, палмовая кислота, пропионовая кислота, пироглутаминовая кислота, пировиноградная кислота, салициловая кислота, 4-аминосалициловая кислота, себациновая кислота, стеариновая кислота, янтарная кислота, винная кислота, тиоциановая кислота, ртолуолсульфоновая кислота, трифторуксусная кислота, ундециленовая кислота и тому подобное. Соли, образованные со свободными карбоксильными группами, также могут быть получены из неорганических оснований, таких как, например, соли натрия, калия, лития, аммония, кальция, магния, железа, цинка, меди, марганца, алюминия и тому подобное. Соли, полученные из органических оснований, включают, но не ограничиваются этим, соли первичных, вторичных и третичных аминов, замещенных

аминов, включая природные замещенные амины, циклические амины и основные ионообменные смолы, такие как аммиак, изопропиламин, триметиламин, диэтиламин, триэтиламин, трипропиламин, диэтанолламин, этаноламин, деанол, 2-диметиламиноэтанол, 2-диэтиламиноэтанол, дициклогексиламин, лизин, аргинин, гистидин, кофеин, прокаин, гидабамин, холин, бетаин, бенетамин, бензатин, этилендиамин, глюкозамин, метилглюкамин, теобромин, триэтанолламин, трометамин, пурины, пиперазин, пиперидин, *N*-этилпиперидин, полиаминовые смолы и т. п. Особенно предпочтительными органическими основаниями являются изопропиламин, диэтиламин, этаноламин, триметиламин, дициклогексиламин, холин и кофеин.

[00551] В настоящем изобретении предложены способы уничтожения раковой клетки или клетки-мишени, включающие воздействие на клетку полинуклеотидом РНК или частицей, описанной в настоящем документе, или их композицией, в условиях, достаточных для внутриклеточной доставки композиции в раковую клетку. Как используется в настоящем документе, «раковая клетка» или «клетка-мишень» относится к клетке млекопитающего, выбранной для лечения или введения полинуклеотида или частицы, описанных в настоящем документе, или их композиции, описанной в настоящем документе. Как используется в настоящем документе, «уничтожение раковой клетки» относится конкретно к гибели раковой клетки посредством апоптоза или некроза. Уничтожение раковой клетки может быть определено методами, известными в данной области техники, включая, помимо прочего, измерение размера опухоли, подсчет клеток и проточную цитометрию для обнаружения маркеров гибели клеток, таких как аннексин V и включение йодида пропидия.

[00552] В настоящем изобретении дополнительно предложен способ лечения или профилактики рака у субъекта, нуждающегося в этом, при котором субъекту вводят эффективное количество фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе. Способ введения, естественно, зависит от места и характера заболевания, которое лечат, и может включать, например, внутрикожное, трансдермальное, подкожное, парентеральное, назальное, внутривенное, внутримышечное, интраназальное, подкожное, через кожу, внутритрахеальное, внутрибрюшинное, внутриопухолевое и пероральное введение, а также перфузию, промывание и прямую инъекцию. Инкапсулированные полинуклеотидные композиции, описанные в настоящем документе, особенно полезны при лечении метастатического рака, когда может потребоваться системное введение для доставки композиций в несколько органов и/или типов клеток. Поэтому в конкретном варианте осуществления описанные в данном документе композиции вводят системно.

[00553] «Эффективное количество» или «эффективная доза», используемые в

данном документе взаимозаменяемо, относятся к количеству и/или дозе описанных в данном документе композиций, которые приводят к улучшению или устранению симптомов заболевания или состояния. Улучшение - это любое улучшение или устранение заболевания или состояния, или симптома заболевания или состояния. Улучшение является наблюдаемым или измеряемым улучшением, или может быть улучшением общего самочувствия субъекта. Таким образом, специалист в данной области техники понимает, что лечение может улучшить болезненное состояние, но может не обеспечивать полное излечение заболевания. Улучшения у субъектов могут включать уменьшение опухолевой нагрузки, уменьшение пролиферации опухолевых клеток, увеличение гибели опухолевых клеток, активацию иммунных путей, увеличение времени до прогрессирования опухоли, уменьшение боли при раке, увеличение выживаемости или улучшение качества жизни, но не ограничиваться ими.

[00554] В некоторых вариантах осуществления введение эффективной дозы может быть достигнуто при введении одной дозы композиции, описанной в настоящем документе. Как используется в настоящем документе, термин «доза» означает количество композиции, доставляемое за один раз. В некоторых вариантах осуществления доза молекул рекомбинантной РНК измеряется как 50% инфекционная доза для культуры ткани (TCID₅₀). В некоторых вариантах осуществления TCID₅₀ составляет по меньшей мере около 10³-10⁹ TCID₅₀/мл, например, по меньшей мере около 10³ TCID₅₀/мл, около 10⁴ TCID₅₀/мл, около 10⁵ TCID₅₀/мл, около 10⁶ TCID₅₀/мл, около 10⁷ TCID₅₀/мл, около 10⁸ TCID₅₀/мл или около 10⁹ TCID₅₀/мл. В некоторых вариантах осуществления доза может измеряться количеством частиц в данном объеме (*например*, частицы/мл). В некоторых вариантах осуществления доза может быть дополнительно уточнена по количеству геномных копий описанных в данном документе полинуклеотидов РНК, присутствующих в каждой частице (*например*, количество частиц/мл, где каждая частица включает по меньшей мере одну геномную копию полинуклеотида). В некоторых вариантах осуществления доставка эффективной дозы может потребовать введения нескольких доз композиции, описанной в настоящем документе. Таким образом, введение эффективной дозы может потребовать введения по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 или более доз композиции, описанной в настоящем документе.

[00555] В вариантах осуществления, в которых вводят несколько доз композиции, описанной в настоящем документе, каждая доза не обязательно должна вводиться одним и тем же лицом и/или в одном и том же географическом месте. Кроме того, дозирование может осуществляться в соответствии с заранее установленной схемой. Например, заранее определенная схема дозирования может включать введение дозы

композиции, описанной в настоящем документе, ежедневно, через день, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, раз в два месяца, ежегодно, раз в полгода или тому подобное. Предварительно определенная схема дозирования может быть скорректирована по мере необходимости для данного пациента (*например*, количество вводимой композиции может быть увеличено или уменьшено, и/или частота приема может быть увеличена или уменьшена, и/или общее количество вводимых доз может быть увеличено или уменьшено).

[00556] В настоящем документе «предотвращение» или «профилактика» может означать полное предотвращение симптомов заболевания, задержку начала симптомов заболевания или уменьшение тяжести симптомов заболевания, развившихся впоследствии.

[00557] Термин «субъект» или «пациент», используемый в настоящем документе, означает любого субъекта-млекопитающего, которому вводят композицию, описанную в настоящем документе, в соответствии со способами, описанными в настоящем документе. В конкретном варианте осуществления способы по настоящему изобретению используются для лечения человека. Способы по настоящему изобретению могут также применяться для лечения приматов, отличных от человека, (*например*, обезьян, бабуинов и шимпанзе), мышей, крыс, крупного рогатого скота, лошадей, кошек, собак, свиней, кроликов, коз, оленей, овец, хорьков, песчанок, морских свинок, хомяков, летучих мышей, птиц (*например*, кур, индеек и уток), рыб и рептилий.

[00558] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложен способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества онколитического вируса Коксаки, при этом вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21, или полинуклеотида, кодирующего CVA21, при этом рак классифицируется как чувствительный к инфекции CVA21 на основе уровня экспрессии ICAM-1 и/или процентного содержания ICAM-1-положительных раковых клеток в раке. В некоторых вариантах осуществления штамм CVA21 представляет собой CVA21-KY.

[00559] Молекула внутриклеточной адгезии 1 (ICAM-1, также известная как BB2, CD54, P3.58) представляет собой белок (номер UniProt № P03562), кодируемый геном *ICAM1* (идентификатор гена NCBI № 3383), и играет важную роль в стабилизации межклеточных взаимодействий и облегчении трансмиграции эндотелия лейкоцитов. В некоторых вариантах осуществления решения о лечении конкретного вида рака принимают на основе экспрессии ICAM-1, при этом экспрессию ICAM-1 определяют в раке, и рак идентифицируют как чувствительный или устойчивый к экспрессии CVA21 на

основе уровня экспрессии ICAM-1. В общем, более высокая (% положительных опухолевых клеток или интенсивность, или и то, и другое) экспрессия ICAM-1 указывает на большую чувствительность к инфекции CVA21 (см. Пример 8). Экспрессию ICAM-1 можно определить способами, известными в данной области техники для экспрессии мРНК и/или белка. Экспрессию мРНК можно определить с помощью нозерн-блоттинга, анализов с помощью защиты от рибонуклеазы, методов на основе ПЦР, методов на основе секвенирования и т.п. Экспрессию белка можно определить с помощью иммуноблоттинга (например, Вестерн-блоттинга), иммуногистохимии, иммунофлуоресценции, твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), проточной цитометрии, цитометрического анализа на гранулах, масс-спектропии, методов на основе протеомики, и т.п.

[00560] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложен способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий: (a) определение уровня экспрессии ICAM-1 и/или процента ICAM-1-положительных раковых клеток в раке; (b) классификацию рака как чувствительного к инфекции вирусом Коксаки 21 (CVA21) на основе уровня экспрессии ICAM-1 и/или процента ICAM-1-положительных раковых клеток, определенного на стадии (a); и (c) введение терапевтически эффективного количества CVA21 или полинуклеотида, кодирующего CVA21, субъекту, если рак классифицируется как чувствительный к инфекции CVA21 на стадии (b). В некоторых вариантах осуществления штамм CVA21 представляет собой CVA21-KY.

[00561] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложен способ выбора субъекта, страдающего раком, для лечения вирусом Коксаки 21 (CVA21) или полинуклеотидом, кодирующим CVA21, включающий: (a) определение уровня экспрессии ICAM-1 и/или процента ICAM-1-положительных раковых клеток в раке; (b) классификацию рака как чувствительного к инфекции вирусом CVA21 на основе уровня экспрессии ICAM-1 и/или процента ICAM-1-положительных раковых клеток, определенного на стадии (a); (c) выбор субъекта для лечения CVA21 или полинуклеотидом, кодирующим CVA21, если рак классифицируется как чувствительный к инфекции CVA21 на стадии (b); и (d) введение CVA21 или полинуклеотида, кодирующего CVA21, выбранному субъекту. В некоторых вариантах осуществления штамм CVA21 представляет собой CVA21-KY.

Состав липидных наночастиц и способы применения

[00562] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложены способы лечения заболевания или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом,

включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции (*например*, фармацевтической композиции) по изобретению. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство включает рак. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит ПЭГ-липид по данному изобретению. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит ЛНЧ по данному изобретению, содержащую ПЭГ-липид. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит ЛНЧ по данному изобретению, содержащую ПЭГ-липид и инкапсулированную молекулу по данному изобретению (*например*, синтетический РНК-вирусный геном).

[00563] Способ может представлять собой способ лечения субъекта, страдающего или подверженного риску возникновения состояния, при котором инкапсулированная молекула приносит пользу, в частности, если инкапсулированная молекула является терапевтическим средством. В качестве альтернативы, способ может представлять собой способ диагностики субъекта, в этом случае инкапсулированная молекула может представлять собой диагностический агент.

[00564] При профилактическом применении фармацевтические композиции, содержащие ЛНЧ по данному изобретению, вводят субъекту, восприимчивому к определенному расстройству или иным образом подверженному риску возникновения конкретного расстройства, в количестве, достаточном для устранения или снижения риска, или задержки возникновения расстройства. При терапевтических применениях композиции, содержащие ЛНЧ по данному изобретению, вводят субъекту с подозрением на такое расстройство или уже страдающему от него в количестве, достаточном для лечения или по меньшей мере частичной остановки симптомов расстройства и его осложнений. Количество, достаточное для достижения такой цели, называют терапевтически эффективной дозой или количеством. Как в профилактическом, так и в терапевтическом режиме фармацевтическую композицию можно вводить в нескольких дозах до тех пор, пока не будет достигнут достаточный ответ. Как правило, за ответом устанавливают мониторинг и назначают повторные дозы, если желаемый ответ начинает ослабевать.

[00565] Для введения ЛНЧ по данному изобретению может быть приготовлена в виде фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит инкапсулированную молекулу. Фармацевтическая композиция может содержать: (i) ЛНЧ по изобретению; и (ii) фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент. Фармацевтическая композиция может быть составлена в соответствии с известными способами получения фармацевтически полезных композиций, в которых терапевтическую молекулу объединяют в смеси с

фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или наполнителем. Носитель считается «фармацевтически приемлемым носителем», если его введение может переноситься субъектом-реципиентом. Стерильный фосфатно-буферный солевой раствор является одним из примеров фармацевтически приемлемого носителя. Другие подходящие носители, разбавители или наполнители хорошо известны специалистам в данной области. (См, например, Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Publishing Company, 19th ed. 1995).) Составы могут дополнительно включать один или более наполнителей, консервантов, солюбилизаторов, буферных агентов, альбумина для предотвращения потери белка на поверхности флаконов и *т. д.*

[00566] Фармацевтическая композиция, содержащая ЛНЧ по настоящему изобретению, может быть составлена в лекарственной форме, выбранной из группы, состоящей из: стандартной лекарственной формы для перорального введения, стандартной лекарственной формы для внутривенного введения, интраназальной стандартной лекарственной формы, стандартной лекарственной формы в виде суппозиториев, стандартной лекарственной формы для внутрикожного введения, стандартной лекарственной формы для внутримышечного введения, стандартной лекарственной формы для внутрибрюшинного введения, стандартной лекарственной формы для подкожного введения, стандартной лекарственной формы для эпидурального введения, стандартной лекарственной формы для сублингвального введения и стандартной лекарственной формы для внутримозгового введения. Стандартная лекарственная форма для перорального введения может быть выбрана из группы, состоящей из: таблеток, пилюль, пеллет, капсул, порошков, пастилок, гранул, растворов, суспензий, эмульсий, сиропов, эликсиров, составов с пролонгированным высвобождением, аэрозолей и спреев.

[00567] Фармацевтическую композицию можно вводить субъекту в терапевтически эффективном количестве. В соответствии со способами по настоящему изобретению композицию можно вводить субъектам различными способами, включая, например, внутримышечный, подкожный, внутривенный, внутрисердечный, внутрисуставной, парентеральный, интраназальный, внутрилегочный, чрескожный, внутриплевральный, интратекальный, внутриопухолевый и пероральный пути введения. В целях профилактики и лечения композицию можно вводить субъекту в виде однократной болюсной доставки, путем непрерывной доставки (*например*, непрерывной трансдермальной доставки) в течение длительного периода времени или по протоколу повторного введения (*например*, ежечасно, ежедневно, еженедельно или ежемесячно).

[00568] Введение может происходить путем инъекции, ирригации,

ингаляции, потребления, электроосмоса, гемодиализа, ионтофореза и других способов, известных в данной области. Путь введения будет варьироваться, естественно, в зависимости от места и характера заболевания, которое лечат, и может включать, например, ушную, буккальную, конъюнктивальную, кожную, зубную, эндоцервикальную, эндосинуиальную, эндотрахеальную, энтеральную, эпидуральную, интерстициальную, внутрисуставную, внутриартериальную, внутрибрюшную, внутриаурикулярную, интрабилиарную, интрабронхиальную, интубурсальную, интрацентральную, интрацеребральную, интрацистермальную, интракорнеальную, интракрональную, интракоронарную, интракраниальную, интрадермальную, интрадискальную, интрадуктальную, интрадуоденальную, интрадуоденальную, интрадуральную, интраэпикардальную, интраэпидермальную, интраэзофагеальную, внутрижелудочную, интрагингивальную, внутрипеченочную, внутрибрюшинную, интралегийную, интралингвальную, интралюминальную, интралимфатическую, интрамаммарную, интрамедуллярную, интрамененингеальную, внутримышечную, интраназальную, интранодальную, интраокулярную, интраоментальную, интраовариальную, внутрибрюшинную, интраперикардальную, интраплевральную, интрапростатическую, интрапульмональную, интаруминальную, интрасинальную, интраспинальную, интрасиновиальную, интратендиновую, интрастестулярную, внутритрахеальную, интратекальную, интраторакальную, внутритубулярную, внутриопухолевую, внутритипаническую, внутриматочную, внутрибрюшинную, внутрисосудистую, внутрижелудочковую, внутрипузырную, интравестибулярную, внутривенную, интравитреальную, ларанжевую, назальную, назогастральную, оральную, офтальмологическую, ротоглоточную, парентеральную, чрескожную, периартикулярную, перидуральную, периневральную, периодонтальную, респираторную, ретротубулярную, ректальную, спинальную, субарахноидальную, субконъюнктивальную, подкожную, субдермальную, субгингивальную, сублингвальную, подслизистую, субретиальную, местную, трансдермальную, трансэндокардиальную, трансмукозальную, трансплацентарную, трантрахеальную, транстимпаническую, мочеточниковую, уретральную и/или вагинальную перфузию, лаваж, прямую инъекцию и пероральное введение.

[00569] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция составлена для системного введения. В некоторых вариантах осуществления системное введение включает внутривенное введение, внутриартериальное введение, внутрибрюшинное введение, внутримышечное введение, внутрикожное введение, подкожное введение, интраназальное введение, пероральное введение или их

комбинацию. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция составлена для внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция составлена для местного введения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция составлена для внутриопухолевого введения.

[00570] Эффективные дозы композиций по настоящему изобретению варьируются в зависимости от многих различных факторов, включая способ введения, целевой сайт, физиологическое состояние субъекта, является ли субъект человеком или животным, других вводимых лекарственных средств, является ли лечение профилактическим или терапевтическим, а также специфической активности самой композиции и ее способности вызывать у индивидуума желаемый ответ. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления субъект может быть млекопитающим, отличным от человека. Обычно режимы дозирования корректируют для обеспечения оптимального терапевтического ответа, *т.е.*, для оптимизации безопасности и эффективности.

[00571] Определение эффективных доз в этом контексте обычно основано на исследованиях на животных моделях, за которыми следуют клинические испытания на людях, и ориентировано на определение эффективных доз и протоколов введения, которые значительно снижают проявление или тяжесть заболевания у испытуемых. Композиции по настоящему изобретению можно соответствующим образом вводить субъекту за один раз или в течение серии курсов лечения и можно вводить субъекту в любое время с момента постановки диагноза. Композиции по настоящему изобретению можно применять в качестве единственного лечения, монотерапии или в сочетании с другими лекарственными средствами или способами лечения, в качестве комбинаторной терапии, полезной при лечении рассматриваемого состояния.

[00572] В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество композиции по настоящему изобретению составляет от около 1 нг/кг массы тела до около 100 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления диапазон введения композиции по настоящему изобретению составляет от около 1 нг/кг массы тела до около 1 мкг/кг массы тела, от около 1 нг/кг массы тела до около 100 нг/кг массы тела, от около 1 нг/кг массы тела до около 10 нг/кг массы тела, от около 10 нг/кг массы тела до около 1 мкг/кг массы тела, от около 10 нг/кг массы тела до около 100 нг/кг массы тела, от около 100 нг/кг массы тела до около 1 мкг/кг массы тела, от около 100 нг/кг массы тела до около 10 пг/кг массы тела, от около 1 мкг/кг массы тела до около 10 пг/кг массы тела, около от 1 мкг/кг массы тела от около 100 пг/кг массы тела, от около 10 пг/кг массы тела

до около 100 пг/кг массы тела, от около 10 пг/кг массы тела до около 1 мг/кг массы тела, от около 100 мкг/кг массы тела до около от 10 мг/кг массы тела, от около 1 мг/кг массы тела до около 100 мг/кг массы тела или от около 10 мг/кг массы тела до около 100 мг/кг массы тела. Дозировки в этом диапазоне могут быть достигнуты путем однократного или многократного введения, включая, *например*, многократное введение в течение суток или ежедневное, еженедельное, раз в две недели или ежемесячное введение. Композиции по настоящему изобретению можно вводить, в зависимости от ситуации или показаний, в виде разовой дозы путем болюсной или непрерывной инфузии, или в виде многократных доз путем болюсной или непрерывной инфузии. Возможно введение нескольких доз, например, несколько раз в день, один раз в день, каждые 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней, еженедельно, каждые 2, 3, 4, 5 или 6 недель или ежемесячно. В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению вводят еженедельно. В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению вводят раз в две недели. В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению вводят каждые три недели. Однако могут быть полезны и другие схемы дозирования. Эффективность такой терапии легко контролировать при помощи традиционных методик.

[00573] Для введения взрослому человеку терапевтически эффективное количество можно вводить в дозах в диапазоне от 0,0006 мг до 1000 мг на дозу, включая, но не ограничиваясь этим, 0,0006 мг на дозу, 0,001 мг на дозу, 0,003 мг на дозу, 0,006 мг на дозу, 0,01 мг на дозу, 0,03 мг на дозу, 0,06 мг на дозу, 0,1 мг на дозу, 0,3 мг на дозу, 0,6 мг на дозу, 1 мг на дозу, 3 мг на дозу, 6 мг на дозу, 10 мг на дозу, 30 мг на дозу, 60 мг на дозу, 100 мг на дозу, 300 мг на дозу, 600 мг на дозу и 1000 мг на дозу, причем в курсе лечения может быть назначено несколько, обычно последовательных суточных доз. В некоторых вариантах осуществления композицию по изобретению вводят в дозе от около 0,001 мг/кг/доза до около 10 мг/кг/доза, от около 0,001 мг/кг/доза до около 6 мг/кг/доза, от около 0,001 мг/кг/доза до около 3 мг/кг/доза, от около 0,001 мг/кг/доза до около 1 мг/кг/доза, от около 0,001 мг/кг/доза до около 0,6 мг/кг/доза, от около 0,001 мг/кг/доза до около 0,3 мг/кг/доза, от около 0,001 мг/кг/доза до около 0,1 мг/кг/доза, от около 0,001 мг/кг/доза до около 0,06 мг/кг/доза, от около 0,001 мг/кг/доза до около 0,03 мг/кг/доза, от около 0,001 мг/кг/доза до около 0,01 мг/кг/доза, от около 0,001 мг/кг/доза до около 0,006 мг/кг/доза, от около 0,001 мг/кг/доза до около 0,003 мг/кг/доза, от около 0,003 мг/кг/доза до около 10 мг/кг/доза, от около 0,003 мг/кг/доза до около 6 мг/кг/доза, от около 0,003 мг/кг/доза до около 3 мг/кг/доза, от около 0,003 мг/кг/доза до около 1 мг/кг/доза, от около 0,003 мг/кг/доза до около 0,6 мг/кг/доза, от около 0,003 мг/кг/доза до около 0,3 мг/кг/доза,

[illegible]

мг/кг/доза, около 0,1 мг/кг/доза, около 0,3 мг/кг/доза, около 0,6 мг/кг/доза, около 1 мг/кг/доза, около 3 мг/кг/доза, около 6 мг/кг/доза или около 10 мг/кг/доза. Композиции по данному изобретению можно вводить в разное время суток. В одном варианте осуществления оптимальную терапевтическую дозу можно вводить вечером. В другом варианте оптимальную терапевтическую дозу можно вводить утром. Как и ожидалось, дозировка будет зависеть от нарушения, размера, возраста и состояния субъекта.

[00574] Дозировка фармацевтической композиции может быть изменена лечащим врачом для поддержания желаемой концентрации в целевом участке. Более высокие или более низкие концентрации можно выбирать в зависимости от способа доставки. Дозировку также следует корректировать в зависимости от скорости высвобождения введенного препарата.

[00575] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят субъекту многократно (*например*, несколько доз). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят два или более раз, три или более раз, четыре или более раз и *т.д.* В некоторых вариантах осуществления введение фармацевтической композиции можно повторять один, два, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более раз. Фармацевтическую композицию можно вводить длительно или кратковременно, в зависимости от ее предполагаемой цели.

[00576] В некоторых вариантах осуществления интервал между двумя последовательными дозами фармацевтической композиции составляет менее 4, менее 3, менее 2 или менее 1 недели. В некоторых вариантах осуществления интервал между двумя последовательными дозами составляет менее 3 недель. В некоторых вариантах осуществления интервал между двумя последовательными дозами составляет менее 2 недель. В некоторых вариантах осуществления интервал между двумя последовательными дозами составляет менее 1 недели. В некоторых вариантах осуществления интервал между двумя последовательными дозами составляет менее 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 дня. В некоторых вариантах осуществления интервал между двумя последовательными дозами фармацевтической композиции составляет по меньшей мере 4, по меньшей мере 3, по меньшей мере 2 или по меньшей мере 1 неделю. В некоторых вариантах осуществления интервал между двумя последовательными дозами фармацевтической композиции по настоящему изобретению составляет по меньшей мере 3 недели. В некоторых вариантах осуществления интервал между двумя последовательными дозами фармацевтической композиции по настоящему изобретению составляет по меньшей мере 2 недели. В некоторых вариантах осуществления интервал между двумя последовательными дозами фармацевтической

композиции по настоящему изобретению составляет по меньшей мере 1 неделю. В некоторых вариантах осуществления интервал между двумя последовательными дозами фармацевтической композиции по настоящему изобретению составляет по меньшей мере 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 дней. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят дозу фармацевтической композиции по настоящему изобретению один раз в сутки, каждые 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 дней. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят дозу фармацевтической композиции по настоящему изобретению один раз каждые 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 недель. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят дозу фармацевтической композиции по настоящему изобретению один раз каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев.

[00577] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят несколько раз, при этом период полувыведения ЛНЧ из сыворотки субъекта после второго и/или последующего введения составляет по меньшей мере 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% или 95% периода полувыведения ЛНЧ из сыворотки после первого введения.

[00578] В некоторых вариантах осуществления вторая и последующие дозы фармацевтической композиции, содержащей инкапсулированную молекулу (*например*, инкапсулированной в ЛНЧ), могут поддерживать активность инкапсулированной молекулы на уровне по меньшей мере 50% от активности первой дозы или по меньшей мере 60% от первой дозы, или по меньшей мере 70% от первой дозы, или по меньшей мере 75% от первой дозы, или по меньшей мере 80% от первой дозы, или по меньшей мере 85% от первой дозы, или по меньшей мере 90% от первой дозы, или по меньшей мере 95% от первой дозы или более в течение по меньшей мере 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней после второго введения или последующего введения.

[00579] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению имеет продолжительность терапевтического эффекта *in vivo* около 1 часа или дольше, около 2 часов или дольше, около 3 часов или дольше, около 4 часов или дольше, около 5 часов или дольше, около 6 часов или дольше, около 7 часов или дольше, около 8 часов или дольше, около 9 часов или дольше, около 10 часов или дольше, около 12 часов или дольше, около 14 часов или дольше, около 16 часов или дольше, около 18 часов или дольше, около 20 часов или дольше, около 25 часов или дольше, около 30 часов или дольше, около 35 часов или дольше, около 40 часов или дольше, около 45 часов или дольше или около 50 часов или дольше. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению

имеет продолжительность терапевтического эффекта *in vivo* по меньшей мере 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа, 24 часа, 1,5 дня, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней или 10 дней.

[00580] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению имеет период полувыведения *in vivo*, сопоставимый с предварительно определенным пороговым значением. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению имеет период полувыведения *in vivo* превышающий предварительно определенное пороговое значение. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению имеет период полувыведения *in vivo* меньше, чем предварительно определенное пороговое значение. В некоторых вариантах осуществления предварительно определенное пороговое значение представляет собой период полувыведения контрольной композиции, содержащей ту же молекулу полезной нагрузки и ЛНЧ, за исключением того, что ЛНЧ содержит (i) ПЭГ-липид, не относящийся к формуле (A), (A') или (A'') (например, ПЭГ-липид ЛНЧ в контрольной композиции может представлять собой PEG2k-DPG); или (ii) катионный липид, не относящийся к формуле (I).

[00581] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению имеет AUC (площадь под кривой «концентрация-время» в крови) после повторной дозы, которая составляет по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, при по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 100% от AUC после приема предыдущей дозы. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция имеет AUC, которая составляет по меньшей мере 60% от AUC после приема предыдущей дозы. В некоторых вариантах осуществления после повторной дозы, AUC фармацевтической композиции снижается менее чем на 70%, менее чем на 60%, менее чем на 60%, менее чем на 40%, менее чем на 30%, менее чем на 20%, менее чем на 10% или менее чем на 5% по сравнению с AUC после приема предыдущей дозы. В некоторых вариантах осуществления после повторной дозы, AUC фармацевтической композиции снижается менее чем на 40% по сравнению с AUC после приема предыдущей дозы.

[00582] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит молекулу нуклеиновой кислоты,

кодирующую вирусный геном онколитического вируса, и при введении фармацевтической композиции субъекту, имеющему опухоль, доставляет молекулу нуклеиновой кислоты в опухолевые клетки. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу РНК. В некоторых вариантах осуществления введение фармацевтической композиции приводит к репликации онколитического вируса в опухолевых клетках. В некоторых вариантах осуществления введение фармацевтической композиции субъекту, имеющему опухоль, приводит к селективной репликации онколитического вируса в опухолевых клетках по сравнению с нормальными клетками.

[00583] В некоторых вариантах осуществления введение фармацевтической композиции по настоящему изобретению субъекту, имеющему опухоль, ингибирует рост опухоли. В некоторых вариантах осуществления введение фармацевтической композиции ингибирует рост опухоли в течение по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 2 лет или дольше. В некоторых вариантах осуществления ингибирование роста опухоли означает контроль размера опухоли в пределах 100% от размера опухоли непосредственно перед введением фармацевтической композиции в течение определенного периода времени. В некоторых вариантах осуществления ингибирование роста опухоли означает контроль размера опухоли в пределах 110%, в пределах 120%, в пределах 130%, в пределах 140% или в пределах 150% от размера опухоли непосредственно перед введением фармацевтической композиции.

[00584] В некоторых вариантах осуществления введение фармацевтической композиции субъекту, имеющему опухоль, приводит к уменьшению или устранению опухоли. В некоторых вариантах осуществления введение фармацевтической композиции приводит к уменьшению или устранению опухоли в течение по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 2 лет или дольше. В некоторых вариантах осуществления введение фармацевтической композиции приводит к уменьшению или устранению опухоли в течение 1 недели, в течение 2 недель, в течение 3 недель, в течение 4 недель, в течение 1 месяца, в течение 2 месяцев, в течение 3 месяцев, в течение 4 месяцев, в течение 6 месяцев, в течение 9 месяцев, в течение 12 месяцев или в течение 2 лет. В некоторых вариантах осуществления уменьшение опухоли означает сокращение размера опухоли по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на

30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% по сравнению с размером опухоли непосредственно перед введением фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления уменьшение опухоли означает сокращение размера опухоли по меньшей мере на 30% по сравнению с размером опухоли непосредственно перед введением фармацевтической композиции.

[00585] Фармацевтические композиции могут поставляться в виде набора, включающего контейнер, содержащий фармацевтическую композицию, как описано в данном документе. Фармацевтическая композиция может быть представлена, например, в форме раствора для инъекций для однократной или многократной доз или в виде стерильного порошка, который восстанавливается перед инъекцией. В качестве альтернативы такой набор может включать диспергатор сухого порошка, генератор жидкого аэрозоля или небулайзер для введения фармацевтической композиции. Такой набор может дополнительно содержать письменную информацию о показаниях и применении фармацевтической композиции.

[00586] Данное изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, описанной в данном документе.

[00587] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложены способы доставки инкапсулированной молекулы в клетку, причем способ включает приведение клетки в контакт с ЛНЧ или ее фармацевтической композицией, при этом ЛНЧ содержит инкапсулированную молекулу. В некоторых вариантах осуществления инкапсулированная молекула представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вирус, и при этом контакт клетки с ЛНЧ приводит к образованию клеткой вирусных частиц, и при этом вирусные частицы являются инфекционными и литическими.

[00588] В других вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы доставки ЛНЧ субъекту, включающие введение субъекту ЛНЧ или ее фармацевтической композиции по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления, способ включает многократное введение. В некоторых вариантах осуществления интервал между двумя последовательными введениями фармацевтической композиции составляет менее 4, менее 3, менее 2 или менее 1 недели. В некоторых вариантах осуществления интервал между двумя последовательными введениями составляет менее 2 недель. В некоторых вариантах осуществления интервал между двумя последовательными введениями составляет менее 1 недели. В некоторых вариантах

осуществления интервал между двумя последовательными введениями составляет менее 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 дня. В некоторых вариантах осуществления интервал между двумя последовательными введениями фармацевтической композиции составляет по меньшей мере 4, по меньшей мере 3, по меньшей мере 2 или по меньшей мере 1 неделю. В некоторых вариантах осуществления интервал между двумя последовательными введениями фармацевтической композиции по настоящему изобретению составляет по меньшей мере 2 недели. В некоторых вариантах осуществления интервал между двумя последовательными введениями фармацевтической композиции по настоящему изобретению составляет по меньшей мере 1 неделю. В некоторых вариантах осуществления интервал между двумя последовательными введениями фармацевтической композиции по настоящему изобретению составляет по меньшей мере 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 день. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту фармацевтической композиции по настоящему изобретению каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 дней. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту фармацевтической композиции по настоящему изобретению один раз каждые 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 недель. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту фармацевтической композиции по настоящему изобретению один раз каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев.

[00589] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы доставки ЛНЧ субъекту, включающие введение субъекту ЛНЧ или ее фармацевтической композиции по настоящему изобретению, при этом способ включает многократное введение. В некоторых вариантах осуществления период полувыведения ЛНЧ из сыворотки субъекта после второго и/или последующего введения составляет по меньшей мере 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% или 95% периода полувыведения ЛНЧ из сыворотки после первого введения.

[00590] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеет AUC после повторной дозы, которая составляет по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, при по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 100% от AUC после приема предыдущей дозы. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеет AUC, которая составляет по меньшей мере 60% от AUC после приема предыдущей дозы. В некоторых вариантах осуществления после повторного приема AUC ЛНЧ снижается менее чем на 70%, менее чем 60%, менее чем 60%, менее чем 40%, менее чем 30%, менее чем 20%,

менее чем 10% или менее 5% по сравнению с AUC после приема предыдущей дозы. В некоторых вариантах осуществления после повторной дозы, AUC ЛНЧ снижается менее чем на 40% по сравнению с AUC после приема предыдущей дозы.

[00591] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложены способы доставки ЛНЧ субъекту, включающие введение ЛНЧ или его фармацевтической композиции по настоящему изобретению субъекту, при этом ЛНЧ содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вирусный геном онколитического вируса, причем у субъекта имеется опухоль, и введение ЛНЧ доставляет молекулу нуклеиновой кислоты в опухолевые клетки. В некоторых вариантах осуществления введение ЛНЧ приводит к репликации онколитического вируса в опухолевых клетках. В некоторых вариантах осуществления введение ЛНЧ приводит к избирательной репликации онколитического вируса в опухолевых клетках по сравнению с нормальными клетками.

[00592] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложены способы доставки ЛНЧ субъекту, включающие введение ЛНЧ или его фармацевтической композиции по настоящему изобретению субъекту, при этом введение ЛНЧ субъекту с опухолью ингибирует рост опухоли. В некоторых вариантах осуществления способ ингибирует рост опухоли в течение по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, месяцев, не менее 2 лет или дольше. В некоторых вариантах осуществления ингибирование роста опухоли означает контроль размера опухоли в пределах 100% от размера опухоли непосредственно перед введением фармацевтической композиции в течение определенного периода времени. В некоторых вариантах осуществления ингибирование роста опухоли означает контроль размера опухоли в пределах 110%, в пределах 120%, в пределах 130%, в пределах 140% или в пределах 150% от размера опухоли непосредственно перед введением фармацевтической композиции.

[00593] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложены способы доставки ЛНЧ субъекту, включающие введение ЛНЧ или его фармацевтической композиции по настоящему изобретению субъекту, при этом введение ЛНЧ субъекту, имеющему опухоль, приводит к уменьшению или устранению опухоли. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к уменьшению или устранению опухоли в течение по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, не менее 2 лет или дольше. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к уменьшению или

устранению опухоли в течение 1 недели, в течение 2 недель, в течение 3 недель, в течение 4 недель, в течение 1 месяца, в течение 2 месяцев, в течение 3 месяцев, в течение 4 месяцев, в течение 6 месяцев, в течение 9 месяцев, в течение 12 месяцев или в течение 2 лет. В некоторых вариантах осуществления уменьшение опухоли означает сокращение размера опухоли по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% по сравнению с размером опухоли непосредственно перед введением фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления уменьшение опухоли означает сокращение размера опухоли по меньшей мере на 30% по сравнению с размером опухоли непосредственно перед введением фармацевтической композиции.

[00594] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложены способы доставки ЛНЧ субъекту, включающие введение ЛНЧ или его фармацевтической композиции по настоящему изобретению субъекту, при этом введение ЛНЧ субъекту с опухолью ингибирует метастазирование рака.

[00595] В некоторых вариантах осуществления субъектом является млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект имеет рак, и в этом случае способ ингибирует или замедляет рост и/или метастазирование рака.

[00596] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложены способы доставки ЛНЧ субъекту, включающие системное введение ЛНЧ или его фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления введение является внутривенным, внутриартериальным, внутрибрюшинным, внутримышечным, внутрикожным, подкожным, интраназальным, пероральным или их комбинацией.

[00597] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложены способы доставки ЛНЧ субъекту, включающие местное введение ЛНЧ или его фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления введение является внутриопухолевым.

Рак

[00598] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложены способы уничтожения раковой клетки, включающие воздействие на раковую клетку липидных наночастиц, молекул рекомбинантной РНК или их композиций по данному изобретению. В некоторых вариантах осуществления раковые клетки подвергаются воздействию условий, достаточных для внутриклеточной доставки

частиц/молекул/композиций рекомбинантной РНК в указанную раковую клетку, при этом репликационно-компетентный вирус, продуцируемый инкапсулированным полинуклеотидом, приводит к уничтожению раковой клетки.

[00599] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложены способы лечения рака у субъекта, включающие введение субъекту, страдающему раком, эффективного количества частиц, молекул рекомбинантной РНК или их композиций по даннмому изобретению.

[00600] Термин «рак» в данном документе относится к или описывает физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примерами рака являются карцинома, лимфома, бластома, саркома (включая липосаркому, остеогенную саркому, ангиосаркому, эндотелиосаркому, лейомиосаркому, хордому, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, рабдомиосаркому, фибросаркому, миксосаркому и хондросаркому), нейроэндокринные опухоли, мезотелиома, синовиома, шваннома, менингиома, аденокарцинома, меланома, лейкомия или лимфоидные злокачественные новообразования. Более конкретные примеры таких видов рака включают плоскоклеточный рак (*например*, эпителиально-плоскоклеточный рак), рак легких, включая мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, аденокарциному легкого и плоскоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, рак брюшины, гепатоцеллюлярный рак, рак желудка, включая рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластома, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак ободочной кишки, рак прямой кишки, колоректальный рак, рак эндометрия или матки, рак слюнной железы, рак почки, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, рак печени, рак анальной области, рак полового члена, рак яичек, рак пищевода, опухоли желчевыводящих путей, опухоль Юинга, базальноклеточный рак, аденокарциному, рак потовых желез, рак сальных желез, папиллярный рак, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарциному, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечноклеточную карциному, гепатому, рак желчных протоков, хориокарциному, семиному, эмбриональную карциному, опухоль Вильмса, опухоль яичка, рак легких, рак мочевого пузыря, эпителиальную карциному, глиому, астроцитому, медуллобластома, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластома, акустическую неврому, олигодендроглиому, менингиому, меланому, нейробластома, ретинобластома, лейкоз, лимфому, множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, миелодиспластические заболевания, заболевания тяжелых цепей, нейроэндокринные

опухоли, невриному и другие злокачественные опухоли, а также рак головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой нейроэндокринный рак. Кроме того, доброкачественные (т.е. нераковые) гиперпролиферативные заболевания, расстройства и состояния, включая доброкачественную гипертрофию предстательной железы (ДГПЖ), менингиому, шванному, нейрофиброматоз, келоиды, миому и фибромиому матки и другие, также можно лечить с помощью описанного в данном документе изобретения. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из мелкоклеточного рака легких (SCLC), мелкоклеточного рака мочевого пузыря, крупноклеточной нейроэндокринной карциномы (LCNEC), резистентного к кастрации мелкоклеточного нейроэндокринного рака простаты (CRPC-NE), карциноида (например, карциноида легких) и мутанта мультиформной IDH глиобластомы (мутант GBM-IDH).

[00601] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой метастатический рак. В некоторых вариантах осуществления рак является метастатическим раком. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой неметастатический рак.

[00602] В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из рака легкого, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, почечно-клеточной саркомы, рака яичников, рака желудка и рака печени. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой почечно-клеточную карциному, рак легкого или рак печени. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой NSCLC (немелкоклеточный рак легкого). В некоторых вариантах осуществления рак печени представляет собой HCC (гепатоцеллюлярную карциному). В некоторых вариантах осуществления рак печени является метастатическим. В некоторых вариантах осуществления рак молочной железы представляет собой TNBC (трижды негативный рак молочной железы). В некоторых вариантах осуществления рак мочевого пузыря представляет собой уротелиальную карциному. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, рака пищевода, рака желудка, рака легких, рака почки и рака кожи, при этом рак метастазировал в печень. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой метастазирующий рак в печени, причем рак происходит из группы, состоящей из рака молочной железы, рака пищевода, рака желудка, рака легких, рака почки и рака кожи. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления гематологический рак представляет собой множественную миелому (см., например, Bradley, et al., *Oncolytic Virotherapy*, 2014:3 47–55, содержание

которой полностью включено посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления гематологический рак представляет собой лейкоз или лимфому.

[00603] В некоторых вариантах осуществления частицы, молекулы рекомбинантной РНК или их композиции содержат полинуклеотидную последовательность, полученную из штамма CVA21-KY, для лечения рака или уничтожения раковых клеток рака легких (например, NSCLC), рака молочной железы, рака толстой кишки или рака поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак легких (например, NSCLC).

[00604] В некоторых вариантах осуществления частицы, молекулы рекомбинантной РНК или их композиции содержат полинуклеотидную последовательность, полученную из штамма CVA21-EF, для лечения рака или уничтожения раковых клеток рака мочевого пузыря, почечно-клеточного рака, рака яичников, рака желудка или рака печени (например, HCC). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой почечно-клеточную карциному. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак печени (например, HCC). В некоторых вариантах осуществления рак печени является метастатическим.

[00605] В некоторых вариантах осуществления частицы, молекулы рекомбинантной РНК или их композиции содержат полинуклеотидную последовательность, полученную из SVV (например, химерного вируса SVV-IRES-2), для лечения рака или уничтожения раковых клеток рака легких, рака печени, рака простаты, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, рака желудка, рака молочной железы, нейробластомы, почечно-клеточная карциномы, рака яичников, рабдомиосаркомы, медуллобластомы, нейроэндокринного рака, карциномы клеток Меркеля (MCC) или меланомы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой мелкоклеточный рак легкого (SCLC). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой нейробластому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой нейроэндокринный рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рабдомиосаркому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой кастрационно-резистентный рак предстательной железы с нейроэндокринным фенотипом (CRPC-NE). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой карциному клеток Меркеля (MCC).

[00606] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложены способы лечения рака у субъекта, включающие введение субъекту, страдающему раком (i) эффективного количества частицы (*например*, ЛНЧ), молекулы рекомбинантной РНК или их композиций по данному изобретению, и (ii) эффективного количества ингибитора

иммунных контрольных точек. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунной контрольной точки связывается с PD-1 (например, ингибитор представляет собой антитело к PD-1). Антитела к PD1 известны в данной области техники, например, ниволумаб, пембролизумаб, ламбролизумаб, пидилзумаб, цемиплимаб и AMP-224 (AstraZeneca/MedImmune и GlaxoSmithKline), JTX-4014 от Jounce Therapeutics, спартализумаб (PDR001, Novartis), кампелизумаб (SHR1210, Jiangsu HengRui Medicine Co., Ltd), синтилимаб (IBI308, Innovent и Eli Lilly), тислелизумаб (BGB-A317), торипалимаб (JS 001), достарлимаб (TSR-042, WBP-285, GlaxoSmithKline), INCMGA00012 (MGA012, Incyte и MacroGenics) и AMP-514 (MEDI0680, AstraZeneca). В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунной контрольной точки связывается с PD-L1 (например, ингибитор представляет собой антитело к PD-L1). Антитела к PDL1 известны в данной области техники, например, MEDI-4736, MPDL3280A, атезолизумаб (Tecentriq, Roche Genentech), авелумаб (Bavencio, Merck Serono и Pfizer) и дурвалумаб (Imfinzi, AstraZeneca). В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунной контрольной точки связывается с CTLA4 (например, ингибитор представляет собой антитело к CTLA4). Антитела к CTLA4 известны в данной области техники, например, ипилумумаб, тремелимумаб или любое из антител, описанных в WO2014/207063. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой антитело к TIGIT или его фрагмент. Антитела к TIGIT известны в данной области техники, например тираголумаб (Roche), EOS-448 (iTeos Therapeutics), вибостолимаб (Merck), домваналимаб (Arcus, Gilead), BMS-986207 (BMS), этигилимаб (Mereo), COM902 (Compugen), ASP8374 (Astellas), SEA-TGT (Seattle Genetics), BGB-A1217 (BeiGene), IBI-939 (Innovent) и M6223 (EMD Serono).

[00607] В некоторых вариантах осуществления одновременно вводят 1) частицы, молекулы рекомбинантной РНК или их композиции, и 2) ингибитор иммунных контрольных точек. В некоторых вариантах осуществления эти два терапевтических компонента вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления один или оба терапевтических компонента вводят несколько раз. В некоторых вариантах осуществления частицы, молекулы рекомбинантной РНК или их композиции содержат полинуклеотидную последовательность, полученную из SVV (например, химерного вируса SVV-IRES-2), и ингибитор иммунной контрольной точки связывается с PD-1.

[00608] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложены способы лечения рака у субъекта, включающие введение субъекту, страдающему раком (i)

эффективного количества частицы (*например*, ЛНЧ), молекулы рекомбинантной РНК или их композиций по данному изобретению, и (ii) эффективного количества сконструированной иммунной клетки, содержащей «сконструированный антигенный рецептор». Сконструированные антигенные рецепторы относятся к неприродным антиген-специфичным рецепторам, таким как химерные антигенные рецепторы (CAR) или рекомбинантные Т-клеточные рецепторы (ТРК). В некоторых вариантах осуществления сконструированный антигенный рецептор представляет собой CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, слитый через шарнирный и трансмембранный домены с цитоплазматическим доменом, содержащим сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен CAR связывается с антигеном, экспрессируемым клеткой-мишенью, МНС-независимым способом, что приводит к активации и пролиферации сконструированной клетки иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен CAR распознает метку, слитую с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В таких вариантах осуществления антиген-специфичность CAR зависит от антиген-специфичности меченого антитела, так что одну конструкцию CAR можно использовать для нацеливания на множество различных антигенов путем замены одного антитела на другое (*см., например*, патенты США №№ 9233125 и 9624279; публикации заявок на патент США №20150238631 и 20180104354). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен CAR может содержать антигенсвязывающий фрагмент, полученный из антитела. Антигенсвязывающие домены, которые можно использовать в данном изобретении, включают, например, scFv; антитела; антигенсвязывающие области антител; переменные области тяжелых/легких цепей и одноцепочечные антитела.

[00609] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR может быть получен из дзета-цепи комплекса ТКР (например, сигнальных доменов CD3 ξ), Fc γ RIII, Fc ϵ RI или домена активации Т-лимфоцитов. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR дополнительно содержит костимулирующий домен, например домен 4-1BB, CD28, CD40, MyD88 или CD70. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит два костимулирующих домена, например, любые два из доменов 4-1BB, CD28, CD40, MyD88 или CD70. Типичные структуры CAR и внутриклеточные сигнальные домены известны в данной области техники (*см., например*, WO 2009/091826; US 20130287748; WO 2015/142675; WO 2014/055657; и WO 2015/090229, включенные в данный документ посредством ссылки).

[00610] В данной области техники известны CAR, специфичные для

различных опухолевых антигенов, например CAR, специфичные для CD171 (Park *et al.*, Mol Ther (2007) 15(4):825-833), CAR, специфичные для EGFRvIII (Morgan *et al.*, Hum Gene Ther (2012) 23(10):1043-1053), CAR, специфичные для EGF-R (Kobold *et al.*, J Natl Cancer Inst (2014) 107(1):364), CAR, специфичные для карбоангидразы K (Lamers *et al.*, Biochem Soc Trans (2016) 44(3):951-959), CAR, специфичные для FR- α (Kershaw *et al.*, Clin Cancer Res (2006) 12(20):6106-6015), CAR, специфичные для HER2 (Ahmed *et al.*, J Clin Oncol (2015) 33(15):1688-1696; Nakazawa *et al.*, Mol Ther (2011) 19(12):2133-2143; Ahmed *et al.*, Mol Ther (2009) 17(10):1779-1787; Luo *et al.*, Cell Res (2016) 26(7):850-853; Morgan *et al.*, Mol Ther (2010) 18(4):843-851; Grada *et al.*, Mol Ther Nucleic Acids (2013) 9(2):32), CEA-specific CARs (Katz *et al.*, Clin Cancer Res (2015) 21(14):3149-3159), CAR, специфичные для IL13R α 2 (Brown *et al.*, Clin Cancer Res (2015) 21(18):4062-4072), CAR, специфичные для GD2 (Louis *et al.*, Blood (2011) 118(23):6050-6056; Caruana *et al.*, Nat Med (2015) 21(5):524-529), CAR, специфичные для ErbB2 (Wilkie *et al.*, J Clin Immunol (2012) 32(5):1059-1070), CAR, специфичные для VEGF-R (Chinnasamy *et al.*, Cancer Res (2016) 22(2):436-447), CAR, специфичные для FAP (Wang *et al.*, Cancer Immunol Res (2014) 2(2):154-166), CAR, специфичные для MSLN (Moon *et al.*, Clin Cancer Res (2011) 17(14):4719-30), CAR, специфичные для NKG2D (VanSeggelen *et al.*, Mol Ther (2015) 23(10):1600-1610), CAR, специфичные для CD19 (Аксикабтаген цилолеуцел (Yescarta[®]) и Тисагенлеклейсель (Kymriah[®])). См. также, Li *et al.*, J Hematol and Oncol (2018) 11(22), обзор клинических испытаний опухолеспецифичных CAR.

[00611] В некоторых вариантах осуществления сконструированный антигенный рецептор представляет собой сконструированный ТКР. Сконструированные ТКР содержат цепи ТКР α и/или ТКР β , которые были выделены и клонированы из популяций Т-клеток, распознающих конкретный целевой антиген. Например, гены ТКР α и/или ТКР β (*m.e.* TRAC и TRBC) можно клонировать из популяций Т-клеток, выделенных от индивидов с определенными злокачественными новообразованиями, или популяций Т-клеток, выделенных из гуманизированных мышей, иммунизированных специфическими опухолевыми антигенами или опухолевыми клетками. Сконструированные ТКР распознают антиген посредством тех же механизмов, что и их эндогенные аналоги (*например*, путем распознавания их когнатного антигена, представленного в контексте белков главного комплекса гистосовместимости (МНС), экспрессируемых на поверхности клетки-мишени). Это взаимодействие с антигеном стимулирует эндогенные пути передачи сигнала, ведущие к активации и пролиферации клеток, сконструированных с помощью ТКР.

[00612] В данной области техники известны сконструированные ТКР,

специфичные к опухолевым антигенам, например, ТКР, специфичные для WT1 (JTCR016, Juno Therapeutics; WT1-TCRc4, описанные в публикации заявки на патент США № 20160083449), ТКР, специфичные для MART-1 (включая клон DMF4T, описанный в Morgan *et al.*, Science 314 (2006) 126-129); клон DMF5T, описанный в Johnson *et al.*, Blood 114 (2009) 535-546); и клон ID3T, описанный в van den Berg *et al.*, Mol. Ther. 23 (2015) 1541-1550), ТКР, специфичные для gp100 (Johnson *et al.*, Blood 114 (2009) 535-546), ТКР, специфичные для CEA (Parkhurst *et al.*, Mol Ther. 19 (2011) 620-626), ТКР, специфичные для NY-ESO и LAGE-1 (клон 1G4T, описанный в Robbins *et al.*, J Clin Oncol 26 (2011) 917-924; Robbins *et al.*, Clin Cancer Res 21 (2015) 1019-1027; и Rapoport *et al.*, Nature Medicine 21 (2015) 914-921), и ТКР, специфичные для MAGE-A3 (Morgan *et al.*, J Immunother 36 (2013) 133-151) и Linette *et al.*, Blood 122 (2013) 227-242). (См. также, Debets *et al.*, Seminars in Immunology 23 (2016) 10-21).

[00613] В некоторых вариантах осуществления сконструированный антигенный рецептор направлен против целевого антигена, выбранного из кластера молекулы дифференциации, такой как CD3, CD4, CD8, CD16, CD24, CD25, CD33, CD34, CD45, CD64, CD71, CD78, CD80 (также известной как B7-1), CD86 (также известной как B7-2), CD96, CD116, CD117, CD123, CD133 и CD138, CD371 (также известной как CLL1); опухолеассоциированного поверхностного антигена, такой как 5T4, BCMA (также известного как CD269 и TNFRSF17, UniProt № Q02223), карциноэмбрионального антигена (CEA), карбоангидразы 9 (CAIX или MN/CAIX), CD19, CD20, CD22, CD30, CD40, дисialogанглиозид, таких как GD2, ELF2M, протоко-эпителиального муцина, эфрина B2, молекулы адгезии эпителиальных клеток (EpCAM), ErbB2 (HER2/neu), FCRL5 (UniProt № Q68SN8), FKBP11 (UniProt № Q9NYL4), глиомассоциированного антигена, гликофинголипидов, gp36, GPRC5D (UniProt № Q9NZD1), мутантного hsp70-2, кишечной карбоксилэстеразы, рецептора IGF-I, ITGA8 (UniProt № P53708), KAMP3, LAGE-1a, MAGE, мезотелина, нейтрофильной эластазы, NKG2D, Nkp30, NY-ESO-1, PAP, простазы, опухолевого антигена-1 карцинома простаты (PCTA-1), специфического для простаты антигена (PSA), PSMA, простейна, RAGE-1, ROR1, RU1 (SFMBT1), RU2 (DCDC2), SLAMF7 (UniProt № Q9NQ25), сурвивина, TAG-72 и теломеразы; молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС), представляющей опухолеспецифический пептидный эпитоп; опухолевых стромальных антигенов, таких как экстра домен А (EDA) и экстра домен В (EDB) фибронектина; домена А1 тенасцина-С (TnС А1) и ассоциированного с фибробластами белка (FAP); цитокиновых рецепторов, таких как рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), вариант III EGFR (EGFRvIII), TFGβ-R или его компонентов, таких как эндоглин; молекулы главного комплекса

гистосовместимости (МНС); вирусспецифического поверхностного антигена, такого как антиген, специфичный для ВИЧ (такой как ВИЧ gp120); антиген, специфичный для EBV, антиген, специфичный для ЦМВ, антиген, специфичный для HPV, антиген, специфичный для вируса Ласса, антиген, специфичный для вируса гриппа, а также любого производного или варианта этих поверхностных антигенов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПРОНУМЕРОВАННЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[00614] Дополнительные пронумерованные варианты осуществления изобретения представлены следующим образом:

[00615] Вариант осуществления 1. Липидная наночастица (ЛНЧ), содержащая синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий онколитический вирус Коксаки, где вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21, выбранный из штамма EF и штамма KY.

[00616] Вариант осуществления 1,1. Липидная наночастица (ЛНЧ), содержащая синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий онколитический вирус Коксаки, где вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21 Kuykendall.

[00617] Вариант осуществления 2. ЛНЧ по варианту осуществления 1, отличающаяся тем, что вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21-KY, при этом штамм CVA21-KY содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 5.

[00618] Вариант осуществления 3. ЛНЧ по варианту осуществления 1, отличающаяся тем, что вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21-EF, при этом штамм CVA21-EF содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 9.

[00619] Вариант осуществления 4. ЛНЧ по варианту осуществления 1, отличающаяся тем, что вирус Коксаки содержит последовательность 5'-UTR (IRES), по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичную последовательности SEQ ID NO: 6 или 10.

[00620] Вариант осуществления 5. ЛНЧ по варианту осуществления 1, отличающаяся тем, что вирус Коксаки содержит последовательность P1, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичную последовательности SEQ ID NO: 7 или 11.

[00621] Вариант осуществления 6. ЛНЧ по варианту осуществления 1, отличающаяся тем, что вирус Коксаки содержит последовательность 3D, по меньшей мере

на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичную последовательности SEQ ID NO: 8 или 12.

[00622] Вариант осуществления 7. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 1-6, отличающаяся тем, что синтетический РНК-вирусный геном не содержит полинуклеотидную последовательность, более чем на 95%, более чем на 90%, более чем на 85% или более чем на 80% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1.

[00623] Вариант осуществления 8. Липидная наночастица (ЛНЧ), содержащая синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий онколитический вирус долины Сенека (SVV), при этом синтетический РНК-вирусный геном содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 68.

[00624] Вариант осуществления 9. ЛНЧ по варианту осуществления 8, отличающаяся тем, что синтетический РНК-вирусный геном содержит последовательность 5'-UTR (IRES), по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную нуклеиновым кислотам 1–670 последовательности SEQ ID NO: 68.

[00625] Вариант осуществления 10. ЛНЧ по варианту осуществления 8 или 9, отличающаяся тем, что синтетический РНК-вирусный геном кодирует белок SVV VP2, содержащий мутацию S177A.

[00626] Вариант осуществления 11. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 1-10, отличающаяся тем, что доставка ЛНЧ в клетку приводит к продукции вирусных частиц клеткой, и при этом вирусные частицы являются инфекционными и литическими.

[00627] Вариант осуществления 12. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 1-11, отличающаяся тем, что синтетический РНК-вирусный геном дополнительно содержит гетерологичный полинуклеотид, кодирующий экзогенный белок полезной нагрузки.

[00628] Вариант осуществления 13. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 1-11, дополнительно содержащая вторую молекулу рекомбинантной РНК, кодирующую экзогенный белок полезной нагрузки.

[00629] Вариант осуществления 14. ЛНЧ по варианту осуществления 12 или 13, отличающаяся тем, что экзогенный белок полезной нагрузки содержит или состоит из домена 4HB MLKL, N-концевого фрагмента гасдермина D, N-концевого фрагмента гасдермина E, домена Box B HMGB1, SMAC/Diablo, мелиттина, оксидазы L-аминокислот

(LAAO), дезинтегрин, TRAIL (TNFSF10), нитроредуктазы, белка FAST реовируса, лептина/FOSL2, α -1,3-галактозилтрансферазы или аденозиндезаминазы 2 (ADA2).

[00630] Вариант осуществления 15. ЛНЧ по варианту осуществления 14, отличающаяся тем, что нитроредуктаза представляет собой NfsB или NfsA.

[00631] Вариант осуществления 16. ЛНЧ по варианту осуществления 14, отличающаяся тем, что белок FAST реовируса представляет собой ARV p14, BRV p15 или гибрид p14-p15.

[00632] Вариант осуществления 17. ЛНЧ по варианту осуществления 12 или 13, отличающаяся тем, что экзогенный белок полезной нагрузки представляет собой флуоресцентный белок, белок-фермент, цитокин, хемокин, антигенсвязывающую молекулу, способную связываться с рецептором клеточной поверхности, или лиганд для рецептора клеточной поверхности.

[00633] Вариант осуществления 18. ЛНЧ по варианту осуществления 17, отличающаяся тем, что:

- а) цитокин выбран из GM-CSF, IFN γ , IL-2, IL-7, IL-12, IL-18, IL-21 и IL-36 γ ;
- б) лиганд для рецептора клеточной поверхности представляет собой лиганд Flt3 или TNFSF14; или
- с) хемокин выбран из CXCL10, CCL4, CCL21 и CCL5.

[00634] Вариант осуществления 19. ЛНЧ по варианту осуществления 17, отличающаяся тем, что антигенсвязывающая молекула способна связываться с рецептором иммунной контрольной точки и ингибировать его.

[00635] Вариант осуществления 20. ЛНЧ по варианту осуществления 19, отличающаяся тем, что рецептор иммунной контрольной точки представляет собой PD-1.

[00636] Вариант осуществления 21. ЛНЧ по варианту осуществления 17, отличающаяся тем, что антигенсвязывающая молекула способна связываться с опухолевым антигеном.

[00637] Вариант осуществления 22. ЛНЧ по варианту осуществления 21, отличающаяся тем, что антигенсвязывающая молекула представляет собой молекулу привлекающего Т-клетки биспецифического активатора (BiTE), или молекулу привлекающего Т-клетки биспецифического «легкого» активатора (LiTE).

[00638] Вариант осуществления 23. ЛНЧ по варианту осуществления 21 или 22, отличающаяся тем, что опухолевый антиген представляет собой вирусный антиген, выбранный из HBV-core (внутренний антиген гепатита В), HBV-pol, HbS-Ag, HPV E6, HPV E7, большого Т-антигена полиомавируса клеток Меркеля и антигена EBNA2 или BZLF1 вируса Эпштейна-Барра.

[00639] Вариант осуществления 24. ЛНЧ по варианту осуществления 21 или 22, отличающаяся тем, что опухолевый антиген представляет собой DLL3 или EpCAM.

[00640] Вариант осуществления 25. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 1-24, отличающаяся тем, что синтетический РНК-вирусный геном и/или молекула рекомбинантной РНК содержит кассету с целевой последовательности микроРНК (miРНК) (miR-TS), при этом кассета miR-TS содержит одну или несколько целевых последовательностей микроРНК.

[00641] Вариант осуществления 26. ЛНЧ по варианту осуществления 25, в которой одна или более микроРНК выбраны из miR-124, miR-1, miR-143, miR-128, miR-219, miR-219a, miR-122, miR-204, miR-217, miR-137, miR-142 и miR-126.

[00642] Вариант осуществления 27. ЛНЧ по варианту осуществления 26, отличающаяся тем, что кассета miR-TS содержит:

а. одну или несколько копий целевой последовательности miR-124, одну или несколько копий целевой последовательности miR-1 и одну или несколько копий целевой последовательности miR-143;

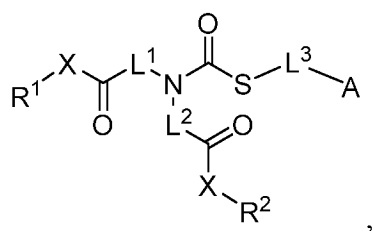
б. одну или несколько копий целевой последовательности miR-128, одну или несколько копий целевой последовательности miR-219a и одну или несколько копий целевой последовательности miR-122;

с. одну или несколько копий целевой последовательности miR-128, одну или несколько копий целевой последовательности miR-204 и одну или несколько копий целевой последовательности miR-219; или

д. одну или несколько копий целевой последовательности miR-217, одну или несколько копий целевой последовательности miR-137 и одну или несколько копий целевой последовательности miR-126.

[00643] Вариант осуществления 28. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 1-27, отличающаяся тем, что ЛНЧ содержит катионный липид, вспомогательный липид, структурный липид и ПЭГ-липид.

[00644] Вариант осуществления 29. ЛНЧ по варианту осуществления 28, отличающаяся тем, что катионный липид представляет собой соединение формулы (I):



Формула (I)

или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где:

A представляет собой $-N(CH_2R^{N1})(CH_2R^{N2})$ или 4-7-членное гетероциклическое кольцо, содержащее по меньшей мере один N, где 4-7-членное гетероциклическое кольцо необязательно замещено 0-6 R^3 ;

каждый X независимо представляет собой $-O-$, $-N(R^1)-$ или $-N(R^2)-$;

R^1 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенных C_1-C_{31} алифатических групп и стероида;

R^2 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенных C_1-C_{31} алифатических групп и стероида;

R^3 необязательно замещен C_1-C_6 алифатическими группами;

каждый из R^{N1} и R^{N2} независимо представляет собой водород, гидрокси- C_1-C_6 алкил, C_2-C_6 алкенил или C_3-C_7 циклоалкил;

L^1 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенной C_1-C_{20} алкиленовой цепи и двухвалентной необязательно замещенной C_2-C_{20} алкениленовой цепи;

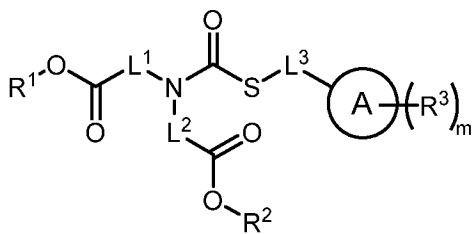
L^2 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенной C_1-C_{20} алкиленовой цепи и двухвалентной необязательно замещенной C_2-C_{20} алкениленовой цепи; и

L^3 представляет собой связь, необязательно замещенную C_1-C_6 алкиленовую цепь или двухвалентный необязательно замещенный C_3-C_7 циклоалкилен; и

при условии, что когда A представляет собой $-N(CH_3)(CH_3)$ и X представляет собой O, L^3 не является C_1-C_6 алкиленовой цепью.

[00645] Вариант осуществления 30. ЛНЧ по варианту осуществления 29, отличающаяся тем, что количество атомов углерода между S тиолата и ближайшим N, содержащимся в A, составляет 2-4.

[00646] Вариант осуществления 31. ЛНЧ по варианту осуществления 29 или 30, отличающаяся тем, что катионный липид представляет собой соединение формулы (I-a):



Формула (I-a)

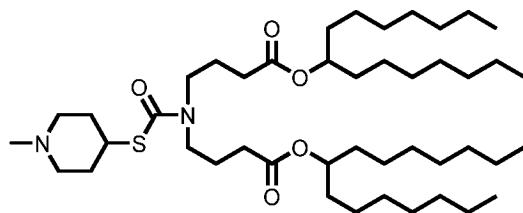
или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где:

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

[00647] Вариант осуществления 32. ЛНЧ по любому из вариантов

осуществления 29-31, отличающаяся тем, что А представляет собой необязательно замещенное 5-6-членное гетероциклическое кольцо.

[00648] Вариант осуществления 33. ЛНЧ по варианту осуществления 29, отличающаяся тем, что катионный липид представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль или сольват.

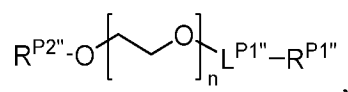
[00649] Вариант осуществления 34. ЛНЧ по варианту осуществления 28, отличающаяся тем, что катионный липид выбран из DLinDMA, DLin-KC2-DMA, DLin-MC3-DMA (MC3), COATSOME® SS-LC (прежнее название: SS-18/4PE-13), COATSOME® SS-EC (прежнее название: SS-33/4PE-15), COATSOME® SS-OC, COATSOME® SS-OP, ди((Z)-нон-2-ен-1-ил)9-((4-диметиламино)бутаноил)окси)гептадекандиоата (L-319) или N-(2,3-диолеоилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмонийхлорида (DOTAP).

[00650] Вариант осуществления 35. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 28-34, отличающаяся тем, что вспомогательный липид выбран из 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DSPC); 1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (DLPE); 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DOPC); и 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (DOPE).

[00651] Вариант осуществления 36. ЛНЧ по варианту осуществления 28, в которой катионный липид представляет собой 1,2-диолеоил-3-триметиламмонийпропан (DOTAP), и при этом вспомогательный липид представляет собой 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DLPE) или 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE).

[00652] Вариант осуществления 37. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 28-36, отличающаяся тем, что структурный липид представляет собой холестерин.

[00653] Вариант осуществления 38. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 28-37, отличающаяся тем, что ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (A''):



Формула (A'')

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

n равно целому числу от 10 до 200, включая все конечные точки;

$L^{P1''}$ представляет собой связь, $-[(CH_2)_{0-3}-C(O)O]_{1-3}-$, $-(CH_2)_{0-3}-C(O)O-(CH_2)_{1-3}-OC(O)-$ или $-C(O)N(H)-$;

$R^{P1''}$ представляет собой C_5-C_{25} алкил или C_5-C_{25} алкенил; и

$R^{P2''}$ представляет собой водород или $-CH_3$,

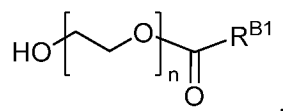
при этом ЛНЧ имеет молярное соотношение от около 0,001% до около 5% ПЭГ-липид.

[00654] Вариант осуществления 39. ЛНЧ по варианту осуществления 38, отличающаяся тем, что $L^{P1''}$ представляет собой связь, $-CH_2C(O)O-$, $-CH_2CH_2C(O)O-$, $-CH_2C(O)OCH_2C(O)O-$, $-CH_2C(O)OCH_2CH_2OC(O)-$ или $-C(O)N(H)-$.

[00655] Вариант осуществления 40. ЛНЧ по варианту осуществления 38, отличающаяся тем, что $L^{P1''}$ представляет собой связь.

[00656] Вариант осуществления 41. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 38-40, отличающаяся тем, что $R^{P2''}$ представляет собой водород.

[00657] Вариант осуществления 42. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 28-37, отличающаяся тем, что ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (B):



Формула (B)

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

n равно целому числу от 10 до 200, включая все конечные точки; и

R^{B1} представляет собой C_5-C_{25} алкил или C_5-C_{25} алкенил, и

при этом ЛНЧ имеет молярное соотношение от около 0,001% до около 5% ПЭГ-липид.

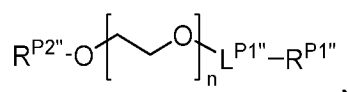
[00658] Вариант осуществления 43. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 28-37, отличающаяся тем, что ПЭГ-липид выбран из 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина-N-[амино(полиэтиленгликоля)] (DSPE-PEG); 1,2-дипальмитоил-рац-глицеринметоксиполиэтиленгликоля (DPG-PEG); 1,2-дистеароил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена (DSG-PEG); 1,2-дистеароил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена (DSG-PEG); 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена (DMG-PEG); и 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена (DMG-PEG), или 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-

N-[амино(полиэтиленгликоля)] (DSPE-PEG-амин).

[00659] Вариант осуществления 44. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 28-37, отличающаяся тем, что ПЭГ-липид выбран из 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина-N-[амино(полиэтиленгликоля)-5000] (DSPE-PEG5K); 1,2-дипальмитоил-рац-глицерин метоксиполиэтиленгликоля-2000 (DPG-PEG2K); 1,2-дистеароил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена-5000 (DSG-PEG5K); 1,2-дистеароил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена-2000 (DSG-PEG2K); 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена-5000 (DMG-PEG5K); и 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена-2000 (DMG-PEG2K).

[00660] Вариант осуществления 45. ЛНЧ по варианту осуществления 28, отличающаяся тем, что катионный липид содержит COATSOME® SS-OC, при этом вспомогательный липид содержит DSPC, структурный липид содержит холестерин (Chol), а ПЭГ-липид содержит DPG-PEG2000.

[00661] Вариант осуществления 46. ЛНЧ по варианту осуществления 28, отличающаяся тем, что катионный липид содержит COATSOME® SS-OC, при этом вспомогательный липид содержит DSPC, структурный липид содержит холестерин (Chol), а ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (A''):



Формула (A'')

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

n равно целому числу от 10 до 200, включая все конечные точки;

$L^{P1''}$ представляет собой связь;

$R^{P1''}$ представляет собой C_5 - C_{25} алкил или C_5 - C_{25} алкенил; и

$R^{P2''}$ представляет собой водород, и

при этом ЛНЧ имеет молярное соотношение от около 0,001% до около 5% ПЭГ-липидов.

[00662] Вариант осуществления 47. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 28-37 и 46, отличающаяся тем, что ПЭГ-липид выбран из группы, состоящей из BRIJ™ S100, BRIJ™ S20, BRIJ™ O20 и BRIJ™ C20.

[00663] Вариант осуществления 48. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 28-37 и 46, отличающаяся тем, что ПЭГ-липид представляет собой BRIJ™ S100.

[00664] Вариант осуществления 49. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 45-48, отличающаяся тем, что соотношение SS-OC:DSPC:Chol:ПЭГ-липид

(в процентах от общего содержания липидов) составляет A:B:C:D, где A+B+C+D = 100%, и где

- a. A = 40-60%, B = 10-25%, C = 20-30% и D = 0,01-3%;
- b. A = 45-50%, B = 20-25%, C = 25-30% и D = 0,01-1%; или
- c. A = около 49%, B = около 22%, C = около 28% и D = около 0,5%.

[00665] Вариант осуществления 50. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 45-48, отличающаяся тем, что соотношение SS-OC:DSPC:Chol:ПЭГ-липид (в процентах от общего содержания липидов) составляет A:B:C:D, где A+B+C+D = 100%, и где

- a. A = 40-60%, B = 10-30%, C = 20-45% и D = 0-3%;
- b. A = 40-60%, B = 10-30%, C = 25-45% и D = 0,01-3%;
- c. A = 45-55%, B = 10-20%, C = 30-40% и D = 1-2%;
- d. A = 45-50 %, B = 10-15 %, C = 35-40 % и D = 1-2 %; или
- e. A = около 49%, B = около 11%, C = около 38% и D = около 1,5%.

[00666] Вариант осуществления 51. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 45-48, отличающаяся тем, что соотношение SS-OC:DSPC:Chol:ПЭГ-липид (в процентах от общего содержания липидов) составляет около A:B:C:D, где A+B+C+D = 100%, и где

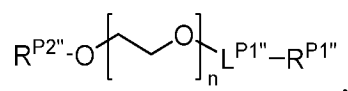
- a. A = 45-65%, B = 5-20%, C = 20-45% и D = 0-3%;
- b. A = 50-60%, B = 5-15%, C = 30-45% и D = 0,01-3%;
- c. A = 55-60%, B = 5-15%, C = 30-40% и D = 1-2%;
- d. A = 55-60 %, B = 5-10 %, C = 30-35 % и D = 1-2 %; или
- e. A = около 58%, B = около 7%, C = около 33% и D = около 1,5%.

[00667] Вариант осуществления 52. Липидная наночастица (ЛНЧ), содержащая:

- a. синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий вирус долины Сенека (SVV);

и

b. катионный липид, вспомогательный липид, структурный липид и ПЭГ-липид, где ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (A''):



Формула (A'')

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

n равно целому числу от 10 до 200, включая все конечные точки;

$L^{P1''}$ представляет собой связь, $-[(CH_2)_{0-3}-C(O)O]_{1-3}-$, $-(CH_2)_{0-3}-C(O)O-(CH_2)_{1-3}-$

OC(O)– или –C(O)N(H)–;

$R^{P1''}$ представляет собой C_5 - C_{25} алкил или C_5 - C_{25} алкенил; и

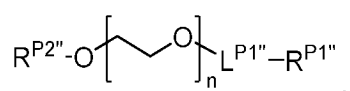
$R^{P2''}$ представляет собой водород или –CH₃, и

при этом ЛНЧ имеет молярное соотношение от около 0,001% до около 5% ПЭГ-липид.

[00668] Вариант осуществления 53. Липидная наночастица (ЛНЧ), содержащая:

а. синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий вирус Коксаки; и

б. катионный липид, вспомогательный липид, структурный липид и ПЭГ-липид, где ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (A''):



Формула (A'')

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

n равно целому числу от 10 до 200, включая все конечные точки;

$L^{P1''}$ представляет собой связь, –[(CH₂)₀₋₃–C(O)O]₁₋₃–, –(CH₂)₀₋₃–C(O)O–(CH₂)₁₋₃–, OC(O)– или –C(O)N(H)–;

$R^{P1''}$ представляет собой C_5 - C_{25} алкил или C_5 - C_{25} алкенил; и

$R^{P2''}$ представляет собой водород или –CH₃, и

при этом ЛНЧ имеет молярное соотношение от около 0,001% до около 5% ПЭГ-липид.

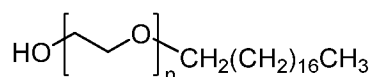
[00669] Вариант осуществления 54. ЛНЧ по варианту осуществления 52 или 53, отличающаяся тем, что R^1 представляет собой C_{16} - C_{18} алкил или C_{16} - C_{18} алкенил.

[00670] Вариант осуществления 55. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 52-54, отличающаяся тем, что $L^{P1''}$ представляет собой связь, –CH₂C(O)O–, –CH₂CH₂C(O)O–, –CH₂C(O)OCH₂C(O)O–, –CH₂C(O)OCH₂CH₂OC(O)– или –C(O)N(H)–.

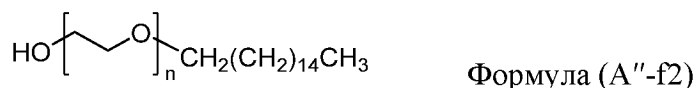
[00671] Вариант осуществления 56. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 52-54, отличающаяся тем, что $L^{P1''}$ представляет собой связь.

[00672] Вариант осуществления 57. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 52-56, отличающаяся тем, что $R^{P2''}$ представляет собой водород.

[00673] Вариант осуществления 58. ЛНЧ по варианту осуществления 52 или 53, отличающаяся тем, что ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (A''-f1), формулы (A''-f2) или формулы (A''-f3):



Формула (A''-f1)



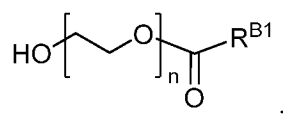
или их фармацевтически приемлемую соль.

[00674] Вариант осуществления 59. Липидная наночастица (ЛНЧ), содержащая:

а. синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий вирус долины Сенека (SVV);

и

б. катионный липид, вспомогательный липид, структурный липид и ПЭГ-липид, где ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (В):



Формула (В)

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

n равно целому числу от 10 до 200, включая все конечные точки; и

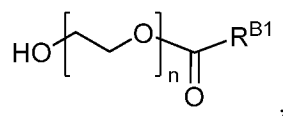
R^{B1} представляет собой C_5 - C_{25} алкил или C_5 - C_{25} алкенил, и

при этом ЛНЧ имеет молярное соотношение от около 0,001% до около 5% ПЭГ-липидов.

[00675] Вариант осуществления 60. Липидная наночастица (ЛНЧ), содержащая:

а. синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий вирус Коксаки; и

б. катионный липид, вспомогательный липид, структурный липид и ПЭГ-липид, где ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (В):



Формула (В)

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

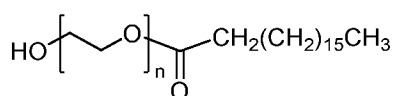
n равно целому числу от 10 до 200, включая все конечные точки; и

R^{B1} представляет собой C_5 - C_{25} алкил или C_5 - C_{25} алкенил, и

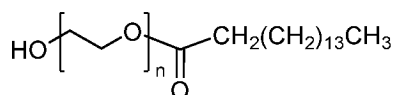
при этом ЛНЧ имеет молярное соотношение от около 0,001% до около 5% ПЭГ-липидов.

[00676] Вариант осуществления 61. ЛНЧ по варианту осуществления 59 или 60, отличающаяся тем, что R^1 представляет собой C_{15} - C_{17} алкил или C_{15} - C_{17} алкенил.

[00677] Вариант осуществления 62. ЛНЧ по варианту осуществления 59 или 60, отличающаяся тем, что ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (B-a) или формулы (B-b):



Формула (B-a)



Формула (B-b)

или их фармацевтически приемлемую соль.

[00678] Вариант осуществления 63. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 52-62, отличающаяся тем, что n составляет в среднем около 20, около 40, около 50 или около 100.

[00679] Вариант осуществления 64. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 52-62, отличающаяся тем, что n в среднем составляет около 100.

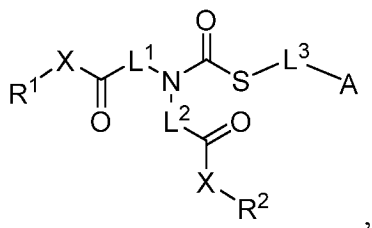
[00680] Вариант осуществления 65. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 52-64, отличающаяся тем, что ПЭГ-липид содержит фрагмент ПЭГ со средним молекулярным весом от около 200 дальтон до около 10 000 дальтон, от около 500 дальтон до около 7 000 дальтон, или от около 800 дальтон до около 6 000 дальтон.

[00681] Вариант осуществления 66. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 52-65, отличающаяся тем, что ПЭГ-липид выбран из группы, состоящей из HO-PEG100-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₄CH₃, HO-PEG20-C₁₈H₃₅, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃ и HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃.

[00682] Вариант осуществления 67. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 52-66, отличающаяся тем, что ЛНЧ индуцирует сниженный иммунный ответ *in vivo* по сравнению с контрольной ЛНЧ, не содержащей ПЭГ-липида формулы (A'') и/или ионизируемого липида формулы (I), необязательно, при этом ПЭГ-липид в контрольной ЛНЧ представляет собой PEG2K-DPG или PEG2K-DMG.

[00683] Вариант осуществления 68. ЛНЧ по варианту осуществления 67, отличающаяся тем, что иммунный ответ представляет собой ускоренный клиренс ЛНЧ из крови (ABC) и/или ответ IgM на ПЭГ.

[00684] Вариант осуществления 69. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 52-68, отличающаяся тем, что катионный липид представляет собой соединение формулы (I):



Формула (I)

или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где:

A представляет собой $-N(CH_2R^{N1})(CH_2R^{N2})$ или 4-7-членное гетероциклическое кольцо, содержащее по меньшей мере один N, где 4-7-членное гетероциклическое кольцо необязательно замещено 0-6 R^3 ;

каждый X независимо представляет собой $-O-$, $-N(R^1)-$ или $-N(R^2)-$;

R^1 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенных C_1-C_{31} алифатических групп и стероида;

R^2 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенных C_1-C_{31} алифатических групп и стероида;

R^3 необязательно замещен C_1-C_6 алифатическими группами;

каждый из R^{N1} и R^{N2} независимо представляет собой водород, гидрокси- C_1-C_6 алкил, C_2-C_6 алкенил или C_3-C_7 циклоалкил;

L^1 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенной C_1-C_{20} алкиленовой цепи и двухвалентной необязательно замещенной C_2-C_{20} алкениленовой цепи;

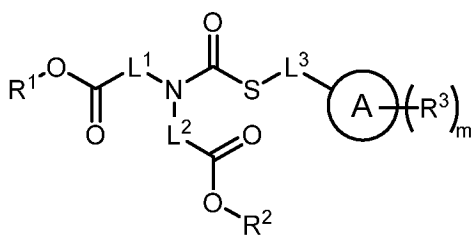
L^2 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенной C_1-C_{20} алкиленовой цепи и двухвалентной необязательно замещенной C_2-C_{20} алкениленовой цепи; и

L^3 представляет собой связь, необязательно замещенную C_1-C_6 алкиленовую цепь или двухвалентный необязательно замещенный C_3-C_7 циклоалкилен; и

при условии, что когда A представляет собой $-N(CH_3)(CH_3)$ и X представляет собой O, L^3 не является C_1-C_6 алкиленовой цепью.

[00685] Вариант осуществления 70. ЛНЧ по варианту осуществления 69, отличающаяся тем, что количество атомов углерода между S тиолата и ближайшим N, содержащимся в A, составляет 2-4.

[00686] Вариант осуществления 71. ЛНЧ по варианту осуществления 69 или 70, отличающаяся тем, что катионный липид представляет собой соединение формулы (I-a):



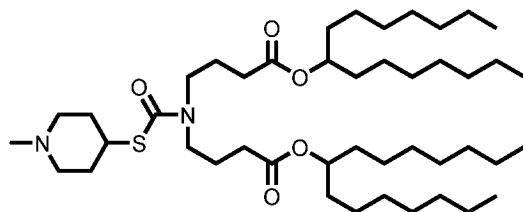
Формула (I-a)

или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где:

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

[00687] Вариант осуществления 72. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 69-71, отличающаяся тем, что А представляет собой необязательно замещенное 5-6-членное гетероциклическое кольцо.

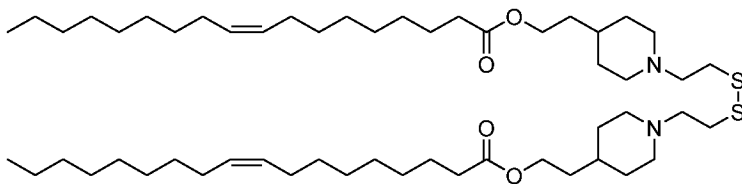
[00688] Вариант осуществления 73. ЛНЧ по варианту осуществления 69, отличающаяся тем, что катионный липид представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль или сольват.

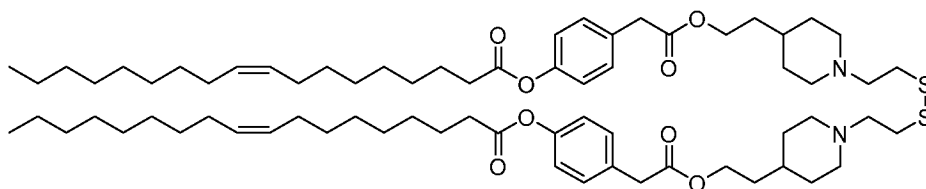
[00689] Вариант осуществления 74. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 52-68, отличающаяся тем, что катионный липид выбран из DLinDMA, DLin-KC2-DMA, DLin-MC3-DMA (MC3), COATSOME® SS-LC (прежнее название: SS-18/4PE-13), COATSOME® SS-EC (прежнее название: SS-33/4PE-15), COATSOME® SS-OC, COATSOME® SS-OP, ди((Z)-нон-2-ен-1-ил)9-((4-диметиламино)бутаноил)окси)гептадекандиоат (L-319), N-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмонийхлорида (DOTAP) или их смеси.

[00690] Вариант осуществления 75. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 52-68, отличающаяся тем, что катионный липид представляет собой соединение формулы (II-1a):



Формула (II-1a), или

соединение формулы (II-2a):



Формула (II-2a).

[00691] Вариант осуществления 76. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 52-75, отличающаяся тем, что катионный липид представляет собой соединение формулы (II-1a), структурный липид представляет собой холестерин, вспомогательный липид представляет собой DSPC, а ПЭГ-липид представляет собой BRIJ™ S100.

[00692] Вариант осуществления 77. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 52-75, отличающаяся тем, что катионный липид представляет собой соединение формулы (II-1a), структурный липид представляет собой холестерин, вспомогательный липид представляет собой DSPC и ПЭГ-липид представляет собой MYRJ™ S100, MYRJ™ S50 или MYRJ™ S40.

[00693] Вариант осуществления 78. ЛНЧ в соответствии с любым из вариантов осуществления 52-77, отличающаяся тем, что ЛНЧ содержит молярное соотношение от около 0,1% до около 2% ПЭГ-липида, например, от около 0,2% до около 0,8 мол%, от около 0,4% до около 0,6 мол%, от около от около 0,7% до около 1,3% или от около от около 1,2% до около 1,8% ПЭГ-липида.

[00694] Вариант осуществления 79. ЛНЧ в соответствии с любым из вариантов осуществления 52-78, отличающаяся тем, что ЛНЧ содержит молярное соотношение от около 0,2% до около 0,8% или около 0,5% ПЭГ-липида.

[00695] Вариант осуществления 80. ЛНЧ в соответствии с любым из вариантов осуществления 52-78, отличающаяся тем, что ЛНЧ содержит молярное соотношение от около 1,2% до около 1,8% или около 1,5% ПЭГ-липида.

[00696] Вариант осуществления 81. ЛНЧ в соответствии с любым из вариантов осуществления 52-80, отличающаяся тем, что ЛНЧ имеет молярное соотношение от около 44% до около 54% катионного липида, от около 19% до около 25% вспомогательного липида, от около 24% до около 33% структурного липида и от около 0,2% до около 0,8% ПЭГ-липида.

[00697] Вариант осуществления 82. ЛНЧ в соответствии с любым из вариантов осуществления 52-81, отличающаяся тем, что ЛНЧ содержит соединение формулы (II-1a), холестерин, DSPC и ПЭГ-липид, выбранный из HO-PEG100-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₄CH₃, HO-PEG20-

$C_{18}H_{35}$, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃ и HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, при этом молярное соотношение соединения формулы (II-1a): холестерин: DSPC : ПЭГ-липид составляет 49 : 28,5 : 22 : 0,5.

[00698] Вариант осуществления 83. ЛНЧ в соответствии с любым из вариантов осуществления 52-81, отличающаяся тем, что ЛНЧ содержит соединение формулы (II-1a), холестерин, DSPC и ПЭГ-липид, выбранный из HO-PEG100-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₄CH₃, HO-PEG20- $C_{18}H_{35}$, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃ и HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, при этом молярное соотношение соединения формулы (II-1a): холестерин: DSPC : ПЭГ-липид составляет 49 : 27,5 : 22 : 1,5.

[00699] Вариант осуществления 84. ЛНЧ в соответствии с любым из вариантов осуществления 52-81, отличающаяся тем, что ЛНЧ содержит соединение формулы (II-1a), холестерин, DSPC и ПЭГ-липид, выбранный из HO-PEG100-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₄CH₃, HO-PEG20- $C_{18}H_{35}$, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃ и HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, при этом молярное соотношение соединения формулы (II-1a): холестерин: DSPC : ПЭГ-липид составляет 49 : 38,5 : 11 : 1,5.

[00700] Вариант осуществления 85. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 52-84, отличающаяся тем, что ЛНЧ имеет соотношение липидного азот к фосфату (N:P) от около 1 до около 25.

[00701] Вариант осуществления 86. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 52-85, отличающаяся тем, что ЛНЧ имеет соотношение N:P около 14.

[00702] Вариант осуществления 87. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 1-86, в которой гиалуронан конъюгирован с поверхностью ЛНЧ.

[00703] Вариант осуществления 88. Фармацевтическая композиция, содержащая множество липидных наночастиц по любому из вариантов осуществления 1-87.

[00704] Вариант осуществления 89. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 88, отличающаяся тем, что множество ЛНЧ имеет средний диаметр от около 50 нм до около 500 нм, от около 150 нм до около 500 нм, от около 200 нм до около 500 нм, от около 300 нм до около 500 нм, от около 350 нм до около 500 нм, от около 400 нм до около 500 нм, от около 425 нм до около 500 нм, от около 450 нм до около

500 нм или от около 475 нм до около 500 нм.

[00705] Вариант осуществления 90. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 88, отличающаяся тем, что множество ЛНЧ имеют средний диаметр от около 50 нм до около 120 нм.

[00706] Вариант осуществления 91. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 88, отличающаяся тем, что множество ЛНЧ имеют средний диаметр около 50 нм, 60 нм, 70 нм, 80 нм, 90 нм, 100 нм, 110 нм или около 120 нм.

[00707] Вариант осуществления 92. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 88, отличающаяся тем, что множество ЛНЧ имеют средний диаметр около 100 нм.

[00708] Вариант осуществления 93. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 88-92, отличающаяся тем, что множество ЛНЧ имеют средний дзета-потенциал от около 40 мВ до около -40 мВ, от около 20 мВ до около -20 мВ, от около 10 мВ до около -10 мВ, от около 5 мВ до около -5 мВ или от около 20 мВ до около -40 мВ.

[00709] Вариант осуществления 94. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 88-92, отличающаяся тем, что множество ЛНЧ имеют средний дзета-потенциал менее около 5 мВ, менее около 0 мВ, менее около -5 мВ, менее около -10 мВ, менее около -20 мВ, менее около -30 мВ, менее около -35 мВ или менее около -40 мВ.

[00710] Вариант осуществления 95. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 88-92, отличающаяся тем, что множество ЛНЧ имеют средний дзета-потенциал от около -50 мВ до около -20 мВ, от около -40 мВ до около -20 мВ, от около -30 мВ до около -10 мВ, от около -20 мВ до около 0 мВ, от около -15 мВ до около 5 мВ или от около -10 мВ до около 10 мВ.

[00711] Вариант осуществления 96. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 94 или 95, в которой средний дзета-потенциал множества ЛНЧ составляет около -30 мВ, около -31 мВ, около -32 мВ, около -33 мВ, около -34 мВ, около -35 мВ, около -36 мВ, около -37 мВ, около -38 мВ, около -39 мВ или около -40 мВ.

[00712] Вариант осуществления 97. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 88-96, отличающаяся тем, что введение фармацевтической композиции субъекту доставляет в клетку-мишень субъекта полинуклеотид РНК, и при этом полинуклеотид рекомбинантной РНК продуцирует инфекционный онколитический вирус, способный лизировать клетку-мишень субъекта.

[00713] Вариант осуществления 98. Фармацевтическая композиция по

варианту осуществления 97, в которой клетка-мишень представляет собой раковую клетку.

[00714] Вариант осуществления 99. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 88-98, в которой композиция составлена для внутривенной и/или внутриопухолевой доставки.

[00715] Вариант осуществления 100. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 88-99, отличающаяся тем, что композиция имеет продолжительность терапевтического эффекта *in vivo* больше, чем у композиции, не содержащей ПЭГ-липиды Формулы (A'') и/или ионизируемого липида Формулы (I).

[00716] Вариант осуществления 101. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 99 или 100, отличающаяся тем, что композиция имеет продолжительность терапевтического эффекта *in vivo* около 1 часа или более, около 2 часов или более, около 3 часов или более, около 4 часов или более, около 5 часов или более, около 6 часов или более, около 7 часов или более, около 8 часов или более, около 9 часов или более, около 10 часов или более, около 12 часов или более, около 14 часов или более, около 16 часов или более, около 18 часов или более, около 20 часов или более, около 25 часов или более, около 30 часов или более, около 35 часов или более, около 40 часов или более, около 45 часов или более или около 50 часов или более.

[00717] Вариант осуществления 102. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 99 или 100, отличающаяся тем, что композиция имеет период полувыведения и/или AUC *in vivo*, превышающий или равный предварительно определенному пороговому значению.

[00718] Вариант осуществления 103. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 88-102, отличающаяся тем, что эффективность инкапсуляции синтетического РНК-вирусного генома с помощью ЛНЧ составляет не менее 70 %, не менее 75 %, не менее 80 %, не менее 85 %, не менее 90 %, не менее 91 %, не менее 92 %, не менее 93 %, не менее 94 %, не менее 95 %, не менее 96 %, не менее 97 %, не менее 98 %, не менее 99 % или 100 %.

[00719] Вариант осуществления 104. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 88-103, отличающаяся тем, что композиция имеет общую концентрацию липидов около 10 mM, около 20 mM, около 30 mM, около 40 mM или около 50 mM.

[00720] Вариант осуществления 105. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 88-104, отличающаяся тем, что композиция составлена при pH около 2,5, около 3, около 3,5, около 4, около 4,5, около 5, около 5,5 или

около 6.

[00721] Вариант осуществления 106. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 88-105, отличающаяся тем, что композиция составлена для многократного введения.

[00722] Вариант осуществления 107. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 106, отличающаяся тем, что последующее введение проводят по меньшей мере через 3 дня, по меньшей мере через 5 дней, по меньшей мере через 7 дней, по меньшей мере через 9 дней, по меньшей мере через 11 дней, по меньшей мере через 14 дней или по меньшей мере через 21 день после первого введения.

[00723] Вариант осуществления 108. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 88-107, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

[00724] Вариант осуществления 109. Молекула рекомбинантной РНК, содержащая синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий онколитический вирус Коксаки, где вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21, выбранный из штамма EF и штамма KY.

[00725] Вариант осуществления 109,1. Молекула рекомбинантной РНК, содержащая синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий онколитический вирус Коксаки, где вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21 Kuyskendall.

[00726] Вариант осуществления 110. Молекула рекомбинантной РНК по варианту осуществления 109, отличающаяся тем, что вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21-KY, при этом штамм CVA21-KY содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 5.

[00727] Вариант осуществления 111. Молекула рекомбинантной РНК по варианту осуществления 109, отличающаяся тем, что вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21-EF, при этом штамм CVA21-EF содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 9.

[00728] Вариант осуществления 112. Молекула рекомбинантной РНК по варианту осуществления 109, отличающаяся тем, что вирус Коксаки содержит последовательность 5' UTR (IRES), по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичную

последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 6 или 10.

[00729] Вариант осуществления 113. Молекула рекомбинантной РНК по варианту осуществления 109, отличающаяся тем, что вирус Коксаки содержит последовательность P1, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичную последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 7 или 11.

[00730] Вариант осуществления 114. Молекула рекомбинантной РНК по варианту осуществления 109, отличающаяся тем, что вирус Коксаки содержит последовательность 3D, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичную последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 8 или 12.

[00731] Вариант осуществления 115. Молекула рекомбинантной РНК по любому из вариантов осуществления 109-114, отличающаяся тем, что синтетический РНК-вирусный геном не содержит полинуклеотидную последовательность, более чем на 95%, более чем на 90%, более чем на 85% или более чем на 80% идентичную последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1.

[00732] Вариант осуществления 116. Молекула рекомбинантной РНК по любому из вариантов осуществления 109-115, отличающаяся тем, что молекула рекомбинантной РНК не содержит РНК-вирусный геном, обладающий 100% идентичностью последовательности с вирусом Коксаки дикого типа.

[00733] Вариант осуществления 117. Молекула рекомбинантной РНК, содержащая синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий вирус долины Сенека (SVV), при этом SVV представляет собой химерный SVV, и при этом синтетический РНК-вирусный геном содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 68.

[00734] Вариант осуществления 118. Молекула рекомбинантной РНК по любому из вариантов осуществления 109-117, дополнительно содержащая кассету целевой последовательности микроРНК (miРНК) (miR-TS), вставленную в полинуклеотидную последовательность, кодирующую онколитический вирус, при этом кассета miR-TS содержит одну или несколько целевых последовательностей микроРНК, и при этом экспрессия одной или нескольких соответствующих микроРНК в клетке ингибирует репликацию кодируемого вируса в клетке.

[00735] Вариант осуществления 119. Молекула рекомбинантной РНК по варианту осуществления 118, в которой одна или более микроРНК выбраны из miR-124,

miR-1, miR-143, miR-128, miR-219, miR-219a, miR-122, miR-204, miR-217, miR-137, miR-142 и miR-126.

[00736] Вариант осуществления 120. Молекула рекомбинантной РНК по варианту осуществления 119, отличающаяся тем, что кассета miR-TS содержит:

a. одну или несколько копий целевой последовательности miR-124, одну или несколько копий целевой последовательности miR-1 и одну или несколько копий целевой последовательности miR-143;

b. одну или несколько копий целевой последовательности miR-128, одну или несколько копий целевой последовательности miR-219a и одну или несколько копий целевой последовательности miR-122;

c. одну или несколько копий целевой последовательности miR-128, одну или несколько копий целевой последовательности miR-204 и одну или несколько копий целевой последовательности miR-219; или

d. одну или несколько копий целевой последовательности miR-217, одну или несколько копий целевой последовательности miR-137 и одну или несколько копий целевой последовательности miR-126.

[00737] Вариант осуществления 121. Молекула рекомбинантной РНК по любому из вариантов осуществления 109-120, отличающаяся тем, что молекула рекомбинантной РНК способна продуцировать репликационно-компетентный онколитический вирус при введении в клетку невирусным средством доставки.

[00738] Вариант осуществления 122. Молекула рекомбинантной РНК по варианту осуществления 121, в которой клетка представляет собой клетку млекопитающего.

[00739] Вариант осуществления 123. Молекула рекомбинантной РНК по варианту осуществления 122, в которой клетка представляет собой клетку млекопитающего, присутствующую в субъекте-млекопитающем.

[00740] Вариант осуществления 124. Молекула рекомбинантной РНК по любому из вариантов осуществления 118-123, в которой одна или более кассет miR-TS встроена в 5'-нетранслируемую область (UTR) или 3'-UTR одного или более вирусных генов.

[00741] Вариант осуществления 125. Молекула рекомбинантной РНК по любому из вариантов осуществления 118-123, отличающаяся тем, что одна или более кассет miR-TS включены в открытую рамку считывания (ORF), 5'-нетранслируемую область (UTR) или 3'-UTR одного или больше вирусных генов.

[00742] Вариант осуществления 126. Молекула рекомбинантной РНК по

любому из вариантов осуществления 109-125, отличающаяся тем, что молекула рекомбинантной РНК вставлена в вектор нуклеиновой кислоты.

[00743] Вариант осуществления 127. Молекула рекомбинантной РНК по варианту осуществления 126, отличающаяся тем, что вектор нуклеиновой кислоты представляет собой репликон.

[00744] Вариант осуществления 128. Молекула рекомбинантной РНК по любому из вариантов осуществления 109-127, отличающаяся тем, что синтетический РНК-вирусный геном дополнительно содержит гетерологичный полинуклеотид, кодирующий экзогенный белок полезной нагрузки.

[00745] Вариант осуществления 129. Молекула рекомбинантной РНК по варианту осуществления 128, отличающаяся тем, что экзогенный белок полезной нагрузки содержит или состоит из домена 4HB MLKL, N-концевого фрагмента гасдермина D, N-концевого фрагмента гасдермина E, домена Box B HMGB1, SMAC/Diablo, мелиттина, оксидазы L-аминокислот (LAAO), дезинтегрин, TRAIL (TNFSF10), нитроредуктазы, белка FAST реовируса, лептина/FOSL2, α -1,3-галактозилтрансферазы или аденозиндезаминазы 2 (ADA2).

[00746] Вариант осуществления 130. ЛНЧ по варианту осуществления 129, отличающаяся тем, что нитроредуктаза представляет собой NfsB или NfsA.

[00747] Вариант осуществления 131. ЛНЧ по варианту осуществления 129, отличающаяся тем, что белок FAST реовируса представляет собой ARV p14, BRV p15 или гибрид p14-p15.

[00748] Вариант осуществления 132. Молекула рекомбинантной РНК по варианту осуществления 128, отличающаяся тем, что экзогенный белок полезной нагрузки представляет собой флуоресцентный белок, белок-фермент, цитокин, хемокин, антигенсвязывающую молекулу, способную связываться с рецептором клеточной поверхности, или лиганд, способный связываться с рецептором клеточной поверхности.

[00749] Вариант осуществления 133. Молекула рекомбинантной РНК по варианту осуществления 132, отличающаяся тем, что

- а) цитокин выбран из GM-CSF, IFN γ , IL-2, IL-7, IL-12, IL-18, IL-21 и IL-36 γ ;
- б) лиганд для рецептора клеточной поверхности представляет собой лиганд Flt3 или TNFSF14;
- с) хемокин выбран из CXCL10, CCL4, CCL21 и CCL5.

[00750] Вариант осуществления 134. Молекула рекомбинантной РНК по варианту осуществления 132, в которой антигенсвязывающая молекула способна связываться с рецептором иммунной контрольной точки и ингибировать его.

[00751] Вариант осуществления 135. Молекула рекомбинантной РНК по варианту осуществления 134, отличающаяся тем, что рецептор иммунной контрольной точки представляет собой PD-1.

[00752] Вариант осуществления 136. Молекула рекомбинантной РНК по варианту осуществления 132, отличающаяся тем, что антигенсвязывающая молекула способна связываться с опухолевым антигеном.

[00753] Вариант осуществления 137. Молекула рекомбинантной РНК по варианту осуществления 136, отличающаяся тем, что антигенсвязывающая молекула представляет собой молекулу привлекающего Т-клетки биспецифического активатора (BiTE), или молекулу привлекающего Т-клетки биспецифического «легкого» активатора (LiTE).

[00754] Вариант осуществления 138. Молекула рекомбинантной РНК по варианту осуществления 136 или 137, отличающаяся тем, что опухолевый антиген представляет собой вирусный антиген, выбранный из HBV-core (внутренний антиген гепатита В), HBV-pol, HbS-Ag, HPV E6, HPV E7, большого Т-антигена полиомавируса клеток Меркеля и антигена EBNA2 или BZLF1 вируса Эпштейна-Барра.

[00755] Вариант осуществления 139. Молекула рекомбинантной РНК по варианту осуществления 136 или 137, отличающаяся тем, что опухолевый антиген представляет собой DLL3 или EpCAM.

[00756] Вариант осуществления 140. Рекомбинантная матрица ДНК, содержащая от 5' к 3' последовательность промотора, 5' соединительную последовательность расщепления, полинуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу РНК, содержащую синтетический РНК-вирусный геном, хвост поли-А и 3' соединительную последовательность расщепления.

[00757] Вариант осуществления 141. Молекула рекомбинантной ДНК, содержащая от 5' к 3' последовательность промотора, 5' соединительную последовательность расщепления, полинуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу РНК, содержащую синтетический РНК-вирусный геном, хвост поли-А и 3' соединительную последовательность расщепления, при этом молекула РНК выбрана из любого из вариантов осуществления 109-139.

[00758] Вариант осуществления 142. Молекула рекомбинантной ДНК по варианту осуществления 140 или 141, содержащая лидерную последовательность между последовательностью промотора и 5' соединительной последовательностью расщепления.

[00759] Вариант осуществления 143. Молекула рекомбинантной ДНК, содержащая от 5' к 3' последовательность промотора, 5' соединительную

последовательность расщепления, полинуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу рекомбинантной РНК, содержащую синтетический РНК-вирусный геном, хвост поли-А и 3' соединительную последовательность расщепления.

[00760] Вариант осуществления 144. Молекула рекомбинантной ДНК по варианту осуществления 142 или 143, в которой лидерная последовательность имеет длину менее 100 п.н.

[00761] Вариант осуществления 145. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из вариантов осуществления 140-144, отличающаяся тем, что последовательность промотора представляет собой последовательность промотора Т7.

[00762] Вариант осуществления 146. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из вариантов осуществления 140-145, отличающаяся тем, что хвост поли-А имеет длину около 50-90 п.н. или около 65-75 п.н.

[00763] Вариант осуществления 147. Молекула рекомбинантной ДНК по варианту осуществления 145, отличающаяся тем, что хвост поли-А имеет длину около 70 п.н.

[00764] Вариант осуществления 148. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из вариантов осуществления 140-145, отличающаяся тем, что хвост поли-А имеет длину около 10-50 п.н. или 25-35 п.н.

[00765] Вариант осуществления 149. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из вариантов осуществления 140-148, отличающаяся тем, что 5' соединительная последовательность расщепления содержит последовательность рибозима или состоит из нее, и 3' соединительная последовательность расщепления содержит последовательность рибозима или состоит из нее.

[00766] Вариант осуществления 150. Молекула рекомбинантной ДНК по варианту осуществления 149, отличающаяся тем, что 5' последовательность рибозима представляет собой последовательность рибозима типа «головка молотка», а 3' последовательность рибозима представляет собой последовательность рибозима вируса гепатита дельта.

[00767] Вариант осуществления 151. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из вариантов осуществления 140-148, отличающаяся тем, что 5' соединительная последовательность расщепления содержит последовательность связывания праймера РНКазы Н или состоит из нее, а 3' соединительная последовательность расщепления содержит последовательность распознавания ферментом рестрикции или состоит из нее.

[00768] Вариант осуществления 152. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из вариантов осуществления 140-148, отличающаяся тем, что 5' соединительная

последовательность расщепления содержит последовательность рибозима или состоит из нее, и 3' соединительная последовательность расщепления содержит последовательность распознавания ферментом рестрикции или состоит из нее.

[00769] Вариант осуществления 153. Молекула рекомбинантной ДНК по варианту осуществления 152, отличающаяся тем, что 5' последовательность рибозима содержит или состоит из последовательности рибозима типа «головка молотка», последовательности рибозима типа «пистолет» или модифицированной последовательности рибозима типа «пистолет».

[00770] Вариант осуществления 154. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из вариантов осуществления 140-153, отличающаяся тем, что 3' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности распознавания ферментом рестрикции типа IIS.

[00771] Вариант осуществления 155. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из вариантов осуществления 140-154, отличающаяся тем, что молекула РНК кодирует РНК-вирусный геном вируса Коксаки (CVA).

[00772] Вариант осуществления 156. Молекула рекомбинантной ДНК по варианту осуществления 155, отличающаяся тем, что вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21.

[00773] Вариант осуществления 157. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из вариантов осуществления 155-156, отличающаяся тем, что лидерная последовательностью содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70 %, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 14 или 15.

[00774] Вариант осуществления 158. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из вариантов осуществления 155-157, отличающаяся тем, что 5' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности рибозима типа «пистолет», по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 % или на 100 % идентичной последовательности с SEQ ID NO: 18, и при этом мотив P2 5' последовательности рибозима имеет полинуклеотидную последовательность «TTTT».

[00775] Вариант осуществления 159. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из вариантов осуществления 155-157, отличающаяся тем, что 5' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности рибозима типа «пистолет», по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 % или на 100 % идентичной последовательности с SEQ ID NO: 17, и при этом мотив P2 5'

последовательности рибозима имеет полинуклеотидную последовательность «ТТТА».

[00776] Вариант осуществления 160. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из вариантов осуществления 155-159, отличающаяся тем, что 3' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности распознавания BsmBI.

[00777] Вариант осуществления 161. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из вариантов осуществления 155-159, отличающаяся тем, что 3' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности распознавания BsaI.

[00778] Вариант осуществления 162. Молекула рекомбинантной ДНК по варианту осуществления 156, отличающаяся тем, что последовательность промотора представляет собой последовательность промотора T7, при этом лидерная последовательность состоит из полинуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 15, при этом 5' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности рибозима типа «пистолет» в соответствии с SEQ ID NO: 18, при этом хвост поли-А имеет длину около 70 п.н., и при этом 3' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности распознавания BsmBI.

[00779] Вариант осуществления 163. Молекула рекомбинантной ДНК по варианту осуществления 156, отличающаяся тем, что последовательность промотора представляет собой последовательность промотора T7, при этом лидерная последовательность состоит из полинуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 15, при этом 5' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности рибозима типа «пистолет» в соответствии с SEQ ID NO: 18, при этом хвост поли-А имеет длину около 70 п.н., и при этом 3' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности распознавания BsaI.

[00780] Вариант осуществления 164. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из вариантов осуществления 140-154, отличающаяся тем, что молекула РНК кодирует РНК-вирусный геном вируса долины Сенека (SVV).

[00781] Вариант осуществления 165. Молекула рекомбинантной ДНК по варианту осуществления 164, отличающаяся тем, что лидерная последовательность содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70 %, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичной любой последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 53-63.

[00782] Вариант осуществления 166. Молекула рекомбинантной ДНК по варианту осуществления 164, отличающаяся тем, что лидерная последовательностью содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70 %, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 58.

[00783] Вариант осуществления 167. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из вариантов осуществления 164-166, отличающаяся тем, что 5' последовательность рибозима представляет собой последовательность рибозима типа «пистолет», по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичную последовательности SEQ ID NO: 64 или 65, и при этом мотив P2 5' последовательности рибозима имеет полинуклеотидную последовательность «ТСАА» или «ТТАА».

[00784] Вариант осуществления 168. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из вариантов осуществления 164-167, отличающаяся тем, что РНК-вирусный геном содержит последовательность 5'-UTR (IRES), по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную нуклеиновым кислотам 1–670 последовательности SEQ ID NO: 68.

[00785] Вариант осуществления 169. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из вариантов осуществления 164-168, отличающаяся тем, что 3' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности распознавания SapI.

[00786] Вариант осуществления 170. Молекула рекомбинантной ДНК по варианту осуществления 164, отличающаяся тем, что последовательность промотора представляет собой последовательность промотора T7, при этом лидерная последовательность состоит из полинуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 53, при этом 5' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности рибозима типа «пистолет» в соответствии с SEQ ID NO: 64, при этом хвост поли-А имеет длину около 70 п.н., и при этом 3' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности распознавания SapI.

[00787] Вариант осуществления 171. Молекула рекомбинантной ДНК по варианту осуществления 164, отличающаяся тем, что последовательность промотора представляет собой последовательность промотора T7, при этом лидерная последовательность состоит из полинуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 58, при этом 5' соединительная последовательность расщепления содержит

или состоит из последовательности рибозима типа «пистолет» в соответствии с SEQ ID NO: 64, при этом хвост поли-А имеет длину около 70 п.н., и при этом 3' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности распознавания SapI.

[00788] Вариант осуществления 172. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из вариантов осуществления 140-171, отличающаяся тем, что молекула рекомбинантной ДНК не содержит дополнительной нуклеиновой кислоты в области, охватывающей последовательность промотора и 3' соединительную последовательность расщепления.

[00789] Вариант осуществления 173. Способ получения молекулы рекомбинантной РНК, включающий транскрипцию *in vitro* молекулы ДНК по любому из вариантов осуществления 140-172 и очистку полученной молекулы рекомбинантной РНК.

[00790] Вариант осуществления 174. Способ по варианту осуществления 173, отличающийся тем, что молекула рекомбинантной РНК содержит 5'- и 3'-концы, которые являются нативными для онколитического вируса, кодируемого синтетическим РНК-вирусным геномом.

[00791] Вариант осуществления 175. Композиция, содержащая эффективное количество молекулы рекомбинантной РНК по любому из вариантов осуществления 109-139, и носитель, подходящий для введения субъекту-млекопитающему.

[00792] Вариант осуществления 176. Частица, содержащая молекулу рекомбинантной РНК по любому из вариантов осуществления 109-139.

[00793] Вариант осуществления 177. Частица по варианту осуществления 176, в которой частица является биоразлагаемой.

[00794] Вариант осуществления 178. Частица по варианту осуществления 177, в которой частица выбрана из группы, состоящей из наночастицы, экзосомы, липосомы и липоплекса.

[00795] Вариант осуществления 179. Частица по варианту осуществления 178, в которой экзосома представляет собой модифицированную экзосому, полученную из интактной экзосомы или пустой экзосомы.

[00796] Вариант осуществления 180. Фармацевтическая композиция, содержащая множество частиц по любому из вариантов осуществления 176-179.

[00797] Вариант осуществления 181. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 180, отличающаяся тем, что множество частиц имеет средний размер от около 50 нм до около 500 нм, от около 150 нм до около 500 нм, от около 200 нм до около 500 нм, от около 300 нм до около 500 нм, от около 350 нм до около 500 нм, от

около 400 нм до около 500 нм, от около 425 нм до около 500 нм, от около 450 нм до около 500 нм или от около 475 нм до около 500 нм.

[00798] Вариант осуществления 182. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 180, отличающаяся тем, что множество частиц имеют средний размер от около 50 нм до около 120 нм.

[00799] Вариант осуществления 183. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 180, отличающаяся тем, что множество частиц имеют средний размер около 50 нм, 60 нм, 70 нм, 80 нм, 90 нм, 100 нм, 110 нм или около 120 нм.

[00800] Вариант осуществления 184. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 180, отличающаяся тем, что множество частиц имеют средний размер около 100 нм.

[00801] Вариант осуществления 185. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 180-184, отличающаяся тем, что множество частиц имеют средний дзета-потенциал от около 40 мВ до около -40 мВ, от около 20 мВ до около -20 мВ, от около 10 мВ до около -10 мВ, от около 5 мВ до около -5 мВ или от около 20 мВ до около -40 мВ.

[00802] Вариант осуществления 186. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 180-184, отличающаяся тем, что множество частиц имеют средний дзета-потенциал менее около 5 мВ, менее около 0 мВ, менее около -5 мВ, менее около -10 мВ, менее около -20 мВ, менее около -30 мВ, менее около -35 мВ или менее около -40 мВ.

[00803] Вариант осуществления 187. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 180-186, отличающаяся тем, что множество частиц имеют средний дзета-потенциал от около -50 мВ до около -20 мВ, от около -40 мВ до около -20 мВ, от около -30 мВ до около -10 мВ, от около -20 мВ до около 0 мВ, от около -15 мВ до около 5 мВ или от около -10 мВ до около 10 мВ.

[00804] Вариант осуществления 188. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 180-186, в которой средний дзета-потенциал множества частиц составляет около -30 мВ, около -31 мВ, около -32 мВ, около -33 мВ, около -34 мВ, около -35 мВ, около -36 мВ, около -37 мВ, около -38 мВ, около -39 мВ или около -40 мВ.

[00805] Вариант осуществления 189. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 180-188, в которой доставка композиции субъекту доставляет инкапсулированную молекулу рекомбинантной РНК в клетку-мишень, при этом инкапсулированная молекула рекомбинантной РНК продуцирует инфекционный

вирус, способный лизировать клетку-мишень.

[00806] Вариант осуществления 190. Неорганическая частица, содержащая молекулу рекомбинантной РНК по любому из вариантов осуществления 109-139.

[00807] Вариант осуществления 191. Неорганическая частица по варианту осуществления 190, в которой неорганическая частица выбрана из группы, состоящей из золотой наночастицы (ЗНЧ), золотого наностержня (ЗНС), магнитной наночастицы (МНЧ), магнитной нанотрубки (МНТ), углеродного нанорога (УНР), углеродного фуллерена, углеродной нанотрубки (УНТ), наночастицы фосфата кальция (НЧФК), наночастицы мезопористого кремнезема (НЧМК), нанотрубки кремнезема (НТК) или звездообразной полый наночастицы кремнезема (ЗПНЧ).

[00808] Вариант осуществления 192. Композиция, содержащая неорганическую частицу по любому из вариантов осуществления 190-191, отличающаяся тем, что средний диаметр частиц составляет менее около 500 нм, составляет от около 50 нм до 500 нм, составляет от около 250 нм до около 500 нм или составляет около 350 нм.

[00809] Вариант осуществления 193. ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 1-87, частица по любому из вариантов осуществления 176-179 или неорганическая частица по любому из вариантов осуществления 190-191, дополнительно содержащая вторую молекулу рекомбинантной РНК, кодирующую молекулу полезной нагрузки.

[00810] Вариант осуществления 194. ЛНЧ, частица или неорганическая частица по варианту осуществления 193, в которой вторая молекула рекомбинантной РНК представляет собой репликон.

[00811] Вариант осуществления 195. Фармацевтическая композиция, содержащая ЛНЧ по любому из вариантов осуществления 1-87, частицу по любому из вариантов осуществления 176-179 или неорганическую частицу по любому из вариантов осуществления 190-191, отличающаяся тем, что композиция составлена для внутривенной и/или внутриопухолевой доставки.

[00812] Вариант осуществления 196. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 195, отличающаяся тем, что клетка-мишень ЛНЧ, частицы или неорганической частицы представляет собой раковую клетку.

[00813] Вариант осуществления 197. Способ уничтожения раковой клетки, включающий воздействие на раковую клетку частицей по любому из вариантов осуществления 1-87, 176-179 или 190-191, молекулой рекомбинантной РНК по любому из вариантов осуществления 109-139, или их композициями, в условиях, достаточных для внутриклеточной доставки частицы в указанную раковую клетку, при этом

репликационно-компетентный вирус, продуцируемый инкапсулированным полинуклеотидом, приводит к уничтожению раковой клетки.

[00814] Вариант осуществления 198. Способ по варианту осуществления 197, в котором репликационно-компетентный вирус не продуцируется в нераковых клетках.

[00815] Вариант осуществления 199. Способ по варианту осуществления 197 или 198, в котором способ осуществляют *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*.

[00816] Вариант осуществления 200. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту, страдающему раком, эффективного количества частицы по любому из вариантов осуществления 1-87, 176-179 или 190-191, молекулы рекомбинантной РНК по любому из вариантов осуществления 109-139, или их композиций.

[00817] Вариант осуществления 201. Способ по варианту осуществления 200, в котором частицу или ее композицию вводят внутривенно, интраназально, внутриопухолево, внутрибрюшинно или в виде ингаляции.

[00818] Вариант осуществления 202. Способ по варианту осуществления 200, в котором частицу или ее композицию вводят внутриопухолево и/или внутривенно.

[00819] Вариант осуществления 203. Способ по любому из вариантов осуществления 200-202, в котором частицу или ее композицию вводят субъекту многократно.

[00820] Вариант осуществления 204. Способ по любому из вариантов осуществления 200-203, в котором субъектом является мышь, крыса, кролик, кошка, собака, лошадь, примат, не являющийся человеком, или человек.

[00821] Вариант осуществления 205. Способ по любому из вариантов осуществления 200-204, в котором рак представляет собой рак легкого, рак молочной железы, рак толстой кишки или рак поджелудочной железы, при этом синтетический РНК-вирусный геном содержит полинуклеотидную последовательность, полученную из штамма KY.

[00822] Вариант осуществления 206. Способ по любому из вариантов осуществления 200-204, в котором рак представляет собой рак мочевого пузыря, почечно-клеточную карциному, рак яичников, рак желудка или рак печени, при этом синтетический РНК-вирусный геном содержит полинуклеотидную последовательность, полученную из штамма EF.

[00823] Вариант осуществления 207. Способ по любому из вариантов осуществления 197-204, в котором рак выбран из рака легких, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака предстательной железы, рака яичек, колоректального

рака, рака толстой кишки, рака поджелудочной железы, рака печени, почечно-клеточной карциномы, рака желудка, рака головы и шеи, рака щитовидной железы, злокачественной глиомы, глиобластомы, меланомы, В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза, множественной миеломы, моноклональной гаммапатии неустановленной значимости (MGUS), карциномы из клеток Меркеля, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), саркомы, нейробластомы, нейроэндокринного рака, рабдомиосаркомы, медуллобластомы, рака мочевого пузыря и лимфомы маргинальной зоны (MZL).

[00824] Вариант осуществления 208. Способ по любому из вариантов осуществления 197-204, в котором рак выбран из групп, состоящей из рака легкого, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, почечно-клеточной саркомы, рака яичников, рака желудка и рака печени.

[00825] Вариант осуществления 209. Способ по любому из вариантов осуществления 197-204, в котором рак представляет собой почечно-клеточную карциному, рак легкого или рак печени.

[00826] Вариант осуществления 210. Способ по варианту осуществления 205, 207 или 208, в котором рак легкого представляет собой мелкоклеточный рак легкого или немелкоклеточный рак легкого (например, плоскоклеточный рак легкого или аденокарциному легкого).

[00827] Вариант осуществления 211. Способ по любому из вариантов осуществления 206, 207 и 208, отличающийся тем, что рак печени представляет собой гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК) (например, ГЦК, ассоциированную с вирусом гепатита В).

[00828] Вариант осуществления 212. Способ по варианту осуществления 207, отличающийся тем, что рак предстательной железы представляет собой возникший после начала лечения нейроэндокринный рак предстательной железы.

[00829] Вариант осуществления 213. Способ по любому из вариантов осуществления 197-204, в котором рак представляет собой рак легкого, рак печени, рак предстательной железы (например, CRPC-NE), рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, рак желудка, рак молочной железы, нейробластому, почечно-клеточную карциному, рак яичников, рабдомиосаркому, медуллобластому, нейроэндокринный рак, карциному из клеток Меркеля или меланому.

[00830] Вариант осуществления 214. Способ по любому из вариантов осуществления 197-204, отличающийся тем, что рак представляет собой мелкоклеточный рак легкого (МРЛ) или нейробластому.

[00831] Вариант осуществления 215. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества вируса CVA21-EF.

[00832] Вариант осуществления 216. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества вируса CVA21-KY.

[00833] Вариант осуществления 217. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества вируса CVA21-Kuykendall.

[00834] Вариант осуществления 218. Способ по любому из вариантов осуществления 215-217, в котором вирус вводят внутриопухолево и/или внутривенно.

[00835] Вариант осуществления 219. Способ по любому из вариантов осуществления 197-218, дополнительно включающий введение субъекту ингибитора иммунной контрольной точки.

[00836] Вариант осуществления 220. Способ по варианту осуществления 219, отличающийся тем, что ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор PD-1.

[00837] Вариант осуществления 221. Способ по любому из вариантов осуществления 197-218, дополнительно включающий введение сконструированной иммунной клетки, содержащей сконструированный антигенный рецептор.

[00838] Вариант осуществления 222. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества онколитического вируса Коксаки, при этом вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21, или полинуклеотида, кодирующего CVA21, при этом рак классифицируется как чувствительный к инфекции CVA21 на основе экспрессии ICAM-1 и/или процентного содержания ICAM-1-положительных раковых клеток.

[00839] Вариант осуществления 223. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий:

(a) определение уровня экспрессии ICAM1 и/или процентного содержания ICAM-1-положительных раковых клеток при раке;

(b) классификацию рака как чувствительного к инфекции вирусом Коксаки 21 (CVA21) на основе экспрессии ICAM-1 и/или процентного содержания ICAM-1-положительных раковых клеток, определенных на стадии (a); и

(c) введение субъекту терапевтически эффективного количества CVA21 или полинуклеотида, кодирующего CVA21, если рак классифицируется как чувствительный к

инфекции CVA21 на стадии (b).

[00840] Вариант осуществления 224. Способ выбора субъекта, страдающего раком, для лечения вирусом Коксаки 21 (CVA21) или полинуклеотидом, кодирующим CVA21, включающий:

(a) определение уровня экспрессии ICAM-1 и/или процентного содержания ICAM-1-положительных раковых клеток при раке;

(b) классификацию рака как чувствительного к инфекции вирусом CVA21 на основе уровня экспрессии ICAM-1 и/или процентного содержания ICAM1-положительных раковых клеток, как определено на стадии (a);

(c) выбор субъекта для лечения CVA21 или полинуклеотидом, кодирующим CVA21, если рак классифицируется как чувствительный к инфекции CVA21 на стадии (b);
и

(d) введение CVA21 или полинуклеотида, кодирующего CVA21, выбранным субъектам

[00841] Вариант осуществления 225. Способ по любому из вариантов осуществления 222-224, отличающийся тем, что штамм CVA21 представляет собой CVA21-KY.

ПРИМЕРЫ

[00842] Следующие ниже примеры предоставлены с целью иллюстрации различных вариантов осуществления изобретения и не предназначены для ограничения настоящего изобретения каким-либо образом. Настоящие примеры, наряду с описанными в данном документе способами, в настоящее время представляют собой предпочтительные варианты осуществления, являются иллюстративными и не предназначены для ограничения объема изобретения. Специалистам в данной области техники будут понятны изменения и другие виды применения, которые охвачены сутью изобретения, определенной объемом формулы изобретения.

Пример 1: Получение инфекционного вируса пикорнавируса из молекул рекомбинантной РНК

[00843] Были проведены эксперименты по оценке способности продуцировать инфекционный вирус CVA21 из молекул рекомбинантной РНК. Вкратце, полинуклеотиды РНК, содержащие вирусные геномы CVA21, были получены путем транскрипции T7 *in vitro*, и клетки 293Т трансфицировали 1 мкг конструкций CVA21-РНК в липофектине RNAiMax в течение 4 часов, клетки промывали и в каждую лунку добавляли полную среду. Супернатанты трансфицированных 293Т собирали через 72 часа, фильтровали шприцем с помощью фильтра 0,45 мкм и серийно разводили на

клетках NCI-H1299. Через 48 часов супернатанты удаляли из культур NCI-H1299, а клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым для оценки вирусной инфекционности. Молекулы РНК, содержащие вирусные геномы CVA21, продуцировали активный литический вирус (данные не показаны).

[00844] Кроме того, супернатанты клеток NCI-H1299, обработанных 1 мкг липидными CVA21-РНК, плазмидной ДНК CVA21 или CVA21-негативным контролем пДНК, собирали через 72 часа и серийно разводили на неинфицированных клетках NCI-H1299. Анализы жизнеспособности клеток проводили в соответствии со стандартными протоколами. CVA21-РНК/ ЛНЧ способны продуцировать инфекционный вирус, который приводит к лизису опухолевых клеток *in vitro* (данные не показаны).

Пример 2: Состав липидных наночастиц для внутривенной доставки CVA21-кодирующей РНК.

[00845] Молекулы рекомбинантной РНК, содержащие геномы CVA21, были сформулированы в липидные наночастицы для доставки РНК *in vivo*.

Производство липидных наночастиц:

[00846] В составах липидных наночастиц использовали следующие липиды:

- (a) D-Lin-MC3-DMA(MC3);
- (b) N-(2,3-диолеилокси)пропил-N,N,N-триметиламмоний хлорид.(DOTAP)
- (c) COATSOME® SS-LC (прежнее название: SS-18/4PE-13);
- (d) COATSOME® SS-EC (прежнее название: SS-33/4PE-15);
- (e) COATSOME® SS-OC;
- (f) COATSOME® SS-OP;
- (g) Ди((Z)-нон-2-ен-1-ил)9-((4-диметиламино)бутаноил)окси)гептадекандиоат (L-319)
- (h) холестерин;
- (i) 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC);
- (j) 1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DLPE);
- (k) 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC);
- (l) 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE);
- (m) 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[амино(полиэтиленгликоль)-5000] (DSPE-PEG5K);
- (n) 1,2-дипальмитоил-рац-глицерин метоксиполиэтиленгликоль-2000 (DPG-PEG2K);
- (o) 1,2-дистеароил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилен-2000 (DSG-PEG2K);
- (p) 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилен-2000 (DMG-PEG2K)

- (q) полиоксиэтилен (100) стеариловый эфир (BRIJ™ S100; номер CAS: 9005-00-9);
- (r) полиоксиэтилен (20) стеариловый эфир (BRIJ™ S20; номер CAS: 9005-00-9);
- (s) полиоксиэтилен (20) олеиловый эфир (BRIJ™ O20; номер CAS: 9004-98-2);
- (t) полиоксиэтилен (20) цетиловый эфир (BRIJ™ C20, номер CAS: 9004-95-9);
- (u) полиоксиэтилен (40) стеарат (MYRJ™ S40, номер CAS: 9004-99-3).

[00847] Липиды готовили в этаноле в различных соотношениях. Затем с помощью микрофлюидной микросмеси (Precision NanoSystems, Ванкувер, Британская Колумбия) при суммарной скорости потока 2 мл/мин (0,5 мл/мин для этанола, смеси липидов и 1,5 мл/мин для водного буфера, РНК) были сформированы липидные наночастицы с РНК. Полученные частицы промывали фильтрацией в тангенциальном потоке PBS, содержащим Ca и Mg.

Анализ физических характеристик липидных наночастиц:

[00848] Физические характеристики липидных наночастиц оценивали до и после тангенциальной проточной фильтрации. Распределение частиц по размерам и дзета-потенциал определяли способом светорассеяния на приборе Malvern Nano-ZS Zetasizer (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Измерения размеров проводили в HBS при pH 7,4, а измерения дзета-потенциала - в 0,01 М HBS при pH 7,4. Процент захвата РНК измеряли с помощью анализа Ribogreen. Липидные наночастицы, которые показали захват РНК более чем на 80 процентов, были протестированы *in vivo*.

Пример 3: *In vivo* эффективность липидных наночастиц с РНК, кодирующих CVA21, при меланоме

[00849] Были проведены эксперименты по определению способности липидных наночастиц, содержащих молекулы РНК, кодирующие CVA21, продуцировать инфекционный вирус и ингибировать рост опухоли меланомы *in vivo*. Производство, приготовление и анализ липидных наночастиц с РНК CVA21 описаны в Примере 2.

[00850] Способность липидных наночастиц с РНК CVA21 ингибировать рост опухоли оценивали с использованием модели ксенотрансплантата SK-MEL28. Вкратце, клетки SK-MEL28 (1×10^6 клеток/0,1 мл в смеси бессывороточного PBS и Matrigel® в соотношении 1:1) инокулировали подкожно в правый бок 8-недельных самок бестимусных голых мышей (Charles River Laboratories). Когда средний размер опухоли достигал приблизительно 150 мм³ (диапазон 120-180 мм³), мышам внутриопухолево вводили либо PBS, либо РНК, кодирующую CVA21, в составе с липофектаминоном RNAiMAX (1 мкг), либо внутривенно вводили липидные наночастицы с РНК,

кодирующей CVA21 (ID состава № 70032-6C, 5 мкг). Мыши получали внутриопухолевое лечение в дни 1 и 5 или внутривенное лечение в дни 1, 6, 11 и 16. Объем опухоли измеряли 3 раза в неделю с помощью электронных калиперов.

[00851] Как показано на **Фиг. 1**, внутривенное лечение с помощью ЛНЧ, содержащими молекулы РНК штамма CVA21 Kuykendall (ID состава № 70032-6C; MC3:Chol:DSPC:DPG-PEG5K составляет около 49:39,8:11:0,2 мол. %), или внутриопухолевое лечение молекулами РНК штамма CVA21-Kuykendall, составленными с липофектамином, предотвращала рост опухоли у мышей с опухолью по сравнению с мышами, получавшими лечение PBS (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, $p < 0,0001$). В совокупности эти результаты позволяют предположить, что липидные наночастицы, содержащие молекулы РНК CVA21, являются эффективной терапевтической стратегией лечения меланомы.

Пример 4: Стратегии создания дискретных 3'-концов CVA21

[00852] Как описано выше, синтетические геномы, описанные в данном документе, требуют наличия дискретных 3'- и 5'-концов, нативных для вируса, для получения репликационно-компетентного и инфекционного вируса из синтетического генома. Транскрипты РНК, продуцируемые РНК-полимеразой T7 *in vitro*, содержат 5'- и 3'-UTR млекопитающих, поэтому не содержат дискретных нативных концов, необходимых для продукции инфекционного вируса оцРНК.

[00853] Для создания дискретных 3'-концов, необходимых для инфекционного CVA21, была использована стратегия с использованием 3'-последовательностей распознавания ферментом рестрикции. Последовательность распознавания рестрикции типа IIS (например, последовательность распознавания BsmBI, BsaI или SapI) была вставлена на 3'-конец матрицы ДНК. Соответствующий фермент рестрикции (например, BsmBI, BsaI или SapI) расщепляет 5'-конец своего сайта распознавания с образованием политимидинового участка соответствующей длины для создания дискретного сайта полиаденилирования вируса, нативного для вируса. Этот процесс показан на **Фиг. 2А**.

[00854] И BsaI-HF®v2, и BsmBI-v2 (New England Biolabs) были протестированы на эффективность создания дискретных 3'-концов матриц ДНК. Матрицы ДНК, содержащие либо последовательность распознавания BsmBI, либо последовательность распознавания BsaI, были сконструированы и подвергнуты расщеплению соответствующим ферментом в соответствующих условиях, предусмотренных в руководствах по продукту. Как показано на **Фиг. 2В** (верхнее изображение геля), BsmBI достиг полного расщепления соответствующей конструкции

ДНК при концентрации ДНК 1 ферментная единица/мкг, но более низкие концентрации BsmBI приводили к неполному расщеплению. С другой стороны, как показано на **Фиг. 2В** (нижнее изображение геля), BsaI достиг полного расщепления соответствующей конструкции ДНК при более низкой концентрации ДНК на уровне 0,015 ферментных единиц/мкг, что позволяет предположить, что включение последовательности распознавания BsaI после области хвоста поли-А и использование соответствующего фермента рестрикции BsaI могут эффективно генерировать дискретный 3'-конец матрицы ДНК *in vitro* для РНК-вирусного генома.

Пример 5: Стратегии РНКазы Н для создания дискретных 5'-концов CVA21

[00855] Стратегия РНКазы Н была использована для создания дискретных 5'-концов, нативных для CVA21. Лидерная последовательность Т7 должна быть удалена, чтобы создать аутентичный конец для вируса. На **Фиг. 3** представлена схема транскрипции *in vitro* (IVT) и подхода к обработке 5'-лидерной последовательности. Матрица IVT изображена вверху, а полученный транскрипт РНК — посередине. Этот транскрипт CVA21 + оцРНК затем отжигается с комплементарным олигонуклеотидом дцДНК (пунктирный прямоугольник), и эта часть гидролизует РНКазой Н. Конечный продукт вирусной оцРНК с правильным 5'-концом показан внизу.

[00856] Эта стратегия в сочетании со стратегией 3' рестрикции ферментом позволяет получить окончательный синтетический геном CVA21 с дискретными 5'- и 3'-концами, необходимыми для получения инфекционного CVA21.

Пример 6: Стратегии рибозима для создания дискретных 5'-концов CVA21

[00857] Стратегия рибозимов была использована для создания дискретных 5'-концов, нативных для CVA21. Схема этого подхода показана на **Фиг. 4**, где показана конструкция рибозимов, расщепляющих 5'-конец пикорнавируса. Два изображенных рибозима представляют собой рибозимы типа «головки молотка» и типа «пистолет», однако множество других рибозимов могут быть адаптированы для расщепления конкретно в этом контексте.

[00858] Модификации рибозимов типа «головки молотка» и типа «пистолет» для реализации этой стратегии показаны на **Фиг. 5** и **Фиг. 6**, соответственно. Структурная модель минимального рибозима типа «головки молотка» (NHR), который отжигает и расщепляет 5'-конец CVA21, показана на **Фиг. 5А** (этот рибозим расщепляет 5'-конец в месте, указанном стрелкой). Структурная модель рибозима типа «головки молотка» со стабилизированным стеблем I для расщепления 5'-конца CVA21 (STBL) представлена на **Фиг. 5В** (этот рибозим расщепляет 5'-конец в месте, указанном стрелкой). На **Фиг. 6А** представлена схема характеристик рибозима типа «пистолет», обнаруженного в диком

типе (типа «пистолет» ДТ). На **Фиг. 6В** показан рибозим типа «пистолет» из *P. Polymuxa*, смоделированный с помощью mFOLD, с тетрапетлей, добавленной для слияния цепей РЗ. Нуклеиновые кислоты в пунктирном прямоугольнике были мутагенизированы для сохранения фолдинга рибозима в контексте вирусной последовательности. Последовательность «GUC» ДТ, показанная в пунктирном прямоугольнике, была мутирована на «UCA» для создания типа «пистолет» 1, а последовательность «GUC» была мутирована на «TTA» для создания типа «пистолет» 2.

Пример 7: Оптимизация молекул РНК, кодирующих вирус Коксаки

[00859] Были проведены эксперименты по оценке способности продуцировать инфекционный вируса Коксаки А21 (CVA21) из молекул рекомбинантной РНК. Вкратце, полинуклеотиды РНК, содержащие вирусные геномы CVA21, были созданы путем транскрипции T7 *in vitro* на основе ранее описанных последовательностей генома CVA21 (см. Newcombe et al., Cellular receptor interactions of C-cluster human group A coxsackieviruses Journal of General Virology (2003), 84, 3041–3050. Номер доступа Genbank № AF465515). Клетки SK-MEL-28 трансфицировали 1 мкг конструкциями с РНК штамма CVA21 Kuykendall в липофектине RNAiMax в течение 4 часов, после чего лунки промывали и в каждую лунку добавляли полную среду. Через 48 часов супернатанты удаляли из культур SK-MEL-28, а клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым для оценки вирусной инфекционности. Как показано на **Фиг. 7А** (левый график), молекулы РНК, содержащие последовательности Newcombe CVA21 (штамм CVA21 Kuykendall с последовательностью вирусного генома в соответствии с номером доступа GenBank № AF465515), не продуцировали активный литический вирус (на что указывает окрашивание кристаллическим фиолетовым нелизированных клеток SK-MEL-28).

[00860] Удивительно, но изменения в 5'-UTR были необходимы для продукции инфекционного CVA21 из молекулы рекомбинантной РНК. Как показано на **Фиг. 7А** (правый график), включение последовательности 5'-UTR, описанной Brown et al. (Journal of Virology, (2003)77:16, p. 8973–8984. номером доступа GenBank № AF546702), в последовательность генома CVA21, описанную Newcombe (штамм CVA21 Kuykendall с последовательностью вирусного генома в соответствии с номером доступа GenBank № AF546702; далее CVA21-Brown), приводило к продукции инфекционного вируса CVA21 и лизису вирусных клеток, о чем свидетельствует отсутствие окрашивания кристаллическим фиолетовым среди множества независимых клонов. Супернатанты клеток SK-MEL-28, трансфицированных двумя различными клонами CVA21-Brown, собирали через 72 часа, фильтровали шприцем через фильтр 0,45 мкм и серийно разбавляли на свежие клетки SK-MEL-28. Через 48 часов супернатанты удаляли из культур SK-MEL-28, а клетки

окрашивали кристаллическим фиолетовым для оценки вирусной инфекционности. Как показано на **Фиг. 7В**, молекулы РНК, кодирующие CVA21, содержащие последовательность 5'-UTR Brown (последовательность UTR - SEQ ID NO: 2, модифицированная последовательность штамма CVA21 Kuykendall – SEQ ID NO: 1), приводят к продукции и высвобождению инфекционного CVA21 в супернатант трансфицированных клеток, на что указывает способность супернатантов самостоятельно опосредовать лизис клеток.

Пример 8: Эффективность CVA21-РНК *in vivo*

[00861] Были проведены эксперименты для оценки эффективности *in vivo* геномов Kuykendall CVA21, инкапсулированных в ЛНЧ. Вкратце, использовали модель меланомы SK-MEL-28. Самкам голых мышей NU/NU в возрасте 8-12 недель подкожно вводили $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ жизнеспособных опухолевых клеток в правый бок в 100 мкл Matrigel. Лечение начинали, когда опухоли достигали заранее определенного объема $150 \pm 30 \text{ мм}^3$. Синтетические CVA21-ЛНЧ вводили внутривенно в дозе 0,2 мг/кг или 0,05 мг/кг в 1-й и 8-й дни. Наблюдалась полная регрессия опухоли при дозе всего 0,05 мг/кг (**Фиг. 8А**). Обе дозы хорошо переносились, о чем свидетельствовала стабильная масса тела (**Фиг. 8В**) и отсутствие неблагоприятных клинических признаков.

Введение вируса CVA21 и экспрессия ICAM-1:

[00862] Были проведены эксперименты для оценки потребности в экспрессии ICAM-1 и фактора ускорения распада (DAF) на клетках для проникновения вируса CVA21. Вкратце, клетки H1299 были модифицированы для подавления экспрессии ICAM-1 и/или DAF. Модифицированные клетки инфицировали CVA21-КУ в течение 72 часов. Как показано на **Фиг. 8С**, экспрессия ICAM-1 была необходима для CVA21-опосредованного лизиса клеток (о чем свидетельствует отсутствие клеточного монослоя в условиях ICAM-1+).

[00863] Затем 130 клеточных линий человека были проанализированы на экспрессию ICAM-1 по экспрессии мРНК и белка. Затем уровень экспрессии ICAM-1 коррелировал с чувствительностью клеточных линий к инфекции CVA. Клеточная линия классифицировалась как чувствительная к инфекции CVA21-КУ, если TCID₅₀ был $< 0,5$. Клеточная линия классифицировалась как устойчивая к инфекции CVA21-КУ, если TCID₅₀ был $> 0,5$. Как показано на **Фиг. 8D**, чувствительные клеточные линии показали значительно повышенную экспрессию ICAM-1 по сравнению с устойчивыми клеточными линиями, а экспрессия ICAM-1 коррелировала с инфекцией CVA21-КУ (**Фиг. 8E**). Ткани микроочага опухоли человека по 7 различным признакам заболевания, включая NSCLC, RCC, HCC, меланому, HNSCC, TNBC и рак мочевого пузыря, дополнительно оценивали

на экспрессию ICAM-1 человека с помощью иммуногистохимии для выбора потенциальных заболеваний (Таблица 19 ниже). Результаты показали, что большая часть этой ткани опухоли будет перmissive для инфекции CVA21.

Таблица 19: Анализ экспрессии ICAM-1 человека с использованием микрочипов опухоли и ИГХ на 7 указанных заболеваниях

Указания заболеваний	Количество протестированных образцов основной опухоли (Кол-во)	Уровень распространенности	Положительность области опухоли	Н-оценка*
		% положительных основных: ICAM-1+ $\geq 1\%$	Средний % опухолевых клеток основных опухолей ICAM1+ $\geq 1\%$ (медиана)	Средняя Н-оценка основных опухолей ICAM1+ $\geq 1\%$ (медиана)
NSCLC	97	72%	39% (30%)	92 (60)
RCC (светлоклеточный)	67	79%	40% (40%)	83 (50)
НСС	69	72%	40% (25%)	86 (48)
Меланома	26	77%	31% (23%)	67 (60)
TNBC	46	52%	8% (3%)	21 (4)
Рак головы и шеи	60	70%	7% (2%)	14 (4)
Рак мочевого пузыря (уротелиальная карцинома)	37	24%	24% (3%)	50 (9)

* Н-оценка представляет собой измерение интенсивности экспрессии (+1,+2, +3) и % площади опухоли = $[1 \times (\% \text{ клеток } 1+) + 2 \times (\% \text{ клеток } 2+) + 3 \times (\% \text{ клеток } 3+)]$

Пример 9: Выбор штамма CVA21

[00864] Были проведены эксперименты по определению различий в клеточном тропизме и терапевтической эффективности синтетических онколитических РНК, полученных из одного из трех штаммов CVA21: Штамм Kuykendall, штамм EF и штамм KY. На **Фиг. 32** показаны схемы организации доменов РНК-вирусных геномов трех штаммов CVA21 (EF, KY и Kuykendall) и начальные/конечные положения нуклеиновой кислоты селективной области.

[00865] Критерии оценки включали:

- (a)** ширина тропизма и эффективность способности уничтожать раковые клетки *in vitro* и *in vivo*;
- (b)** чувствительность вируса к клеточным противовирусным ответам

(например, чувствительность к интерферону);

(с) стабильность штамма (например, точность репликации, частота рекомбинации);

(d) безопасность и эффективность *in vivo*.

[00866] В целом результаты показывают, что штаммы КУ и ЕФ явно превосходят лабораторный штамм Kuykendall (КууК). Результаты этих экспериментов представлены на **Фиг. 12А-28В** и обобщены следующим образом:

Тропизм и эффективность in vitro:

[00867] Скрининг цитотоксичности и количественный Вестерн-блоттинг проводили для сравнения тропизма и активности трех штаммов CVA21. Как показано на **Фиг. 12А** и **Фиг. 12В**, ЕФ и КУ превосходили штаммы КХ (не показаны) и Kuykendall, и имели больший спектр уничтоженных клеточных линий (*т.е.* более широкий тропизм) при сравнении отдельных штаммов в пределах представляющих интерес клеточных линий. Используя значения AUC <200 в качестве ограничения чувствительности, 82 из 131 протестированной клеточной линии оказались устойчивыми к лабораторному штамму Kuykendall, но только 59 из 131 клеточной линии были устойчивы к штамму КУ и только 65 из 131 клеточной линии были устойчивы к штамму ЕФ (**Фиг. 12А**).

[00868] Как показано на **Фиг. 13**, штаммы КУ и ЕФ демонстрируют более широкий тропизм и/или повышенную эффективность при различных указанных заболеваниях по сравнению с лабораторным штаммом Kuykendall.

[00869] Как показано на **Фиг. 14**, штамм КУ продемонстрировал более благоприятный тропизм к клеточным линиям рака легких, включая клеточные линии NSCLC. Результаты скрининга цитотоксичности *in vitro* отображали в виде отношения значений AUC для штаммов ЕФ и КУ. Клеточные линии со значениями > 1 благоприятны для ЕФ (темно-серые столбцы), а клеточные линии со значениями <1 благоприятны для КУ (светло-серые столбцы). Дополнительные указанные заболевания, при которых КУ демонстрировал благоприятный тропизм, показаны на **Фиг. 15** (клеточные линии молочной железы, **Фиг. 15А**, линии толстой кишки/ЖКТ, **Фиг. 15В**, и клеточные линии поджелудочной железы, **Фиг. 15С**). На **Фиг. 15** темно-серый цвет представляет благоприятный тропизм для ЕФ, а светло-серый представляет благоприятный тропизм для КУ.

[00870] Как показано на **Фиг. 16**, штамм КУ является более онколитическим в моделях NSCLC/аденокарциномы *in vitro*. Микрочип опухоли NSCLC человека (n=97) был протестирован на экспрессию ICAM-1 с помощью иммуногистохимии (см. **Фиг. 16А**). Онколитическая эффективность штаммов ЕФ и КУ также сравнивалась на этих моделях

клеточных линий. Как показано на **Фиг. 16В**, штамм КУ продемонстрировал лизис опухолевых клеток при более низком IC50 во многих клеточных линиях NSCLC/аденокарциномы по сравнению со штаммом ЕФ (см. **Фиг. 16В**, при этом IC50 для штамма КУ ниже в 11/15 клеточных линиях NSCLC/аденокарциномы). На **Фиг. 16С** также показано, что штамм КУ продемонстрировал более низкий IC50 в клеточных линиях крупноклеточной карциномы (левый график).

[00871] Штамм ЕФ продемонстрировал более благоприятный тропизм к клеточным линиям мочевого пузыря (**Фиг. 17А**), почек (**Фиг. 17В**), печени (**Фиг. 17С**), яичников (**Фиг. 17D**) и GBM (**Фиг. 17Е**).

[00872] Штаммы КУ и ЕФ продемонстрировали сходную онколитическую эффективность на моделях рака молочной железы *in vitro* (**Фиг. 18А**). В моделях почечно-клеточной карциномы (RCC) и гепатоцеллюлярной карциномы (HCC) *in vitro* штамм ЕФ имеет более низкое среднее значение IC50, чем штамм КУ, что указывает на то, что штамм ЕФ обладает лучшей онколитической эффективностью при HCC и RCC. См. **Фиг. 17В, Фиг. 17С, Фиг. 18В и Фиг. 18С**.

[00873] Штамм ЕФ более эффективен в моделях сингенных опухолей hICAM-1: Клеточные линии трансдуцировали и отбирали для экспрессии hICAM-1. Клеточные линии анализировали на чувствительность к инфекции штаммами CVA21 КУ и ЕФ с помощью TCID50. Как показано на **Фиг. 19**, штамм ЕФ превосходил штамм КУ во всех протестированных линиях мышей, причем единственной линией BALB/с, перmissive для КУ, была M109.

[00874] Кроме того, штаммы ЕФ и КУ реплицируются сравнительно в диссоциированных опухолевых клетках человека. Замороженные диссоциированные опухолевые клетки NSCLC (DTC) инфицировали КУ и ЕФ при 0,1 MOI. РНК выделяли из инфицированных клеток и использовали для кПЦР минус-цепи CVA21 для сравнения репликации вируса через 24 и 72 часа. Результаты от 3 доноров показаны на **Фиг. 20А и Фиг. 20В**.

Эффективность in vivo:

[00875] Противоопухолевую эффективность этих штаммов CVA21 (ЕФ, КУ и Kuykendall (Ku)) оценивали *in vivo* с использованием мышинных моделей ксенотрансплантата. Для этих экспериментов РНК-вирусные геномы каждого штамма инкапсулировали в ЛНЧ, содержащие молярное соотношение SS-OC:DSPC:Chol:BRIT[™] S100, равное 49:22:28,5:0,5 мол.%. Для контрольных групп использовали буфер PBS, а также ЛНЧ, инкапсулирующие SVV-нег вирусный геном. Процент ингибирования роста опухоли (TGI) рассчитывали путем сравнения % изменения объема опухоли в группах

лечения по сравнению с контролем. % TGI определяется как $(1 - (\text{средний объем обработанных опухолей})/(\text{средний объем контрольных опухолей})) \times 100\%$.

[00876] Эффективность штаммов EF и КУ в модели ксенотрансплантата NSCLC NCI-H1299 проиллюстрирована на **Фиг. 21**. Оба штамма привели к значительному уменьшению размера опухоли по сравнению со штаммом Kuykendall и липидной наночастицей с SVV-нег синтетической РНК. Штамм EF, по-видимому, работал лучше, чем штамм КУ, в модели ксенотрансплантата NCI-H1299. Штамм EF привел к полному ответу у 3 из 8 животных по сравнению с полным ответом у 1 из 8 животных для штамма КУ. Эффективность штаммов EF и КУ в модели ксенотрансплантата NSCLC NCI-H2122 проиллюстрирована на **Фиг. 22**. Штамм КУ привел к значительному уменьшению размера опухоли по сравнению со штаммом Kuykendall, штаммом EF и липидной наночастицей с SVV-нег синтетической РНК.

[00877] Эффективность штаммов EF и КУ в модели ксенотрансплантата рака простаты PC3 проиллюстрирована на **Фиг. 23**. Штамм EF привел к значительному уменьшению размера опухоли по сравнению со штаммом Kuykendall, штаммом КУ и липидной наночастицей с синтетической РНК SVV.

Переносимость штамма:

[00878] Переносимость этих штаммов CVA21 (EF, КУ и Kuykendall (Ku)) также оценивали *in vivo* с использованием модели трансгенных мышей hICAM-1. Исследование переносимости проводили путем введения мышам ЛНЧ, содержащих РНК-вирусные геномы, как показано на **Фиг. 24**, в однократной внутривенной дозе 1 мг/кг. Аутопсию исследовали через 48 часов и 7 дней после введения дозы. Никаких признаков клинической токсичности при жизни не наблюдалось у исследуемых агентов, кроме временной потери массы тела (**Фиг. 24**, верхний график). Химические изменения при жизни были минимальными (**Фиг. 24**, нижние графики).

[00879] Никаких макроскопических или микроскопических изменений, связанных с лечением с помощью CVA21, не было отмечено в головном, спинном мозге, печени, почках, легких, сердце и мышцах для штаммов Ку, КУ и EF CVA21 (данные не показаны). Умеренные и спорадические микроскопические изменения, такие как повышенный митоз клеток Купфера, наблюдались главным образом в печени, что связано с ЛНЧ, поскольку такие же результаты наблюдались и при ЛНЧ отрицательного контроля с вРНК (SVV-нег/ЛНЧ) (данные не показаны). Все другие незначительные спорадические изменения считались вторичными по отношению к до или посмертным процедурам или не связанными с введением ЛНЧ-РНК-вирусный геном (данные не показаны). В целом эти результаты показывают, что синтетические EF, КУ и Kuykendall CVA21 одинаково

хорошо переносятся чувствительными трансгенными мышами hICAM-1.

Клиренс вирусов:

[00880] Репликацию вируса изучали с помощью ОТ-кПЦР минус- и плюс-цепей вирусного генома, а также анализа вирусных бляшек через 48 часов и 7 дней (**Фиг. 25А-Фиг. 26**). Через 48 часов после инфицирования штамм Kuykendall реплицировался до самого высокого титра минус-цепи РНК в селезенке, печени, сердце и почках, а вирус CVA21 был обнаружен во всех штаммах (**Фиг. 25А**). Напротив, все эти вирусы в основном элиминируются в тканях к 7-му дню после инфицирования, как показано на **Фиг. 25В**, где отсутствие обнаружения минус-цепи указывает на отсутствие репликации вируса. Результаты анализа вирусных бляшек подтверждают этот вывод: только штамм EF оставался определяемым по титру бляшек на через 7 дней в сердце у 2 из 4 животных (**Фиг. 26**). С другой стороны, наличие (+)-цепи вирусной РНК, обнаруженной в плазме через 7 дней (**Фиг. 25С**), предполагает циркуляцию ЛНЧ в крови через 7 дней.

Устойчивость к интерферону (IFN):

[00881] Клеточные линии NSCLC NCI-H1299 (**Фиг. 27А**) и NCI-H2122 (**Фиг. 27В**) и HFF (фибробласты крайней плоти человека, **Фиг. 27С**) предварительно обрабатывали IFN β или IFN γ перед инфицированием штаммами CVA21 EF, KY или Kuykendall, и выживаемость клеток строили на графике в зависимости от концентрации предварительной обработки IFN. Результаты обобщены на **Фиг. 27А-27С** и показывают, что штаммы EF и KY демонстрируют одинаковую устойчивость к интерферону (IFN).

Точность и скорость рекомбинации:

[00882] Точность штаммов проверяли путем предварительной обработки клеток NCI-H1299 рибавирином в течение 4 часов перед инфицированием 0,1 MOI штаммами CVA21, включая KYI, EF, Kuykendall и Kuykendall G64S (вариант Kuyk с высокой точностью). Клетки собирали через 24 часа после обработки и титровали. Результаты показаны на **Фиг. 28А**, и штамм KY продемонстрировал такую же устойчивость к 200 мкМ рибавирина, что и высокоточный штамм Kuykendall G64S. Для проверки скорости рекомбинации штамм CVA21 KuуK был создан с использованием 3D pol штамма EF или штамма KY в виде полного вируса (ДТ), без капсидных белков (Δ cap) и с неактивной полимеразой (Δ GDD). Две неактивные формы (Δ cap и Δ GDD) химерного вируса KuуK, содержащие 3D pol штамма KY или EF, трансфицировали вместе в непермиссивный KuуK 293TME. Рекомбинантный жизнеспособный вирус, выделяли через 72 часа, затем титровали. Результаты обобщены на **Фиг. 28В**. 3D pol штамма KY показала гораздо более низкую скорость рекомбинации, чем соответствующая 3D pol штамма EF, поскольку в состоянии KY-3D в анализе рекомбинации было обнаружено в

около 80 раз меньше выделенного вируса. В целом штамм KY демонстрирует более высокую исходную точность и меньшую рекомбинацию, чем штамм EF.

Пример 10: Выбор лидерной последовательности для CVA21

[00883] Были проведены эксперименты для определения лидерной последовательности, которая способствует точному и полному расщеплению последовательности рибозима в области 5' соединительной последовательности расщепления матрицы транскрипции *in vitro* для CVA21. Программу ViennaFold использовали для создания библиотеки лидерных последовательностей, которые, как было предположено, не образуют вторичной структуры, которая могла бы конкурировать с фолдингом рибозима. Была создана библиотека ДНК, содержащая лидерные последовательности, встроенные в конструкцию матрицы, как показано на **Фиг. 29А**. Затем библиотеку ДНК подвергали транскрипции *in vitro*, РНК-продукт каждой конструкции очищали и загружали в агарозный гель с 2,5% TBE для изучения результата расщепления рибозимом. На **Фиг. 29В** показан результат трех новых лидерных последовательностей, включая CVA21-L4 (SEQ ID NO: 13), CVA21-L5 (SEQ ID NO: 14) и CVA21-L6 (SEQ ID NO: 15) вместе с отрицательным контролем (ArwL). Как лидерные последовательности CVA21-L5, так и CVA21-L6 демонстрируют точное и полное расщепление последовательности рибозима, поскольку на соответствующих бэндах были видны только полосы продуктов расщепления (лидерная + фрагмент рибозима и стартовый фрагмент вируса).

Пример 11: Оптимизация 5' последовательности рибозима для CVA21

[00884] Были проведены эксперименты для оптимизации последовательности рибозима в области 5' соединительной последовательности расщепления матрицы транскрипции *in vitro* для CVA21. Была проверена библиотека последовательностей вариантов рибозимов, основанная на рибозиме типа «пистолет» из *P.polymyxa*; эти вариантные последовательности различались по положениям нуклеиновой кислоты, соответствующим положениям нуклеиновой кислоты 27-30 SEQ ID NO: 17. Матрицы транскрипции *in vitro* (IVT) были созданы со случайной последовательностью, комплементарной последовательности инициации вирусной последовательности в стебле Р2. Была проведена IVT, и расщепленные сегменты были выделены, а также проведено секвенирование малых РНК для определения состава последовательностей элементов, которые были расщеплены с высокой частотой.

[00885] Результаты первоначального скрининга показали, что по сравнению с SEQ ID NO: 17, которая содержит нуклеотиды «ТТТА» в положениях 27-30 SEQ ID NO: 17 два варианта последовательностей рибозима представлены с более высокой частотой.

Одной из них является SEQ ID NO: 18, которая содержит «TTTT» в соответствующих положениях; другой является SEQ ID NO: 19, которая содержит «TTGT» в соответствующих положениях.

[00886] Эффективность соединительного расщепления этих последовательностей тестировали с использованием схемы конструкции матрицы и экспериментальной модели для транскрипции *in vitro*, аналогичной тем, что приведены в Примере 10 выше. На **Фиг. 30** показан результат четырех схем: (1) PPwL, содержащая последовательность рибозима в соответствии с SEQ ID NO: 17 и альтернативную лидерную последовательность; (2) PPwL6, содержащая лидерную последовательность L6 и последовательность рибозима в соответствии с SEQ ID NO: 17; (3) PP-TwL6, содержащая лидерную последовательность L6 и последовательность рибозима в соответствии с SEQ ID NO: 18; и (4) PP-GwL6, содержащая лидерную последовательность L6 и последовательность рибозима в соответствии с SEQ ID NO: 19. Результаты показали, что схема PP-TwL6 имеет эффективность расщепления, близкую к 100%, что аналогично или лучше, чем схема PPwL6, и намного выше, чем схема PP-GwL6, и, следовательно, SEQ ID NO: 18 превосходит SEQ ID NO: 19 в этой экспериментальной модели. Эти результаты были обобщены, когда те же схемы были протестированы в контексте матриц рекомбинантной ДНК, кодирующих полные вирусные геномы штамма CVA21-KY.

[00887] Общая схема неограничивающего примера схемы конструкции экспрессии CVA21 и соответствующего процесса транскрипции *in vitro* для создания синтетических РНК-вирусных геномов с точными концами на 5' и 3' представлена на **Фиг. 33**.

Пример 12: Оптимизация последовательности хвоста поли-А

[00888] Были проведены эксперименты по оптимизации длины хвоста поли-А, прикрепленного к вирусному геному CVA21 или вирусному геному SVV.

[00889] Четыре различных длины хвостов поли-А (30 пА, 50 пА, 70 пА и 90 пА) оценивали путем клонирования в соответствующую область молекулы рекомбинантной ДНК, кодирующей вирусный геном CVA21 или SVV. Анализы очистки проводили для оценки эффективности очистки и скорости восстановления полученных РНК-вирусных геномов на монолитной олиго-dT-хроматографии при следующих условиях: скорость потока: 1 мл/мин; концентрация загрузки: 0,1 мг/мл; условие связывания: 500 mM NaCl.

[00890] Как показано в Таблице 15A ниже, более длинный хвост поли-А (>30 пА) приводил к более высокой связывающей способности и более высокой скорости восстановления молекул РНК-вирусного генома CVA21 после элюирования, но

увеличение длины хвоста поли-А сверх 70 пА обеспечивало минимальное дальнейшее повышение эффективности очистки. Репрезентативный хроматографический профиль показан на **Фиг. 54А**.

Таблица 15А. Олиго-dT-хроматография CVA21-РНК с различной длиной хвоста поли-А

Длина хвоста поли-А	% восстановления после элюирования	Связывающая способность (мг/мл)
30 пА	44,5	3
50 пА	47,3	3,77
70 пА	49,5	4,24
90 пА	50,3	4,24

[00891] Аналогичные эксперименты были проведены для оценки эффективности очистки и скорости восстановления молекул РНК-вирусного генома SVV с различной длиной хвоста поли-А при следующих условиях: скорость потока: 1 мл/мин; концентрация загрузки: 0,1 мг/мл; условие связывания: 500 мМ NaCl. В качестве дополнительного контроля также был включен контроль отрицательной цепи молекулы SVV-РНК с хвостом длиной 30 пА.

[00892] Как показано в Таблице 15В ниже, более длинный хвост поли-А приводил к более высокой связывающей способности и более высокой скорости восстановления молекул РНК-вирусного генома SVV после элюирования но увеличение длины хвоста поли-А сверх 70 пА обеспечивало минимальное дальнейшее повышение эффективности очистки. Репрезентативный хроматографический профиль показан на **Фиг. 54В**.

Таблица 15В. Олиго-dT-хроматография SVV-РНК с различной длиной хвоста поли-А

Длина хвоста поли-А	% восстановления после элюирования	Связывающая способность (мг/мл)
30 пА	33,1	Н/Д
50 пА	52	3,41
70 пА	56,3	3,9
90 пА	57,7	4,12
30 пА (отрицательная цепь)	32,4	Н/Д

[00893] синтетические РНК-вирусные геномы с хвостами поли-А длиной 70 пА показали повышенную связывающую способность и восстановление на

хроматографической колонке с олиго-dT.

[00894] Затем сравнивали противоопухолевую эффективность синтетических вирусных геномов штамма CVA21-EF, полученных с хвостом поли-А 70 пА и хвостом поли-А 30 пА, и последовательностью рибозима SEQ ID NO: 18 с SEQ ID NO: 17. Использовали модель рака легких у мышей, основанную на клетках NCI-H1299. Как показано на **Фиг. 31А** и **Фиг. 31В**, вирусный геном штамма CVA21-EF, полученный с хвостом поли-А 70 пА и 5' последовательностью рибозима в соответствии с SEQ ID NO: 18, продемонстрировал аналогичную или даже лучшую противоопухолевую эффективность по сравнению с другими схемами вирусного генома.

Пример 13: Конструирование химерных SVV и исследование их онколитической активности

[00895] Вирус SVV, содержащий рекомбинантные РНК-вирусные геномы SVV, получали, следуя процедурам, аналогичным описанным в Примере 1 выше для CVA21. Дискретные 5'-концы РНК-вирусных геномов SVV были созданы с использованием 5' последовательности рибозима типа «головки молотка» или 5' последовательности рибозима типа «пистолет», следуя процедурам, аналогичным описанным в Примере 6 выше. Дискретные 3'-концы РНК-вирусных геномов SVV были созданы с использованием 3' последовательности рибозима вируса гепатита дельта (посредством котранскрипционного расщепления) или 3' последовательности распознавания ферментом рестрикции (например, SapI, посредством расщепления матрицы перед транскрипцией *in vitro*) с использованием процедур, аналогичных описанным в Примере 4 выше.

Создание химерных вирусов SVV:

[00896] Вирус SVV-001 (родительский, SEQ ID NO: 25) был использован для создания химерных вирусов путем замены областей IRES, P1 или P3 на соответствующие области различных штаммов SVV, как описано на **Фиг. 34**, включая:

- (a) Вирус SVV № 1. SVA/BRA/MG2/2015 (GenBank: KR063108.1)
- (b) Вирус SVV № 2. SVA/Canada/MB/NCFAD-104/2015 (GenBank: KY486156.1)
- (c) Вирус SVV № 3. SVV-MN15-308 (GenBank: KU359214.1)

[00897] Новые конструкции SVV-GFP-пДНК (SEQ ID NO: 41-50) индивидуально трансфицировали в клетки H1299 для оценки онколитической активности на основе экспрессии GFP. Вирионы собирали из супернатантов и использовали для дальнейшей характеристики. Химерные вирусы были названы по принципу «область замены – № вируса замененной последовательности». Например, «IRES-2» обозначает родительский вирус SVV-001, в котором область IRES заменена соответствующей

областью IRES вируса SVV № 2 (SVA/Canada/MB/NCFAD-104/2015), «P1-1» обозначает родительский вирус SVV-001, в котором область P1 заменена соответствующей областью P1 вируса SVV № 1 (SVA/BRA/MG2/2015).

Онколитическая активность химерных вирусов SVV-IRES:

[00898] Очищенные вирионы использовали для инфицирования клеток NCI-H69AR. Интенсивность GFP измеряли через 12 часов после инфицирования при MOI 0,1. Как показано на **Фиг. 35**, химерный вирус SVV-IRES-1 (SEQ ID NO: 28) является онколитическим, но не экспрессирует GFP. Химерный вирус SVV-IRES-2 (SEQ ID NO: 29, содержащий последовательность IRES из SVA/Canada/MB/NCFAD-104, которая заменяет область IRES родительского генома SVV-001), демонстрирует более сильный онколиз и более сильную экспрессию GFP. Химерный вирус SVV-IRES-3 (SEQ ID NO: 30) продемонстрировал меньшую экспрессию GFP, чем родительский SVV-001 (SEQ ID NO: 27). Таким образом, результаты показывают, что SVV-IRES-2 представляет собой улучшенный онколитический вирус с более устойчивой онколитической активностью, чем родительский вирус SVV-001.

[00899] Химерный вирус SVV-IRES-2 был дополнительно протестирован на чувствительность к интерферону альфа (IFN α). Репликацию вируса и устойчивость к IFN α тестировали как на чувствительных (NCI-H69AR), так и на частично устойчивых (NCI-H69) клеточных линиях SCLC. Клетки предварительно обрабатывали IFN α в концентрации 100 ед/мл в течение 2 часов перед инфицированием SVV при MOI 0,1. Вирусы SVV добавляли к клеткам и рассчитывали интенсивность GFP. Как показано на **Фиг. 36**, химерный вирус SVV-IRES-2 продемонстрировал увеличение репликации вируса и устойчивость к IFN α в обеих клеточных линиях. Следовательно, этот химерный вирус более устойчив и устойчив к IFN α , чем родительский вирус SVV-001.

Онколитическая активность химерных вирусов SVV-P1.

[00900] Очищенные вирионы использовали для инфицирования клеток NCI-H69AR. Интенсивность GFP измеряли через 12 часов после инфицирования при MOI 0,1. Исследованными химерными вирусами были SVV-P1-1 (SEQ ID NO: 31), SVV-P1-2 (SEQ ID NO: 32) и SVV-P1-3 (SEQ ID NO: 33). Как показано на **Фиг. 37**, ни один из новых химерных вирусов SVV-P1 не проявлял повышенной онколитической активности по сравнению с родительским вирусом SVV-001.

Онколитическая активность химерных вирусов SVV-P3.

[00901] На **Фиг. 38A** очищенные вирионы использовали для инфицирования клеток NCI-H69AR. Интенсивность GFP измеряли через 48 часов после инфицирования при MOI 0,1. Химерный вирус P3-1 (SEQ ID NO: 34) показал более низкую экспрессию

GFP, а химерный вирус P3-3 (SEQ ID NO: 36) показал сходную экспрессию GFP с родительским вирусом SVV-001. На **Фиг. 38В** очищенные вирионы использовали для инфицирования клеток NCI-H69AR. Интенсивность GFP измеряли через 12 часов после инфицирования при MOI 0,1. Химерный вирус SVV-P3-2 (SEQ ID NO: 35) показал пониженную онколитическую активность по сравнению с родительским SVV-001. Таким образом, ни один из этих химерных вирусов SVV-P3 не проявляет повышенной онколитической активности по сравнению с родительским вирусом SVV-001.

Пример 14: Выбор лидерной последовательности для SVV

[00902] Эксперименты проводили для определения лидерной последовательности, которая способствует точному и полному расщеплению последовательности рибозима типа «пистолет» 1 (SEQ ID NO: 64) в 5' соединительной последовательности расщепления матрицы транскрипции *in vitro* для SVV. Программу Viennafold использовали для создания библиотеки лидерных последовательностей, которые, как было предположено, не образуют вторичной структуры, которая могла бы конкурировать с фолдингом рибозима. Был создан ряд конструкций, включающих лидерные последовательности, встроенные в конструкцию матрицы, как показано на **Фиг. 39А**. Затем конструкцию подвергали транскрипции *in vitro*, РНК-продукт каждой конструкции очищали и загружали в агарозный гель с 2,5% TBE для изучения результата расщепления рибозима. На **Фиг. 39В** показаны результаты тестирования 11 лидерных последовательностей, включая SVV-L0 (SEQ ID NO: 53), SVV-L1 (SEQ ID NO: 54), SVV-L2 (SEQ ID NO: 55), SVV-L3 (SEQ ID NO: 56), SVV-L4 (SEQ ID NO: 57), SVV-L5 (SEQ ID NO: 58), SVV-L6 (SEQ ID NO: 59), SVV-L7 (SEQ ID NO: 60), SVV-L8 (SEQ ID NO: 61), SVV-L9 (SEQ ID NO: 62) и SVV-L10 (SEQ ID NO: 63). За исключением SVV-L8, все остальные протестированные лидерные последовательности способствуют точному и полному расщеплению 5' последовательности рибозима, поскольку на соответствующих бэндах видны только полосы продуктов расщепления (лидерная + фрагмент рибозима и стартовый фрагмент вируса).

[00903] Матрицы ДНК SVV, содержащие лидерную последовательность SVV-L0, SVV-L1, SVV-L2, SVV-L5, SVV-L9 или SVV-L10, использовали для транскрипции *in vitro* и тестировали полученные молекулы РНК-вирусных SVV из каждой матрицы ДНК. на их способность генерировать инфекционные вирусные частицы в анализе «запуска» вируса *in vitro*. Клетки H1299 трансфицировали 1 мкг каждой транскрибируемой вирусной РНК и анализировали титры бляшек через 12 и 48 часов после трансфекции. Как показано на **Фиг. 39С** и в Таблице 17, титры вируса были сходными для транскриптов РНК SVV, полученных из каждой из матриц ДНК,

содержащих разные лидерные последовательности.

[00904] Каждую из вышеуказанных матриц ДНК тестировали на эффективность транскрипции *in vitro*.

[00905] Для каждой из этих матриц ДНК была проведена реакция транскрипции *in vitro* в объеме 3 мл при 37 °С в течение 2,5 часов с последующей 30-минутной обработкой ДНКазой I. Продукты транскрипции *in vitro* анализировали с помощью ОФ-ВЭЖХ, как показано на **Фиг. 39D**. Результаты показали, что лидерные последовательности SVV-L1, SVV-L2 и SVV-L5 обеспечивают такой же выход транскрипции *in vitro*, что и исходная лидерная последовательность SVV-L0, тогда как лидерные последовательности SVV-L9 и SVV-L10 обеспечивают только около половины выхода.

[00906] Ранее было создано более 1000 потенциальных лидерных последовательностей, а эффективность транскрипции соответствующих матриц ДНК была предположена и ранжирована в соответствии с Conrad, T. et al. *Commun Biol* 3, 439 (2020) (как показано в Таблице 16 ниже). Примечательно, что лидерная последовательность SVV-L5 имела низкий ранг в предположении, но показала неожиданно высокую эффективность в реальных экспериментах по транскрипции *in vitro*.

Таблица 16 – Предположительная эффективность транскрипции матрицы ДНК SVV с лидерной последовательностью

Лидерная последовательность	Ранг промотора T7 в соответствии с предположением Conrad, T. et al.
SVV-L1	7
SVV-L2	20
SVV-L10	99
SVV-L9	658
SVV-L0	659
SVV-L5	817

[00907] После 5' расщепления рибозима лидерная последовательность-фрагмент рибозима может неспецифически взаимодействовать с транскрибируемыми РНК-вирусными геномами SVV, снижая эффективность очистки вирусных РНК-геномов на колонке олиго-dT. Оптимизированная лидерная последовательность в идеале должна минимизировать такое неспецифическое взаимодействие во время очистки. Для каждой из этих матриц ДНК, содержащих специфическую лидерную последовательность, продукт транскрипции подвергали очистке олиго-dT-хроматографией при температуре денатурации 80 °С, а РНК-продукты, элюированные с помощью олиго-dT-хроматографии,

анализировали на наличие фрагмента рибозима и чистоту РНК-вирусного генома. Как показано в Таблице 17 ниже, расщепленный 5' фрагмент рибозима, содержащий лидерные последовательности SVV-L5, SVV-L9 или SVV-L10, удаляли с помощью олиго-dT-хроматографии гораздо эффективнее, чем расщепленный 5' фрагмент рибозима, содержащий лидерные последовательности SVV-L0, SVV-L1 или SVV-L2.

Таблица 17 – Чистота РНК-вирусных геномов SVV после денатурирующей олиго-dT-хроматографии

Лидерная последовательность в матрице ДНК	Фрагмент рибозима [%]	Чистота РНК-вирусного генома [%]
SVV-L0	2,31	86,9
SVV-L1	2,42	84,6
SVV-L2	0,49	87
SVV-L5	0,15	85,1
SVV-L9	0,12	83,5
SVV-L10	0,07	84,5

[00908] Соответственно, по сравнению с другими протестированными лидерными последовательностями, лидерная последовательность SVV-L5 демонстрирует превосходный выход транскрипции *in vitro* при включении в матрицу ДНК. Кроме того, лидерная последовательность SVV-L5 также сводит к минимуму неспецифическое взаимодействие между соответствующим 5' продуктом расщепления рибозима и РНК-вирусным геномом, что приводит к эффективному удалению 5' продукта расщепления рибозима во время хроматографической очистки.

Пример 15: ЛНЧ, содержащие Brij и вирусную РНК SVV, демонстрируют высокую противоопухолевую эффективность на животных моделях

[00909] Противоопухолевую эффективность липидных наночастиц (ЛНЧ), содержащих молекулу Brij (в виде ПЭГ-липиды) и РНК-вирусный геном SVV, тестировали с использованием различных моделей животных. Такие SVV/ЛНЧ были получены по методикам, аналогичным описанным в Примере 2 выше.

[00910] Составы ЛНЧ, использованные в этом примере, представлены в Таблице 10.

Таблица 10 – Составы ЛНЧ с SVV-РНК

Состав ID	Катионный липид	Холестерин	DSPC	ПЭГ-липид
96062-1	SS-OC – 49%	28,5%	22%	BRIJ™ S100 – 0,5%
96062-2	SS-OP – 49%	28,5%	22%	BRIJ™ S100 – 0,5%
96062-3	SS-OP – 49%	27,5%	22%	BRIJ™ S100 – 1,5%
80097-2	SS-OC – 49%	28,5%	22%	PEG2k-DPG – 0,5%

[00911] Противоопухолевую эффективность SVV/ЛНЧ тестировали на модели ксенотрансплантата SCLC NCI-H466. Безтимусным голым самкам мышей инъецировали клетки NCI-H446 (5×10^6 клеток/0,1 мл в смеси 1:1 бессывороточного PBS и Matrigel®) и имплантировали подкожно в правый бок. Когда средний размер опухоли составлял примерно 150 мм³ (диапазон 120-180 мм³), мышей объединяли в группы по 7 мышей на группу лечения. Мышам вводили ЛНЧ, содержащие РНК SVV, дважды в день 1 и день 8. На **Фиг. 40А** показано титрование дозы SVV/ЛНЧ, содержащей SS-OC в качестве катионного липида и 0,5 мол.% BRIJ™ S100 в качестве ПЭГ-липид (состав № 96062-1). Исследованные дозы варьировались от 0,025 мг/кг до 0,2 мг/кг. Все исследованные дозы продемонстрировали значительное ингибирование роста опухоли по сравнению с отрицательным контролем PBS. (Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, критерий Тьюки, $p < 0,0001$; на фиг. «mpd» означает «мг/кг»). Дозу 0,1 мг/кг использовали для характеристики кинетики репликации вируса после однократного в/в введения SVV-РНК мышам с опухолями NCI-H446. Опухоли собирали в несколько временных точек и анализировали с помощью ОТ-кПЦР и FISH. Вирусная минус-цепь была обнаружена с помощью ОТ-кПЦР уже через 1 день после лечения и достигла плато в большинстве опухолей через 7 дней после лечения. Устойчивая репликация SVV была обнаружена через 21 день после введения однократной низкой дозы SVV-РНК (**Фиг. 40В**). Эти результаты были в значительной степени повторены с помощью FISH-обнаружения минус- и плюс-цепей SVV, причем FISH-сигнал увеличивался до максимума к 10-му дню, что указывает на распространение вируса по ложу опухоли в этот момент времени (**Фиг. 40С**)

[00912] На **Фиг. 41** показан противоопухолевый эффектор SVV/ЛНЧ, содержащий различные катионные липиды и различные количества молекулы BRIJ™ S100. Три различные комбинации количеств катионного липида и BRIJ™ S100 в составах ЛНЧ были исследованы, как описано в Таблице 10.

[00913] Все исследованные дозы продемонстрировали значительное ингибирование роста опухоли по сравнению с отрицательным контролем PBS

(двухфакторный дисперсионный анализ, критерий Тьюки, $p < 0,0001$; на фиг. «mpd» означает «мг/кг»). В совокупности результаты показывают, что либо SS-OC, либо SS-OP можно использовать в качестве катионного липида при создании ЛНЧ, которые эффективно доставляют инкапсулированные синтетические РНК-вирусные геномы в клетки-мишени и обеспечивают ингибирование роста опухоли в диапазоне доз.

[00914] На **Фиг. 42** показана пролонгированная противоопухолевая эффективность состава SVV/ЛНЧ, содержащего Brij, в модели SCLC с NCI-H466. Используемые в данном документе ЛНЧ содержат SS-OC в качестве катионного липида и 0,5 мол.% BRIJ™ S100 в качестве ПЭГ-липиды (состав 96062-1). Безтимусным голым самкам мышей имплантировали подкожно клетки NCI-H446 (5×10^6 клеток/0,1 мл в смеси 1:1 бессывороточного PBS и Matrigel®) в правый бок. Когда средний размер опухоли составлял примерно 150 мм³ (диапазон 120-180 мм³), мышей объединяли в группы по 7 мышей на группу лечения. Мышам дважды в день 1 и день 8 вводили SVV/ЛНЧ в дозе 0,2 мг/кг. По сравнению с отрицательным контролем (PBS), композиция SVV/ЛНЧ продемонстрировала значительный ингибирующий эффект на опухоль в течение более 50 дней (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, критерий Тьюки $p < 0,0001$).

[00915] На **Фиг. 43** показано, что присутствие нейтрализующих антител к SVV не ингибирует эффективность SVV/ЛНЧ в модели опухоли SCLC (NCI-H446). Безтимусным голым самкам мышей имплантировали клетки NCI-H446 (5×10^6 клеток/0,1 мл в смеси 1:1 бессывороточного PBS и Matrigel®) подкожно в правый бок. Когда средний размер опухоли составлял примерно 150 мм³ (диапазон 120-180 мм³), мышей объединяли в группы по 10 мышей на группу лечения. Мышам внутрибрюшинно вводили (пассивно иммунизировали) кроличью сыворотку, содержащую нейтрализующее антитело к SVV (μ SVV-ab), или контрольную кроличью сыворотку (только сыворотка) в день 0 и день 7, и обрабатывали SVV/ЛНЧ или вирионами SVV в день 1 и день 8. Используемые в данном документе ЛНЧ содержат SS-OC в качестве катионного липида и 0,5 мол.% BRIJ™ S100 в качестве ПЭГ-липиды (состав 96062-1). Контролировали объемы опухолей у мышей с опухолями H446 после внутривенного введения PBS, вирионов SVV или SVV/ЛНЧ. На ингибирующий опухоль эффект композиции SVV/ЛНЧ не влияло присутствие нейтрализующих антител к SVV, тогда как ингибирующий эффект вирионов SVV на опухоль полностью сводился на нет присутствием нейтрализующих антител к SVV. ****TGI достоверен по сравнению с PBS (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, критерий Тьюки, $p < 0,0001$).

[00916] На **Фиг. 44** показана противоопухолевая эффективность SVV/ЛНЧ в модели SCLC с использованием клеток NCI-H82. Используемые в данном документе ЛНЧ

содержат SS-OC в качестве катионного липида и 0,5 мол.% PEG2k-DPG в качестве ПЭГ-липид (80097-2). Безтимусным голым самкам мышей инъецировали клетки NCI-H82 (5×10^6 клеток/0,1 мл в смеси 1:1 бессывороточного PBS и Matrigel®) и имплантировали подкожно в правый бок. Когда средний размер опухоли составлял примерно 160 мм^3 (диапазон $130\text{-}180 \text{ мм}^3$), мышей объединяли в группы по 7 мышей на группу лечения. Мышам дважды в день 1 и день 6 вводили SVV/ЛНЧ в дозе 0,2 мг/кг. По сравнению с отрицательным контролем (SVV-Нег/ЛНЧ или PBS) композиция SVV/ЛНЧ продемонстрировала значительное ингибирование роста опухоли (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, критерий Тьюки $p < 0,0001$).

[00917] На **Фиг. 45** показан эффект системного введения SVV/ЛНЧ на продление выживаемости на модели ортотопической опухоли SCLC (NCI-H82). Безтимусным голым мышам инокулировали в легкие одноклеточную суспензию более чем 90% жизнеспособных опухолевых клеток H82 (5×10^6 клеток, инъецированных в правое легкое) в 0,05 мл в смеси бессывороточного DPBS и Matrigel (1:1 об./об.), для развития опухоли. Мышам вводили PBS или 1 мг/кг SVV-вРНК/ЛНЧ, содержащих SS-OC в качестве катионного липида и 0,5 мол.% BRIJ™ S100 в качестве ПЭГ-липид (состав 96076-2 (такой же липидный состав, как 96062-1) внутривенно (в/в) в день 15 и 22 после имплантации опухоли. По сравнению с отрицательным контролем (SVV-Нег/ЛНЧ или PBS) композиция SVV/ЛНЧ значительно увеличивала выживаемость мышей в этой модели ортотопической опухоли SCLC. SVV-РНК, введенная на 15-й и 22-й день после имплантации опухоли, дала значительную терапевтическую пользу по сравнению с контрольной группой, где мыши выживали в среднем 100 дней, что почти удвоило выживаемость в этой модели. Когорту мышей лечили, как описано, и легкие мышей, обработанных SVV-РНК, собирали через 10 дней после второй обработки для ИГХ. ИГХ hDLL3 использовали в качестве маркера опухолевой нагрузки, и количественная ИГХ продемонстрировала значительное снижение опухолевой нагрузки по сравнению с контрольными группами SVV-Нег или PBS (**Фиг. 46А** и **Фиг. 46В**). У мышей, получавших SVV-РНК, наблюдался обширный некроз главной опухоли (**Фиг. 46В**).

[00918] На **Фиг. 47А** показана противоопухолевая эффективность SVV/ЛНЧ в модели SCLC PDX. Используемые в данном документе ЛНЧ содержат SS-OC в качестве катионного липида и 0,5 мол.% BRIJ™ S100 в качестве ПЭГ-липид (состав 96062-1). Самкам мышей NOD-SCID вводили клетки SCLC PDX (фрагменты 12×2 в 100 мкл бессывороточной среды), имплантированные подкожно в правый бок. Когда средний размер опухоли составлял примерно 150 мм^3 (диапазон $120\text{-}180 \text{ мм}^3$), мышей объединяли в группы по 8 мышей на группу лечения. Мышам дважды в день 1 и день 8 вводили дозу

SVV/ЛНЧ или отрицательного контроля SVV-Нег/ЛНЧ или PBS в дозе 1 мг/кг. SVV/ЛНЧ продемонстрировала значительное ингибирование роста опухоли по сравнению с отрицательным контролем (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, критерий Тьюки, $p < 0,0001$). Репликацию SVV также измеряли с помощью ОТ-кПЦР и показали, что SVV-РНК, введенная в/в, достигла тех же уровней репликации вируса, что и вирионы SVV IT (**Фиг. 47В**).

Противоопухолевый эффект РНК-вирусного генома SVV с различной длиной хвоста поли-А:

[00919] Противоопухолевую эффективность SVV/ЛНЧ, содержащей РНК-вирусный геном SVV с разной длиной хвоста поли-А, также тестировали с использованием модели SCLC. Были протестированы две разные длины хвоста поли-А: один имеет длину 30 нуклеотидов (пА30), а другой - 70 нуклеотидов (пА70). Соответствующие синтетические РНК-вирусные геномы с хвостом поли-А показаны в SEQ ID NO: 37 и 38, которые получены из химерного вируса SVV-IRES-2 и содержат мутацию S177A белка VP2. Обе молекулы РНК были транскрибированы *in vitro* на основе конструкций матрицы ДНК, содержащих SEQ ID NO: 51 и 52, соответственно. Каждая из этих конструкций матрицы ДНК содержит последовательность промотора Т7, за которой следует лидерная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 53, за которой следует последовательность рибозима типа «пистолет» в соответствии с SEQ ID NO: 64, за которой следует химерный вирусный геном SVV-IRES-2 с хвостом поли-А указанной длины, за которым следует сайт распознавания ферментом рестрикции SapI, без каких-либо дополнительных нуклеотидов, вставленных между соседними компонентами.

[00920] Обе РНК SVV были составлены с ЛНЧ, содержащую SS-OC в качестве катионного липида и 0,5 мол.% BRIJ™ S100 в качестве ПЭГ-липиды. Безтимусным голым самкам мышей инъецировали клетки NCI-H446 (5×10^6 клеток/0,1 мл в смеси 1:1 бессывороточного PBS и Matrigel®) и имплантировали подкожно в правый бок. Когда средний размер опухоли составлял примерно 150 мм³ (диапазон 120-180 мм³), мышам объединяли в группы по 8 мышей на группу лечения. Мышам дважды в день 1 и день 8 вводили дозу 0,1 мг/кг с использованием SVV-РНК-пА30/ЛНЧ или SVV-РНК-пА70/ЛНЧ. Как показано на **Фиг. 48**, как SVV-РНК-пА30, так и SVV-РНК-пА70 продемонстрировали одинаковую эффективность в ингибировании роста опухоли, что значительно лучше, чем контроль PBS (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, критерий Тьюки $p < 0,0001$).

Пример 16: Комбинированная терапия SVV-ЛНЧ и антитела к PD-1

[00921] SVV/ЛНЧ, содержащая SS-OC в качестве катионного липида и 0,5 мол.% BRIJ™ S100 в качестве ПЭГ-липид, тестировали на сингенной модели нейробластомы N1E-115. Самкам мышей A/J вводили клетки N1E-115 (5×10^5 клеток/0,1 мл в смеси 1:1 бессывороточного PBS и Matrigel®) и имплантировали подкожно в правый бок. Когда средний размер опухоли стал около 100 мм³, мышей объединили в группы по 10 мышей на группу лечения. Мышам дважды в день 1 и день 8 вводили дозу SVV/ЛНЧ или отрицательного контроля SVV-Нег/ЛНЧ в дозе 1 мг/кг. В этой модели опухоли введение синтетического SVV привело к значительному увеличению рекрутирования Т-клеток CD8 и тенденции к появлению Т-клеток CD4 и NK-клеток в опухолях (**Фиг. 49А**). Количество регуляторных Т-клеток (Treg) в опухолях не увеличивалось, что приводило к общему повышению соотношения CD8/Treg, что было связано с улучшением клинической эффективности антитела к PD-1 (**Фиг. 49В**). Т-клетки CD8 показали активированный фенотип с повышенной регуляцией CTLA4 и PD-1 (**Фиг. 49С**). Как короткоживущие эффекторные клетки (SLEC), так и предшественники эффекторных клеток памяти (MPEC) были увеличены в группе, получавшей синтетический SVV, по сравнению с контрольной группой (**Фиг. 49D**). Также были профилированы макрофаги, ассоциированные с опухолью, и наблюдалось повышенное соотношение M1 (фагоцитарный)/M2 (провоспалительный) (**Фиг. 49Е**). Количество макрофагов M1 (**Фиг. 49F**) и опухолевых клеток, экспрессирующих лиганд PD-1, PD-L1, также было значительно увеличено (**Фиг. 49G**). Эти данные показывают, что синтетический SVV способствует изменению ТМЕ, способствующему противоопухолевому иммунитету. Мыши с опухолями N1E-155, обработанные SVV/ЛНЧ или SVV-Нег-ЛНЧ, продемонстрировали значительное ингибирование роста этой сингенной модели (**Фиг. 50**). Примечательно, что из-за увеличения экспрессии как PD-1, так и PD-L1 оценивали эффективность комбинации синтетического SVV с антителом к PD-1 в модели N1E-115. Оба агента, вводимые в виде монотерапии, приводили к умеренной значимой противоопухолевой активности, которая значительно усиливалась при комбинированной терапии с антителом к PD-1 по сравнению с каждой группой, применявшей один агент (**Фиг. 51**).

Пример 17: Испытание состава SVV/ЛНЧ с использованием различных молекул Brij

[00922] Липидные наночастицы, содержащие вирусный геном РНК SVV, были приготовлены и охарактеризованы в соответствии с Таблицей 11 и Таблицей 12. Все ЛНЧ были составлены с использованием SS-OC:холестерин:DSPC:ПЭГ-липид, где ПЭГ-липид представлял собой PEG2k-DPG, BRIJ™ S100, BRIJ™ C20 или BRIJ™ S20,

соответственно.

Таблица 11 – Параметры состава для ЛНЧ с SVV-ПНК

Партия №	Буфер	ПЭГ-липид	SS-OC:Chol:DSPC:ПЭГ-липид
96047-1	20 мМ яблочной кислоты, pH 3,0	DPG-PEG2K	49:28,5:22:0,5
96047-2	25 мМ ацетат pH 5,0	BRIJ™ S100	49:28,5:22:0,5
96047-3	25 мМ ацетат pH 5,0	BRIJ™ S100	49:27,5:22:1,5
96047-4	25 мМ ацетат pH 5,0	BRIJ™ S100	49:38,5:11:1,5
96047-5	25 мМ ацетат pH 5,0	BRIJ™ C20	49:28,5:22:0,5
96047-6	25 мМ ацетат pH 5,0	BRIJ™ S20	49:28,5:22:0,5

Таблица 12 – Характеристики ЛНЧ с SVV-ПНК

Партия №	Z-среднее (д.нм)	ИПД	ДЗП (мВ)	ЭИ, %
96047-1	88,7	0,10	-3,7	100%
96047-2	107,8	0,12	-0,6	96%
96047-3	91,8	0,14	-2,0	93%
96047-4	81,4	0,14	-0,9	98%
96047-5	108,7	0,14	-8,8	98%
96047-6	100,6	0,11	-6,6	99%

Z-среднее = средний диаметр; ИПД = индекс полидисперсности; % ЭИ = эффективность инкапсуляции; ДЗП = дзета-потенциал

[00923] Композиции SVV/ЛНЧ использовали при скрининге эффективности повторной дозы в/в у мышей на животной модели опухоли Н446. Объем опухоли (**Фиг. 52А**) и массу тела (**Фиг. 52В**) измеряли в каждой временной точке. Результаты показали, что все составы продемонстрировали высокую противоопухолевую эффективность и хорошо переносились. ЛНЧ, содержащие молекулы Brij в качестве ПЭГ-липида, были сходны по эффективности и переносимости по сравнению с ЛНЧ, содержащими PEG2k-DPG в качестве ПЭГ-липида.

Пример 18: ЛНЧ, содержащие Brij, продемонстрировали измененные фармакокинетические характеристики *in vivo* при повторном введении

[00924] Липидные наночастицы, содержащие вирусный геном SVV, были приготовлены и охарактеризованы в соответствии с Таблицей 13. ПЭГ-липидом в ЛНЧ был PEG2k-DPG, PEG2k-DMG или BRIJ™ S100, соответственно. Другие липидные компоненты включают SS-OC, холестерин, DSPC и, необязательно, b-ситостерин (960166). Дополнительные параметры характеристик представлены в Таблице 14.

Таблица 13 – Параметры состава для ЛНЧ с SVV-РНК

№ партии	ПЭГ-липид	SS-OC : Холестерин: b-ситостерин: DSPC : ПЭГ-липид (мол. %)	Конц. липида (мМ)	Концентрация исходной РНК (мг/мл)	N:P	Соотношение потоков
960161	DPG-PEG2K	49 : 28,5 : 0 : 22 : 0,5	40	0,298	14	3
960164	DMG-PEG2K	49 : 35,8 : 0 : 15 : 0,2	40	0,298	14	3
960166	DMG-PEG2K	49 : 29,5 : 10 : 11 : 0,5	40	0,298	14	3
JD-200311-1	BRIJ TM S100	49 : 28,5 : 0 : 22 : 0,5	40	0,298	14	3

Таблица 14 – Характеристики ЛНЧ с SVV-РНК

Партия №	Размер (нм)	ИПД	[РНК] (мкг/мл)	% ЭИ	ДЗП (мВ)
960161	94	0,12	380	92	-3,1
960164	114	0,11	382	92	-2,3
960166	129	0,09	360	89	-3,3
JD-200311-1	132	0,11	235	88	-

ИПД - индекс полидисперсности; % ЭИ= эффективность инкапсуляции; ДЗП = дзета-потенциал

[00925] Композиции SVV/ЛНЧ использовали в исследовании повторной дозы (еженедельный график дозирования в течение 2 недель, Q7x2) внутривенного (в/в) ФК-исследования на самках мышей BALB/c. Для каждого состава доза составляла 0,5 мг/кг, а объем дозы составлял 5 мл/кг. Число копий РНК в сыворотке после введения дозы измеряли в нескольких временных точках (1 час, 4 часа и 24 часа) после первой дозы (день 1) и после второй дозы (день 8). Результаты показаны на **Фиг. 53А** и **Фиг. 53В**. Сплошные линии показывают фармакокинетический профиль первой дозы. Пунктирные линии показывают фармакокинетический профиль второй дозы.

[00926] Оба состава № 960161 и № JD-200311-1 имеют липидный состав SS-OC:холестерин:DSPC:ПЭГ-липид (49:28,5:22:0,5 мол. %), а ПЭГ-липид представляет собой DPG-PEG2k и BRIJTM S100, соответственно.

[00927] Результаты показали, что ЛНЧ, содержащая PEG2k-DPG в качестве ПЭГ-липид, демонстрировала пролонгированную циркуляцию в кровотоке после первой дозы с быстрым клиренсом в течение 4 часов после второй дозы. Напротив, ЛНЧ, содержащая BRIJTM S100 в качестве ПЭГ-липид, демонстрировала промежуточное изменение воздействия после первой дозы, но сохраняла аналогичные характеристики циркуляции в кровотоке и наклоны выведения после второй дозы.

Пример 19: Модификация подкисляющего РНК буфера улучшает биофизические свойства ЛНЧ

[00928] Этот пример иллюстрирует инкапсуляцию нереплицирующейся РНК вируса долины Сенека (SVV) (SVV-Neg) в составах ЛНЧ с варьированием подкисляющего РНК буфера, чтобы определить влияние изменения концентрации цитрата и pH на биофизические свойства ЛНЧ. ЛНЧ в этом примере содержат липидную композицию ионизируемого липида (CAT):DSPC:холестерин:PEG2k-DMG в соотношении 50:7:40:3 мол.%. Липидную смесь в этаноле смешивали с SVV-Neg в подкисляющем РНК буфере (*например*, 50 mM цитрат, pH 4) при соотношении липид-азот-фосфат (N:P), равном 9, с использованием микрофлюидного устройства (Precision NanoSystems Inc.). Общая концентрация липидов была установлена на уровне 20 mM.

[00929] ЛНЧ диализовали против 50 mM фосфата, pH 6,0, в течение 12-16 часов, а вторичный диализ проводили против 50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 263 mM сахарозы, pH 7,3, в течение 4-24 часов при комнатной температуре. Постдиализированные ЛНЧ концентрировали с использованием фильтров AMICON® ULTRA CENTRIFUGAL 100 кДа (MilliporeSigma) и стерильно фильтровали с использованием шприцевых фильтров 0,2 мкм. Затем образцы характеризовали и разбавляли по мере необходимости. После разбавления добавляли глицерин в концентрации 5 мас/об%, если образцы затем хранили при -20°C.

[00930] ЛНЧ характеризовали размером частиц методом динамического светорассеяния (DLS) и индексом полидисперсности (ИПД). Составы CAT4 и CAT5 тестировали с подкисляющим РНК буфером: (1) 50 mM цитрат, pH 4; (2) 5 mM цитрат, pH 3,5; (3) 15 mM цитрат, pH 3,5; (4) 30 mM цитрат, pH 3,5; и (5) 50 mM цитрат, pH 3,5. **На Фиг. 55A, 55B и 55C** показан размер частиц, ИПД и эффективность инкапсуляции ЛНЧ. Кроме того, составы ЛНЧ от CAT1 до CAT3, от CAT6 до CAT10 и CAT35 готовили с использованием 5 mM цитратного буфера с pH 3,5 (**Фиг. 56A, Фиг. 56B и Фиг. 56C**).

[00931] Результаты показали, что изменение буфера, подкисляющего РНК (*например*, снижение концентрации соли), приводит к уменьшению размера частиц и ИПД.

Пример 20: Исследования *in vivo* ЛНЧ, содержащих различные ионизируемые липиды

[00932] Фармакодинамику и противоопухолевую эффективность *in vivo* РНК вируса долины Сенека (SVV), инкапсулированной в ЛНЧ, оценивали на мышинной модели мелкоклеточного рака легких (SCLC).

[00933] В этом примере молекулы РНК, кодирующие вирусные геномы SVV,

и люциферазу NanoLuc (NLuc) были инкапсулированы в ЛНЧ, приготовленные в соответствии с **таблицей 22** ниже. NLuc представляет собой фермент люциферазу, который производит люминесцентный сигнал при наличии субстрата фуримазина. ЛНЧ диализовали в течение ночи в 100 мМ трис, 300 мМ сахарозы, 113 мМ NaCl, pH 7,4, при 5 °С. Альтернативно, ЛНЧ диализовали против 50 мМ фосфата, pH 6,0, в течение 12-16 часов и проводили вторичный диализ против 50 мМ HEPES, 50 мМ NaCl, 263 мМ сахарозы, pH 7,3, в течение 4-24 часов при комнатной температуре. Постдиализированные составы ЛНЧ концентрировали, фильтровали, характеризовали и, при необходимости, разбавляли.

Таблица 22. Составы ЛНЧ для исследований *in vivo*

Состав	Ионизируемый липид	ПЭГ-липид	Ионизируемый липид : Холестерин : DSPC : ПЭГ-липид (мол. %)	Подкисляющий буфер	Размер (нм)	ИПД	% ЭИ
CAT1/DMG	CAT1	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	75	0,13	97
CAT2/DMG	CAT2	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	73	0,18	98
CAT3/DMG	CAT3	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	74	0,17	98
CAT4/DMG	CAT4	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	80	0,16	97
CAT5/DMG	CAT5	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	73	0,18	96
CAT6/DMG	CAT6	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	86	0,2	98
CAT7/DMG	CAT7	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	72	0,14	97
CAT8/DMG	CAT8	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	120	0,07	90
CAT9/DMG	CAT9	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	87	0,19	98
CAT10/DMG	CAT10	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	71	0,21	97
CAT11/DMG	CAT11	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	81	0,17	96
CAT12/DMG	CAT12	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	86	0,33	89
CAT13/DMG	CAT13	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	79	0,12	97
CAT14/DMG	CAT14	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	81	0,32	91
CAT15/DMG	CAT15	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	110	0,24	98
CAT16/DMG	CAT16	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	75	0,2	95
CAT17/DMG	CAT17	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	73	0,52	97
CAT19/DMG	CAT19	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	67	0,21	98%
CAT20/DMG	CAT20	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	66	0,21	98%
CAT24/DMG	CAT24	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	64	0,37	97%
CAT31/DMG	CAT31	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	67	0,17	98%
CAT7/Brij	CAT7	Brij S100	54,5 : 25 : 20 : 0,5	5мМ цитрат, pH 3,5	124	0,14	82%
CAT18/DMG	CAT18	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	92	0,19	95
CAT21/DMG	CAT21	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	68	0,31	96
CAT22/DMG	CAT22	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	65	0,32	96
CAT23/DMG	CAT23	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	95	0,16	96
CAT25/DMG	CAT25	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	68	0,4	96
CAT26/DMG	CAT26	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	68	0,32	97
CAT27/DMG	CAT27	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	62	0,38	95
CAT28/DMG	CAT28	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	68	0,21	98

CAT29/DMG	CAT29	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5mM цитрат, pH 3,5	60	0,35	97
CAT30/DMG	CAT30	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5mM цитрат, pH 3,5	64	0,34	97
CAT32/DMG	CAT32	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5mM цитрат, pH 3,5	62	0,23	98
CAT34/DMG	CAT34	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5mM цитрат, pH 3,5	69	0,22	99
CAT7/DMG	CAT7	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5mM цитрат, pH 3,5	72	0,47	99

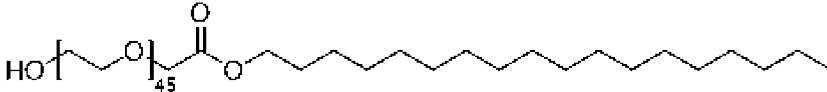
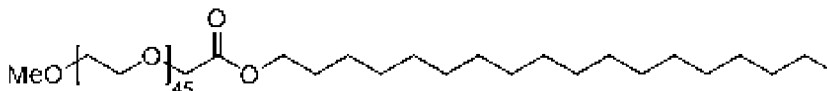
[00934] Клетки SCLC человека NCI-H446 (5×10^6 клеток/0,1 мл в смеси 1:1 бессывороточного PBS и Matrigel®) подкожно инокулировали в правый бок 8-недельных самок бестимусных голых мышей (Charles River Laboratories). Когда средний размер опухоли достигал приблизительно 150 мм³ (диапазон 120-180 мм³), мышам внутривенно вводили 0,2 мг/кг PBS или ЛНЧ, содержащие SVV-РНК, в первый день или в 1-й и 8-й дни. Биолуминесценцию (BLI) оценивали через 96 часов после введения дозы с использованием оптического изображения Imagine IVIS Lumina (PerkinElmer), а сигнал определяли количественно с использованием программного обеспечения Molecular Imaging (**Фиг. 58А-58F**). Объем опухоли и массу тела оценивали 3 раза в неделю (**Фиг. 59А-59Е**).

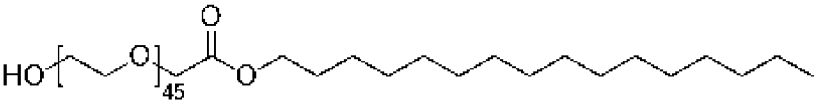
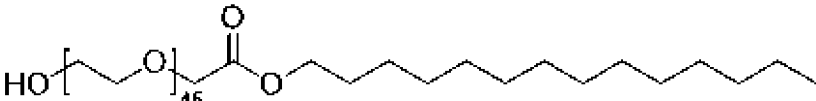
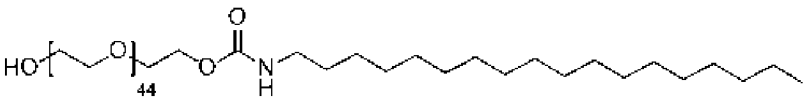
[00935] Регрессия опухоли после двух доз по 0,2 мг/кг наблюдалась для составов от CAT1 до CAT5 (**Фиг. 59А**, слева), и все составы хорошо переносились (**Фиг. 59А**, справа). Регрессия опухоли при единичной дозе 0,2 мг/кг наблюдалась для составов CAT6-CAT9, CAT11, CAT16-CAT17, CAT19-CAT24, CAT26, CAT29, CAT32 и CAT34 (**Фиг. 59В-59Е**, слева), и все составы хорошо переносились (**Фиг. 59В-59Е**, справа). Ингибирование роста опухоли наблюдалось при использовании составов CAT12-CAT13, CAT15, CAT18 и CAT28 (**Фиг. 59В-59Е**, слева), и все составы хорошо переносились (**Фиг. 59В-59Е**, справа).

Пример 21: Исследования *in vivo* ЛНЧ, содержащих CAT7 и различные ПЭГ-липиды

[00936] Альтернативные ПЭГ-липиды, использованные в этом и следующих примерах, перечислены в Таблице 28 ниже:

Таблица 28: ПЭГ-липиды

Название	Химическое название	Формула
СНМ-001	октадецил 2-(поли(этиленгликоль)2000)-ацетат	
СНМ-004	октадецил 2-(метил-поли(этиленгликоль)2000)	

	0)-ацетат	
CHM-005	гексадецил 2- (поли(этиленгликоль)2000)-ацетат	
CHM-006	тетрадецил- 2- (поли(этиленгликоль)2000)-ацетат	
CHM-012	поли(этиленгликоль)2000 N-октадецилкарбамат	

[00937] Фармакодинамику и противоопухолевую эффективность SVV-РНК, инкапсулированной в ЛНЧ с различным липидным составом, оценивали *in vivo* на мышинной модели мелкоклеточного рака легких (SCLC). Молекулу РНК, кодирующую вирусные геномы SVV и NLuc, инкапсулировали в ЛНЧ, приготовленные в соответствии с **таблицей 23** ниже, следуя процедуре, аналогичной описанной в **примере 19**. Общая концентрация липидов была установлена на уровне 20 мМ, а соотношение липид-азот-фосфат (N:P) составляло 9.

Таблица 23. Составы ЛНЧ для исследований *in vivo*

Состав	Ионизируемый липид	ПЭГ-липид	Ионизируемый липид : Холестерин : DSPC : ПЭГ-липид (мол. %)	Подкисляющий буфер	Размер (нм)	ИПД	% ЭИ
CAT7/DMG_1	CAT7	PEG _{2k} -DMG	50 : 40 : 7 : 3	5мМ цитрат, pH 3,5	60,4	0,34	98
CAT7/CHM1_1	CAT7	CHM-001	54,6 : 25,1 : 20,1 : 0,25	5мМ цитрат, pH 3,5	123,3	0,09	97
CAT7/DMG_2	CAT7	PEG _{2k} -DMG	44,5 : 50 : 5 : 0,5	5мМ цитрат, pH 3,5	116,5	0,12	97
CAT7/DMG_3	CAT7	PEG _{2k} -DMG	40 : 50 : 8,75 : 1,25	5мМ цитрат, pH 3,5	66,3	0,14	98
CAT7/DMG_4	CAT7	PEG _{2k} -DMG	60 : 25 : 14,5 : 0,5	5мМ цитрат, pH 3,5	93,5	0,12	97
CAT7/DMG_5	CAT7	PEG _{2k} -DMG	60 : 34,3 : 5 : 0,7	5мМ цитрат, pH 3,5	117,9	0,16	97
CAT7/CHM6_1	CAT7	CHM-006	50 : 42,5 : 7 : 0,5	5мМ цитрат, pH 3,5	102,3	0,13	98
CAT7/CHM6_2	CAT7	CHM-006	58 : 33,5 : 7 : 1,5	5мМ цитрат, pH 3,5	103,3	0,2	96
CAT7/CHM6_3	CAT7	CHM-006	58 : 34,5 : 7 : 0,5	5мМ цитрат, pH 3,5	117,6	0,17	98

[00938] Фармакодинамику (оцененную с помощью биолюминесцентного анализа) и способность ингибировать рост опухоли инкапсулированных SVV-NanoLuc

ЛНЧ, оценивали, как описано в **примере 20**.

[00939] Нанолюциферазу обнаруживали через 72 часа после инъекции, что указывает на продолжающийся SVV (**Фиг. 60А**). Полная регрессия опухоли при единичном приеме дозы 0,2 мг/кг наблюдалась для всех тестируемых составов, и все составы хорошо переносились (**Фиг. 60В**).

Пример 22: Фармакокинетическая оценка составов ЛНЧ

[00940] Фармакокинетику (ФК) составов ЛНЧ, инкапсулирующих РНК вируса Коксаки А21 (CVA21), оценивали на крысах.

[00941] В этом примере молекулы РНК, кодирующие вирусные геномы CVA-21, были инкапсулированы в ЛНЧ, приготовленные в соответствии с **таблицей 24** ниже, следуя процедуре, аналогичной описанной в **примере 19**.

Таблица 24. Составы ЛНЧ для исследований фармакокинетики

Состав	Ионизиру- емый липид	ПЭГ- липид	Ионизиру- емый липид : DSPC : Холестерин : ПЭГ-липид (мол.%)	Подкисляю- щий буфер	Размер (нм)	ИПД	%ЭИ	Полезная нагрузка	Схема дозиро- вания (на основе концент- рации РНК)
OC/CHM1	Coatsome SS-OC	CHM-001	49 : 22 : 28,5 : 0,5	25mM ацетат, pH 5	83	0,25	97	SVV-HEГ- PHK	1 мг/кг Q2W2
OC/CHM4	Coatsome SS-OC	CHM-004	49 : 22 : 28,5 : 0,5	25mM ацетат, pH 5	77	0,18	98	SVV-HEГ- PHK	1 мг/кг Q2W2
OC/CHM5	Coatsome SS-OC	CHM-005	49 : 22 : 28,5 : 0,5	25mM ацетат, pH 5	74	0,2	99	SVV-HEГ- PHK	1 мг/кг Q2W2
OC/CHM6	Coatsome SS-OC	CHM-006	49 : 22 : 28,5 : 0,5	25mM ацетат, pH 5	84	0,2	98	SVV-HEГ- PHK	1 мг/кг Q2W2
OC/CHM12	Coatsome SS-OC	CHM-012	49 : 22 : 28,5 : 0,5	25mM ацетат, pH 5	73	0,15	99	SVV-HEГ- PHK	1 мг/кг Q2W2
OC/Brij	Coatsome SS-OC	BRIJ™ S100	49 : 22 : 28,5 : 0,5	25mM ацетат, pH 5	69	0,18	98	SVV-HEГ- PHK	1 мг/кг Q1W2; 1 мг/кг Q2W2
OC/DMG	Coatsome SS-OC	PEG _{2k} - DMG	49 : 22 : 28,5 : 0,5	25mM ацетат, pH 5	70	0,24	98	SVV-HEГ- PHK	1 мг/кг Q2W2
OC/DPG	Coatsome SS-OC	PEG _{2k} - DPG	49 : 22 : 28,5 : 0,5	25mM ацетат, pH 5	69	0,21	98	SVV-HEГ- PHK	1 мг/кг Q2W2
OC/Brij	Coatsome SS-OC	BRIJ™ S100	49 : 22 : 28,5 : 0,5	25mM ацетат, pH 5	142	0,25	94	CVA21-PHK	0,3 мг/кг Q2W2
CAT7/DMG 6	CAT7	PEG _{2k} - DMG	40 : 20 : 39,5 : 0,5	5mM цитрат, pH 3,5	90,6	0,10	98	CVA21-PHK	0,3 мг/кг Q2W2
CAT7/DMG 3	CAT7	PEG _{2k} - DMG	40 : 8,75 : 50 : 1,25	5mM цитрат, pH 3,5	82,0	0,14	98	CVA21-PHK	0,3 мг/кг Q2W2
CAT7/DMG 5	CAT7	PEG _{2k} - DMG	60 : 5 : 34,3 : 0,7	5mM цитрат, pH 3,5	156,7	0,12	97	CVA21-PHK	0,3 мг/кг Q2W2
CAT7/CHM1 1	CAT7	CHM-001	54,6 : 20,1 : 25,1 : 0,25	5mM цитрат, pH 3,5	106,9	0,11	97	CVA21-PHK	0,3 мг/кг Q2W2
CAT7/CHM6 4	CAT7	CHM-006	50,1 : 7 : 42,6 : 0,25	5mM цитрат, pH 3,5	131,1	0,10	98	CVA21-PHK	0,3 мг/кг Q2W2
CAT7/Brij	CAT7	BRIJ™ S100	54,5 : 20 : 25 : 0,5	5mM цитрат, pH 3,5	116	0,2	88	CVA21-PHK	0,3 мг/кг Q2W2
OC/DMG	Coatsome SS-OC	PEG _{2k} - DMG	49 : 22 : 28,5 : 0,5	25mM ацетат, pH 5	110	0,28	94	CVA21-PHK	0,3 мг/кг Q2W2

CAT7/CHM6 4	CAT7	CHM-006	50 : 7 : 40 : 3	5mM цитрат, pH 3,5	102,6	0,37	98	CVA21-PHK	0,3 мг/кг Q2W2
CAT11/DMG	CAT11	PEG _{2k} -DMG	50 : 7 : 40 : 3	5mM цитрат, pH 3,5	79,8	0,31	98	CVA21-PHK	0,3 мг/кг Q2W2
CAT11/Brij	CAT11	BRIJ TM S100	54,5 : 20 : 25 : 0,5	5mM цитрат, pH 3,5	122,9	0,18	85	CVA21-PHK	0,3 мг/кг Q2W2

[00942] Наивным самкам крыс Sprague Dawley, JVC (возраст: 12 недель) внутривенно вводили 1 или 0,3 мг/кг вирусных геномов, содержащихся в ЛНЧ, в дни 1 и 15 (Q2W2) или в день 1 и день 8 (Q1W2). Образцы плазмы собирали в заранее определенное время. Концентрацию ионизируемого липида, содержащегося в ЛНЧ (SS-OC, CAT7 или CAT11), измеряли в плазме способом ЖХ-МС (Фиг. 61А-61D, 62А-62F и 63А-63Е), а фармакокинетические параметры рассчитаны и сведены в **Таблице 25-1** и **Таблице 25-2**. Уровни IgM и IgG анализировали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) (Фиг. 64А-64В и Фиг. 65А-65В).

Таблица 25-1. Фармакокинетические параметры

Состав	Доза #	Доза #	T _{1/2} (ч)	T _{max} (ч)	AUC _{INF}	AUC _{last}	C ₀ (мкг/мл)	Клиренс (мл/ч/кг)	C _{макс} (мкг/мл)	V _{ss} (мл/кг)
					(ч*мкг/мл)					
OC/CHM1	1	День 1	4,92	0,02	1980,57	1915,72	368,81	6,06	364,94	43,17
	2	День 15	1,95	0,02	296,06	294,78	182,03	40,53	173,21	160,23
OC/CHM4	1	День 1	3,51	0,5	2313,35	2284,79	344,1	5,19	401,04	27,54
	2	День 15	1,87	0,02	456,71	454,71	206,18	26,27	200,34	106,16
OC/CHM5	1	День 1	4,54	0,02	2565,94	2499,28	404,68	4,68	403,35	30,67
	2	День 15	4,25	0,02	830,22	705,19	212,04	14,45	208,59	94,25
OC/CHM6	1	День 1	5,04	0,02	3252,74	3130,05	477,19	3,69	472,62	26,03
	2	День 15	2,74	0,02	1240,69	1239,1	220,02	9,67	216,1	51,98
OC/CHM12	1	День 1	4,3	0,02	2753,28	2692,79	431,4	4,36	431,02	26,56
	2	День 15	5,92	0,02	1459,81	1122,65	282,05	8,22	274,99	43,17
OC/Brij	1	День 1	6,25	0,02	2016,16	1890,9	306,42	5,95	299,62	51,87
	2	День 8	1,92	0,02	725,02	717,72	210,78	16,55	209,51	49,68
OC/Brij	1	День 1	5,89	0,02	2109,85	1998,58	278,63	5,69	276,04	48,38
	2	День 15	0,95	0,02	383,47	378,75	305,55	31,29	298,73	45,63
OC/DMG	1	День 1	7,1	0,02	2918,23	2641,81	346,95	4,11	345,08	42,14
	2	День 15	2,83	0,02	1020,25	783,99	321,7	11,76	318,13	47,55
OC/DPG	1	День 1	5,91	0,02	1929,25	1815,2	358,99	6,22	353,9	52,8
	2	День 15	1,96	0,02	140,25	135,55	155,02	85,56	149,29	202,16

Таблица 25-2. Фармакокинетические параметры

Состав	Доза ионизи- руемого липида (мг/кг)	Доза #	T _{1/2} (ч)	AUC ₀₋₂	AUC _{INF}	Клиренс (мл/ч/кг)	V _{ss} (мл/кг)	C _{макс} мкг/мл
				Ч*мкг/мл				
OC/Brij	3,6	Доза 1	2,8	69,01	183,79	19,59	81,85	65,06
	3,6	Доза 2	0,6	42,84	48,22	74,65	65,31	73,5
CAT7/DMG_6	6,5	Доза 1	2,6	116,08	308,26	20,96	93,47	72,58
	6,5	Доза 2	2,2	107,39	263,81	24,5	117,35	74,66
CAT7/DMG_3	6,5	Доза 1	0,6	54,21	95,67	67,55	275,46	75,79
	6,5	Доза 2	1,8	79,42	181,21	35,66	185,34	73,04

CAT7/DMG_5	6,5	Доза 1	0,8	24,98	127,23	50,79	416,32	69,77
	6,5	Доза 2	4,2	48,38	166,82	38,74	304,37	65,38
CAT7/CHM1_1	6,5	Доза 1	5	135,22	730,39	8,85	68,69	79,67
	6,5	Доза 2	2,3	77,67	204,63	31,58	176,45	68,46
CAT7/CHM6_4	6,5	Доза 1	0,9	29,79	162,35	39,8	338,16	68,68
	6,5	Доза 2	5,5	51,38	246,32	26,23	249,88	61,97
CAT7/Brij	6,5	Доза 1	4,55	192,83	834,37	7,74	53,92	128,22
	6,5	Доза 2	2,9	103,72	284,41	22,72	111,78	98,63
OC/DMG	3,6	Доза 1	3,52	107,34	329,48	10,93	57,26	79,49
	3,6	Доза 2	0,32	22,39	22,68	158,73	76,28	43,77
CAT7/CHM6_4	6,5	Доза 1	3,91	61,15	101,08	63,93	306,33	93,43
	6,5	Доза 2	2,17	67,3	109,03	59,27	242,92	81,12
CAT11/DMG	6,6	Доза 1	1,92	0,07	0,11	60435,32	138804,45	0,21
	6,6	Доза 2	1,47	0,12	0,13	50064,5	47336,6	0,3
CAT11/Brij	6,6	Доза 1	6,76	0,31	1,57	4203,47	38959,22	0,19
	6,6	Доза 2	2,58	0,13	0,32	20537,25	82150,98	0,2

[00943] Составы ЛНЧ с различными соотношениями и/или типами ПЭГ-липидов демонстрируют различные $T_{1/2}$, экспозицию и клиренс после нескольких доз. Эти данные показывают, что композиции ЛНЧ могут быть адаптированы для удовлетворения потребностей различных терапевтических полезных нагрузок от длительного до кратковременного воздействия.

[00944] Уровень IgM на ПЭГ после введения препаратов ЛНЧ был низким и снижался с 7 по 21 день (**Фиг. 64А** и **Фиг. 64В**). IgG на ПЭГ также был низким и незначительно повышался при многократном приеме, что указывает на низкий потенциал иммуногенности (**Фиг. 65А** и **Фиг. 65В**). Среди тестируемых составов ЛНЧ, содержащие CAT7 в качестве ионизируемого липида и CHM-006 в качестве ПЭГ-липид, характеризовались самыми низкими уровнями IgM и IgG.

Пример 23: Приготовление ЛНЧ, инкапсулирующих мРНК

[00945] Приготовлены ЛНЧ SS-OC:Холестерин:DSPC:ПЭГ-липид, инкапсулирующие мРНК при N: P соотношении от около 8:1 до 20:1. ПЭГ-липид представляет собой PEG2k-DPG, PEG2k-DMG или BRIJTM S100. Общая концентрация липидов составляет от около 10 до около 60 мМ. Составы смешивают, диализуют и концентрируют. Размер измеряется способом динамического рассеяния света, а эффективность инкапсуляции измеряется с помощью RiboGreen. Результаты показывают, что BRIJTM S100 можно использовать вместо PEG2k-DPG или PEG2k-DMG при создании ЛНЧ с мРНК.

[00946] Составы ЛНЧ с мРНК в этом примере тестируются на фармакокинетические характеристики при повторном введении дозы посредством внутривенного введения мышам. Число копий РНК в сыворотке после введения дозы измеряют в заранее определенной временной точке. Результаты показывают, что ЛНЧ,

приготовленные с использованием BRIJ™ S100, демонстрируют пониженную скорость клиренса после второй дозы по сравнению с ЛНЧ, приготовленными с использованием PEG-2k DPG или PEG2k-DMG.

Пример 24: Приготовление ЛНЧ, инкапсулирующих мРНК

[00947] Этот пример иллюстрирует инкапсуляцию мРНК в составах липидных наночастиц (ЛНЧ). ЛНЧ в этом примере содержат липидную композицию CAT7: DSPC: холестерин : CHM-006 в соотношении 54,5 : 20 : 25 : 0,5 моль%. Смесь липидов в этаноле смешивали с мРНК человеческого эритропоэтина (hEPO) или мРНК, кодирующими биспецифический активатор Т-клеток (BiTE), в подкисляющем РНК буфере (5 mM цитрат, pH 3,5). Общая концентрация липидов была установлена на уровне 20 mM, а соотношение липид-азот-фосфат (N:P) составляло 9.

[00948] ЛНЧ диализовали против 50 mM фосфата, pH 6,0, в течение 12-16 часов, а вторичный диализ проводили против 50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 263 mM сахарозы, pH 7,3, в течение 4-24 часов при комнатной температуре. Постдиализные ЛНЧ концентрировали с помощью фильтров AMICON® ULTRA CENTRIFUGAL 100 кДа (MilliporeSigma), а затем стерильно концентрировали с помощью шприцевых фильтров 0,2 мкм. Затем образцы характеризовали и разбавляли по мере необходимости. После разбавления добавляли глицерин в концентрации 5 мас/об%, если образцы хранили при -20°C.

[00949] Размеры ЛНЧ измеряли с помощью DLS, а эффективность инкапсуляции измеряли с использованием флуоресцентного анализа RiboGreen (таблица 26).

Таблица 26. мРНК в составе ЛНЧ

мРНК	Ионизируемый липид (CAT)	ПЭГ-липид	CAT : DSPC : Холестерин : PEG _{2k} -DMG (мол.%)	Размер (нм)	ИПД	% ЭИ
hEPO	CAT7	CHM-006	54,5 : 20 : 25 : 0,5	85	0,14	97
BiTE	CAT7	CHM-006	54,5 : 20 : 25 : 0,5	86	0,13	97
hEPO	CAT7	CHM-006	54,5 : 20 : 25 : 0,5	87	0,16	97
BiTE	CAT7	CHM-006	54,5 : 20 : 25 : 0,5	88,5	0,13	98

Пример 25: Фармакокинетика ЛНЧ, содержащих в составе мРНК

[00950] ФК составов ЛНЧ, инкапсулирующих мРНК (таблица 26), оценивали на мышах.

[00951] Наивным самкам мышей Balb/c вводили дозу 1 мг/кг ЛНЧ. У 3 мышей брали кровь в каждой заранее определенной временной точке и плазму

замораживали при -80°C для последующего анализа. Уровни hEP0 и BiTE в плазме крови определяли с помощью электрохемилюминесцентного (ECL) анализа Meso Scale Discovery (MSA) (Фиг. 66А и Фиг. 66В). Наблюдались высокие уровни экспрессии белка и длительное воздействие.

Пример 26: ЛНЧ, содержащие в составе РНК различной длины

[00952] Составы ЛНЧ, инкапсулирующие РНК различной длины, готовили в соответствии с таблицей 27 ниже, следуя процедуре, аналогичной описанной в примере 24.

Таблица 27. Составы ЛНЧ

Длина РНК (кб)	Состав	Ионизируемый липид	ПЭГ-липид	Ионизируемый липид : DSPC : Холестерин : ПЭГ-липид (мол. %)	Подкисляющий буфер	Размер (нм)	ИПД	% ЭИ
5,9	OC/Brij	Coatsome SS-OC	BRIJ™ S100	49 : 22 : 28,5 : 0,5	25mM ацетат, pH 5	77,9	0,26	98%
14,2	OC/Brij	Coatsome SS-OC	BRIJ™ S100	49 : 22 : 28,5 : 0,5	25mM ацетат, pH 5	93,5	0,23	95%
12,6	OC/Brij	Coatsome SS-OC	BRIJ™ S100	49 : 22 : 28,5 : 0,5	25mM ацетат, pH 5	131,9	0,32	92%
5,9	CAT7/DMG	CAT7	PEG _{2k} -DMG	54,5 : 20 : 25 : 0,5	5mM цитрат, pH 3,5	80,4	0,05	99%
14,2	CAT7/DMG	CAT7	PEG _{2k} -DMG	54,5 : 20 : 25 : 0,5	5mM цитрат, pH 3,5	99,8	0,22	93%
12,6	CAT7/DMG	CAT7	PEG _{2k} -DMG	54,5 : 20 : 25 : 0,5	5mM цитрат, pH 3,5	99,3	0,21	93%

[00953] Данные показывают, что ЛНЧ сохраняют хорошие биофизические свойства (например, небольшой размер и ИПД, высокий % ЭИ), несмотря на переменную длину инкапсулированной РНК.

Пример 27: Исследования составов и моделирование ЛНЧ, содержащих CAT7

[00954] А-оптимальный критерий (Jones et al. 2021) использовали для разработки составов ЛНЧ, содержащих CAT7 (фиг. 67) в результате чего было обеспечено 20 схем проведения эксперимента (DOE) (таблица 29). Общая концентрация липидов была установлена на уровне 20 mM, а соотношение N:P - на уровне 9. В рамках разработанных экспериментов тестировались ЛНЧ, содержащие 40-60 мол% ионизируемого липида CAT7, 5-20 мол% вспомогательного липида DSPC, 25-50 мол% структурного липида холестерина и 0,25-3% ПЭГ-липид DMG-PEG2000 или CHM-001.

Таблица 29. Схема эксперимента для ЛНЧ, содержащих CAT7

DOE Цикл	Композиция	мол %
1	CAT7: DSPC : Холестерин : PEG _{2k} -DMG	50 : 11,25 : 36,75 : 2
2	CAT7: DSPC : Холестерин : PEG _{2k} -DMG	40 : 20 : 39,5 : 0,5
3	CAT7: DSPC : Холестерин : PEG _{2k} -DMG	60 : 5 : 32 : 3
4	CAT7: DSPC : Холестерин : CHM-001	60,9 : 12,2 : 25,4 : 1,5
5	CAT7: DSPC : Холестерин : CHM-001	40,1 : 9,5 : 50,1 : 0,25
6	CAT7: DSPC : Холестерин : PEG _{2k} -DMG	44,5 : 5 : 50 : 0,5
7	CAT7: DSPC : Холестерин : PEG _{2k} -DMG	40 : 8,75 : 50 : 1,25
8	CAT7: DSPC : Холестерин : CHM-001	60,5 : 5,0 : 33,5 : 0,88
9	CAT7: DSPC : Холестерин : PEG _{2k} -DMG	60 : 14,5 : 25 : 0,5
10	CAT7: DSPC : Холестерин : CHM-001	40,4 : 20,2 : 38,6 : 0,83
11	CAT7: DSPC : Холестерин : PEG _{2k} -DMG	52,75 : 20 : 25 : 2,25
12	CAT7: DSPC : Холестерин : CHM-001	42,6 : 5,1 : 50,8 : 1,52
13	CAT7: DSPC : Холестерин : CHM-001	55,7 : 18,9 : 25,1 : 0,25
14	CAT7: DSPC : Холестерин : CHM-001	50,4 : 11,1 : 37,2 : 1,27
15	CAT7: DSPC : Холестерин : PEG _{2k} -DMG	40 : 7 : 50 : 3
16	CAT7: DSPC : Холестерин : CHM-001	60,2 : 5 : 34,6 : 0,25
17	CAT7: DSPC : Холестерин : PEG _{2k} -DMG	40 : 20 : 37 : 3
18	CAT7: DSPC : Холестерин : CHM-001	40,1 : 9,5 : 50,1 : 0,25
19	CAT7: DSPC : Холестерин : PEG _{2k} -DMG	60 : 5 : 34,3 : 0,7
20	CAT7: DSPC : Холестерин : PEG _{2k} -DMG	40,6 : 20,3 : 37,6 : 1,52

[00955] В рамках параметров надежного технического решения оптимальный состав DOE был определен как CAT7 : DSPC : Холестерин : ПЭГ-липид с мол.% соотношением 54,5: 20 : 25 : 0,5.

[00956] Метод самопроверяемого ансамблевого моделирования (SVEM) (Lemkus et al. 2021) использовали для построения модели прогнозирования биофизических характеристик ЛНЧ различного состава, а также идентификации и точной настройки систем ЛНЧ для достижения различных желаемых результатов. При разработке модели целью было минимизировать ИПД (оцененный как 1) и размер (оцененный как 0,1).

[00957] Полученные профили прогнозирования показаны на **фиг. 68**. Квадратичные (криволинейные или нелинейные) зависимости наблюдаются для CAT7, DSPC и холестерина. Состав CAT7, по-видимому, существенно влияет на ИПД, причем вначале, начиная с 40 мол%, наблюдается тенденция к увеличению, а затем - к уменьшению, которая стабилизируется при ~55 мол %. Более высокий DSPC, похоже, способствует снижению как ИПД, так и размера. Для холестерина наблюдается картина, очень похожая на CAT7 как по ИПД, так и по размеру, но модель выбирает более низкий

молярный состав. Увеличение состава ПЭГ-липидов связано с резким увеличением наблюдаемого ИПД.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[00958] Все ссылки, статьи, публикации, патенты, патентные публикации и патентные заявки, цитируемые в данном документе, в полном объеме и во всех целях включены посредством ссылки. Однако упоминание любых ссылок, статей, публикаций, патентов, патентных публикаций и патентных заявок, цитируемых в данном документе не является и не должно восприниматься как признание или любая форма предположения, что они составляют действительный уровень техники или образуют часть общедоступных сведений в любой стране мира.

[00959] Несмотря на то, что в настоящем документе были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что данные варианты осуществления приведены исключительно с целью иллюстрации. Множество вариаций, изменений и замен будут очевидны специалистам в данной области техники без отхода от объема и сущности настоящего изобретения. Следует понимать, что при осуществлении данного изобретения могут быть использованы различные альтернативы описанным в данном документе вариантам осуществления изобретения. Предполагается, что нижеследующая формула изобретения определяет объем изобретения, и что способы и структуры в рамках этой формулы изобретения и их эквиваленты охвачены ею.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Липидная наночастица (ЛНЧ), содержащая синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий онколитический вирус Коксаки, где вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21, выбранный из штамма Kuynkendall, штамма EF и штамма KY.

2. ЛНЧ по п. 1, отличающаяся тем, что вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21-KY, при этом штамм CVA21-KY содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 5.

3. ЛНЧ по п. 1, отличающаяся тем, что вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21-EF, при этом штамм CVA21-EF содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 9.

4. ЛНЧ по п. 1, отличающаяся тем, что вирус Коксаки содержит последовательность 5'-UTR (IRES), по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичную последовательности SEQ ID NO: 6 или 10.

5. ЛНЧ по п. 1, отличающаяся тем, что вирус Коксаки содержит последовательность P1, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичную последовательности SEQ ID NO: 7 или 11.

6. ЛНЧ по п. 1, отличающаяся тем, что вирус Коксаки содержит последовательность 3D, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичную последовательности SEQ ID NO: 8 или 12.

7. ЛНЧ по любому из пп. 1-6, отличающаяся тем, что синтетический РНК-вирусный геном не содержит полинуклеотидную последовательность, более чем на 95%, более чем на 90%, более чем на 85% или более чем на 80% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1.

8. Липидная наночастица (ЛНЧ), содержащая синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий онколитический вирус долины Сенека (SVV), при этом синтетический РНК-вирусный геном содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 13.

мере на 95% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 68.

9. ЛНЧ по п. 8, отличающаяся тем, что синтетический РНК-вирусный геном содержит последовательность 5'-UTR (IRES), по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную нуклеиновым кислотам 1–670 последовательности SEQ ID NO: 68.

10. ЛНЧ по п. 8 или 9, отличающаяся тем, что синтетический РНК-вирусный геном кодирует белок SVV VP2, содержащий мутацию S177A.

11. ЛНЧ по любому из пп. 1-10, отличающаяся тем, что доставка ЛНЧ в клетку приводит к продукции вирусных частиц клеткой, и при этом вирусные частицы являются инфекционными и литическими.

12. ЛНЧ по любому из пп. 1-11, отличающаяся тем, что синтетический РНК-вирусный геном дополнительно содержит гетерологичный полинуклеотид, кодирующий экзогенный белок полезной нагрузки.

13. ЛНЧ по любому из пп. 1-11, дополнительно содержащая вторую молекулу рекомбинантной РНК, кодирующую экзогенный белок полезной нагрузки.

14. ЛНЧ по п. 12 или 13, отличающаяся тем, что экзогенный белок полезной нагрузки содержит или состоит из домена 4HB MLKL, N-концевого фрагмента гасдермина D, N-концевого фрагмента гасдермина E, домена Box B HMGB1, SMAC/Diablo, мелиттина, оксидазы L-аминокислот (LAAO), дезинтегрина, TRAIL (TNFSF10), нитроредуктазы, белка FAST реовируса, лептина/FOSL2, α -1,3-галактозилтрансферазы или аденозиндезаминазы 2 (ADA2).

15. ЛНЧ по п. 14, отличающаяся тем, что нитроредуктаза представляет собой NfsB или NfsA.

16. ЛНЧ по п. 14, отличающаяся тем, что белок FAST реовируса представляет собой ARV p14, BRV p15 или гибрид p14-p15.

17. ЛНЧ по п. 12 или 13, отличающаяся тем, что экзогенный белок полезной нагрузки представляет собой флуоресцентный белок, белок-фермент, цитокин, хемокин, антигенсвязывающую молекулу, способную связываться с рецептором клеточной поверхности, или лиганд для рецептора клеточной поверхности.

18. ЛНЧ по п. 17, отличающаяся тем, что:

- a) цитокин выбран из GM-CSF, IFN γ , IL-2, IL-7, IL-12, IL-18, IL-21 и IL-36 γ ;
- b) лиганд для рецептора клеточной поверхности представляет собой лиганд Flt3 или TNFSF14; или
- c) хемокин выбран из CXCL10, CCL4, CCL21 и CCL5.

19. ЛНЧ по п. 17, отличающаяся тем, что антигенсвязывающая молекула

способна связываться с рецептором иммунной контрольной точки и ингибировать его.

20. ЛНЧ по п. 19, отличающаяся тем, что рецептор иммунной контрольной точки представляет собой PD-1.

21. ЛНЧ по п. 17, отличающаяся тем, что антигенсвязывающая молекула способна связываться с опухолевым антигеном.

22. ЛНЧ по п. 21, отличающаяся тем, что антигенсвязывающая молекула представляет собой молекулу привлекающего Т-клетки биспецифического активатора (BiTE), или молекулу привлекающего Т-клетки биспецифического «легкого» активатора (LiTE).

23. ЛНЧ по п. 21 или 22, отличающаяся тем, что опухолевый антиген представляет собой вирусный антиген, выбранный из HBV-core (внутренний антиген гепатита В), HBV-pol, HbS-Ag, HPV E6, HPV E7, большого Т-антигена полиомавируса клеток Меркеля и антигена EBNA2 или BZLF1 вируса Эпштейна-Барра.

24. ЛНЧ по п. 21 или 22, отличающаяся тем, что опухолевый антиген представляет собой DLL3 или EpCAM.

25. ЛНЧ по любому из пп. 1-24, отличающаяся тем, что синтетический РНК-вирусный геном и/или молекула рекомбинантной РНК содержит кассету с целевой последовательности микроРНК (miРНК) (miR-TS), при этом кассета miR-TS содержит одну или несколько целевых последовательностей микроРНК.

26. ЛНЧ по п. 25, отличающаяся тем, что одна или более микроРНК выбраны из miR-124, miR-1, miR-143, miR-128, miR-219, miR-219a, miR-122, miR-204, miR-217, miR-137, miR-142 и miR-126.

27. ЛНЧ по п. 26, отличающаяся тем, что кассета miR-TS содержит:

а. одну или несколько копий целевой последовательности miR-124, одну или несколько копий целевой последовательности miR-1 и одну или несколько копий целевой последовательности miR-143;

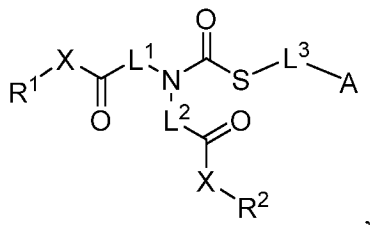
б. одну или несколько копий целевой последовательности miR-128, одну или несколько копий целевой последовательности miR-219a и одну или несколько копий целевой последовательности miR-122;

с. одну или несколько копий целевой последовательности miR-128, одну или несколько копий целевой последовательности miR-204 и одну или несколько копий целевой последовательности miR-219; или

д. одну или несколько копий целевой последовательности miR-217, одну или несколько копий целевой последовательности miR-137 и одну или несколько копий целевой последовательности miR-126.

28. ЛНЧ по любому из пп. 1-27, отличающаяся тем, что ЛНЧ содержит катионный липид, вспомогательный липид, структурный липид и ПЭГ-липид.

29. ЛНЧ по п. 28, отличающаяся тем, что катионный липид представляет собой соединение формулы (I):



Формула (I)

или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где:

A представляет собой $-\text{N}(\text{CH}_2\text{R}^{\text{N}1})(\text{CH}_2\text{R}^{\text{N}2})$ или 4-7-членное гетероциклическое кольцо, содержащее по меньшей мере один N, где 4-7-членное гетероциклическое кольцо необязательно замещено 0-6 R^3 ;

каждый X независимо представляет собой $-\text{O}-$, $-\text{N}(\text{R}^1)-$ или $-\text{N}(\text{R}^2)-$;

R^1 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенных $\text{C}_1\text{-C}_{31}$ алифатических групп и стероида;

R^2 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенных $\text{C}_1\text{-C}_{31}$ алифатических групп и стероида;

R^3 необязательно замещен $\text{C}_1\text{-C}_6$ алифатическими группами;

каждый из $\text{R}^{\text{N}1}$ и $\text{R}^{\text{N}2}$ независимо представляет собой водород, гидрокси- $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкил, $\text{C}_2\text{-C}_6$ алкенил или $\text{C}_3\text{-C}_7$ циклоалкил;

L^1 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенной $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ алкиленовой цепи и двухвалентной необязательно замещенной $\text{C}_2\text{-C}_{20}$ алкениленовой цепи;

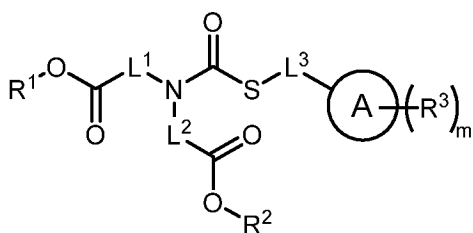
L^2 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенной $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ алкиленовой цепи и двухвалентной необязательно замещенной $\text{C}_2\text{-C}_{20}$ алкениленовой цепи; и

L^3 представляет собой связь, необязательно замещенную $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкиленовую цепь или двухвалентный необязательно замещенный $\text{C}_3\text{-C}_7$ циклоалкилен; и

при условии, что когда A представляет собой $-\text{N}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ и X представляет собой O, L^3 не является $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкиленовой цепью.

30. ЛНЧ по п. 29, отличающаяся тем, что количество атомов углерода между S тиолата и ближайшим N, содержащимся в A, составляет 2-4.

31. ЛНЧ по п. 29 или 30, отличающаяся тем, что катионный липид представляет собой соединение формулы (I-a):



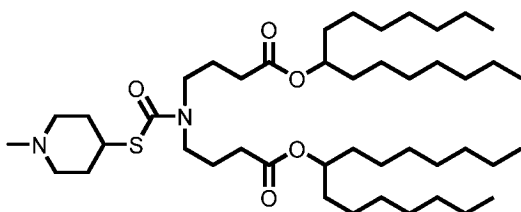
Формула (I-a)

или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где:

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

32. ЛНЧ по любому из пп. 29-31, отличающаяся тем, что А представляет собой необязательно замещенное 5-6-членное гетероциклическое кольцо.

33. ЛНЧ по п. 29, отличающаяся тем, что катионный липид представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль или сольват.

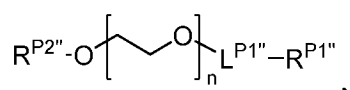
34. ЛНЧ по п. 28, отличающаяся тем, что катионный липид выбран из DLinDMA, DLin-KC2-DMA, DLin-MC3-DMA (MC3), COATSOME® SS-LC (прежнее название: SS-18/4PE-13), COATSOME® SS-EC (прежнее название: SS-33/4PE-15), COATSOME® SS-OC, COATSOME® SS-OP, ди((Z)-нон-2-ен-1-ил)9-((4-диметиламино)бутаноил)окси)гептадекандиоата (L-319) или N-(2,3-диолеоилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмонийхлорида (DOTAP).

35. ЛНЧ по любому из пп. 28-34, отличающаяся тем, что вспомогательный липид выбран из 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DSPC); 1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (DLPE); 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DOPC); и 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (DOPE).

36. ЛНЧ по п. 28, отличающаяся тем, что катионный липид представляет собой 1,2-диолеоил-3-триметиламмонийпропан (DOTAP), и при этом вспомогательный липид представляет собой 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DLPE) или 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE).

37. ЛНЧ по любому из пп. 28-36, отличающаяся тем, что структурный липид представляет собой холестерин.

38. ЛНЧ по любому из пп. 28-37, отличающаяся тем, что ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (A''):



Формула (A'')

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

n равно целому числу от 10 до 200, включая все конечные точки;

$L^{P1''}$ представляет собой связь, $-[(CH_2)_{0-3}-C(O)O]_{1-3}-$, $-(CH_2)_{0-3}-C(O)O-(CH_2)_{1-3}-$ $OC(O)-$ или $-C(O)N(H)-$;

$R^{P1''}$ представляет собой C_5-C_{25} алкил или C_5-C_{25} алкенил; и

$R^{P2''}$ представляет собой водород или $-CH_3$,

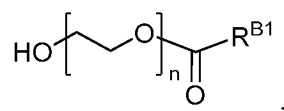
и при этом ЛНЧ имеет молярное соотношение от около 0,001% до около 5% ПЭГ-липид.

39. ЛНЧ по п. 38, отличающаяся тем, что $L^{P1''}$ представляет собой связь, $-CH_2C(O)O-$, $-CH_2CH_2C(O)O-$, $-CH_2C(O)OCH_2C(O)O-$, $-CH_2C(O)OCH_2CH_2OC(O)-$ или $-C(O)N(H)-$.

40. ЛНЧ по п. 38, отличающаяся тем, что $L^{P1''}$ представляет собой связь.

41. ЛНЧ по любому из пп. 38-40, отличающаяся тем, что $R^{P2''}$ представляет собой водород.

42. ЛНЧ по любому из пп. 28-37, отличающаяся тем, что ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (B):



Формула (B)

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

n равно целому числу от 10 до 200, включая все конечные точки; и

R^{B1} представляет собой C_5-C_{25} алкил или C_5-C_{25} алкенил, и

при этом ЛНЧ имеет молярное соотношение от около 0,001% до около 5% ПЭГ-липид.

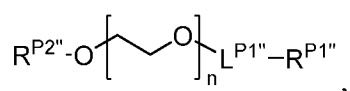
43. ЛНЧ по любому из пп. 28-37, отличающаяся тем, что ПЭГ-липид выбран из 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина-N-[амино(полиэтиленгликоля)] (DSPE-PEG); 1,2-дипальмитоил-рац-глицеринметоксиполиэтиленгликоля (DPG-PEG); 1,2-дистеароил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена (DSG-PEG); 1,2-дистеароил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена (DSG-PEG); 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена (DMG-PEG); и 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена (DMG-PEG), или 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-

N-[амино(полиэтиленгликоля)] (DSPE-PEG-амин).

44. ЛНЧ по любому из пп. 28-37, отличающаяся тем, что ПЭГ-липид выбран из 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина-N-[амино(полиэтиленгликоля)-5000] (DSPE-PEG5K); 1,2-дипальмитоил-рац-глицерин метоксиполиэтиленгликоля-2000 (DPG-PEG2K); 1,2-дистеароил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена-5000 (DSG-PEG5K); 1,2-дистеароил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена-2000 (DSG-PEG2K); 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена-5000 (DMG-PEG5K); и 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтилена-2000 (DMG-PEG2K).

45. ЛНЧ по п. 28, отличающаяся тем, что катионный липид содержит COATSOME® SS-OC, при этом вспомогательный липид содержит DSPC, структурный липид содержит холестерин (Chol), а ПЭГ-липид содержит DPG-PEG2000.

46. ЛНЧ по п. 28, отличающаяся тем, что катионный липид содержит COATSOME® SS-OC, при этом вспомогательный липид содержит DSPC, структурный липид содержит холестерин (Chol), а ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (A''):



Формула (A'')

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

n равно целому числу от 10 до 200, включая все конечные точки;

L^{P1''} представляет собой связь;

R^{P1''} представляет собой C₅-C₂₅ алкил или C₅-C₂₅ алкенил; и

R^{P2''} представляет собой водород, и

при этом ЛНЧ имеет молярное соотношение от около 0,001% до около 5% ПЭГ-липидов.

47. ЛНЧ по любому из пп. 28-37 и 46, отличающаяся тем, что ПЭГ-липид выбран из группы, состоящей из BRIJ™ S100, BRIJ™ S20, BRIJ™ O20 и BRIJ™ C20.

48. ЛНЧ по любому из пп. 28-37 и 46, отличающаяся тем, что ПЭГ-липид представляет собой BRIJ™ S100.

49. ЛНЧ по любому из пп. 45-48, отличающаяся тем, что соотношение SS-OC:DSPC:Chol:ПЭГ-липид (в процентах от общего содержания липидов) составляет A:B:C:D, где A+B+C+D = 100%, и где

- A = 40-60%, B = 10-25%, C = 20-30% и D = 0,01-3%;
- A = 45-50%, B = 20-25%, C = 25-30% и D = 0,01-1%; или
- A = около 49%, B = около 22%, C = около 28% и D = около

0,5%.

50. ЛНЧ по любому из пп. 45-48, отличающаяся тем, что соотношение SS-OC:DSPC:Chol:ПЭГ-липид (в процентах от общего содержания липидов) составляет A:B:C:D, где $A+B+C+D = 100\%$, и где

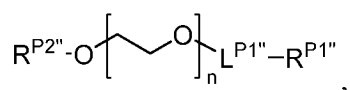
- a. $A = 40-60\%$, $B = 10-30\%$, $C = 20-45\%$ и $D = 0-3\%$;
- b. $A = 40-60\%$, $B = 10-30\%$, $C = 25-45\%$ и $D = 0,01-3\%$;
- c. $A = 45-55\%$, $B = 10-20\%$, $C = 30-40\%$ и $D = 1-2\%$;
- d. $A = 45-50\%$, $B = 10-15\%$, $C = 35-40\%$ и $D = 1-2\%$; или
- e. $A = \text{около } 49\%$, $B = \text{около } 11\%$, $C = \text{около } 38\%$ и $D = \text{около } 1,5\%$.

51. ЛНЧ по любому из пп. 45-48, отличающаяся тем, что соотношение SS-OC:DSPC:Chol:ПЭГ-липид (в процентах от общего содержания липидов) составляет около A:B:C:D, где $A+B+C+D = 100\%$, и где

- a. $A = 45-65\%$, $B = 5-20\%$, $C = 20-45\%$ и $D = 0-3\%$;
- b. $A = 50-60\%$, $B = 5-15\%$, $C = 30-45\%$ и $D = 0,01-3\%$;
- c. $A = 55-60\%$, $B = 5-15\%$, $C = 30-40\%$ и $D = 1-2\%$;
- d. $A = 55-60\%$, $B = 5-10\%$, $C = 30-35\%$ и $D = 1-2\%$; или
- e. $A = \text{около } 58\%$, $B = \text{около } 7\%$, $C = \text{около } 33\%$ и $D = \text{около } 1,5\%$.

52. Липидная наночастица (ЛНЧ), содержащая:

- a. синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий вирус долины Сенека (SVV); и
- b. катионный липид, вспомогательный липид, структурный липид и ПЭГ-липид, где ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (A''):



Формула (A'')

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

n равно целому числу от 10 до 200, включая все конечные точки;

$L^{P1''}$ представляет собой связь, $-(CH_2)_{0-3}-C(O)O$, $-(CH_2)_{0-3}-C(O)O-(CH_2)_{1-3}-OC(O)-$ или $-C(O)N(H)-$;

$R^{P1''}$ представляет собой C_5-C_{25} алкил или C_5-C_{25} алкенил; и

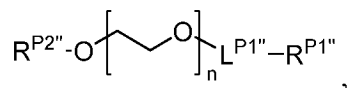
$R^{P2''}$ представляет собой водород или $-CH_3$, и

при этом ЛНЧ имеет молярное соотношение от около 0,001% до около 5% ПЭГ-липид.

53. Липидная наночастица (ЛНЧ), содержащая:

- a. синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий вирус Коксаки; и
- b. катионный липид, вспомогательный липид, структурный липид и

ПЭГ-липид, где ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (A''):



Формула (A'')

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

n равно целому числу от 10 до 200, включая все конечные точки;

$L^{P1''}$ представляет собой связь, $-[(CH_2)_{0-3}-C(O)O]_{1-3}-$, $-(CH_2)_{0-3}-C(O)O-(CH_2)_{1-3}-$ $OC(O)-$ или $-C(O)N(H)-$;

$R^{P1''}$ представляет собой C_5-C_{25} алкил или C_5-C_{25} алкенил; и

$R^{P2''}$ представляет собой водород или $-CH_3$, и

при этом ЛНЧ имеет молярное соотношение от около 0,001% до около 5% ПЭГ-липид.

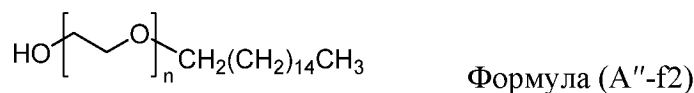
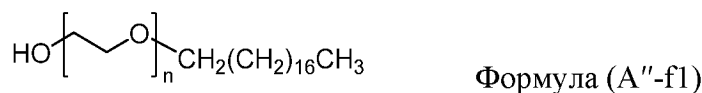
54. ЛНЧ по п. 52 или 53, отличающаяся тем, что R^1 представляет собой $C_{16}-C_{18}$ алкил или $C_{16}-C_{18}$ алкенил.

55. ЛНЧ по любому из пп. 52-54, отличающаяся тем, что $L^{P1''}$ представляет собой связь, $-CH_2C(O)O-$, $-CH_2CH_2C(O)O-$, $-CH_2C(O)OCH_2C(O)O-$, $-CH_2C(O)OCH_2CH_2OC(O)-$ или $-C(O)N(H)-$.

56. ЛНЧ по любому из пп. 52-54, отличающаяся тем, что $L^{P1''}$ представляет собой связь.

57. ЛНЧ по любому из пп. 52-56, отличающаяся тем, что $R^{P2''}$ представляет собой водород.

58. ЛНЧ по п. 52 или 53, отличающаяся тем, что ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (A''-f1), формулы (A''-f2) или формулы (A''-f3):



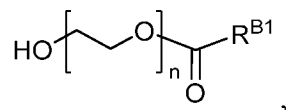
или их фармацевтически приемлемую соль.

59. Липидная наночастица (ЛНЧ), содержащая:

- a. синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий вирус долины

Сенека (SVV); и

b. катионный липид, вспомогательный липид, структурный липид и ПЭГ-липид, где ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (B):



Формула (B)

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

n равно целому числу от 10 до 200, включая все конечные точки; и

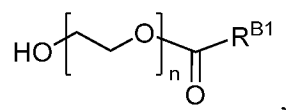
R^{B1} представляет собой C₅-C₂₅ алкил или C₅-C₂₅ алкенил, и

при этом ЛНЧ имеет молярное соотношение от около 0,001% до около 5% ПЭГ-липида.

60. Липидная наночастица (ЛНЧ), содержащая:

a. синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий вирус Коксаки; и

b. катионный липид, вспомогательный липид, структурный липид и ПЭГ-липид, где ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (B):



Формула (B)

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

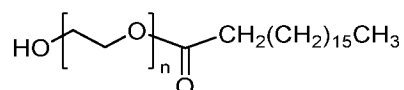
n равно целому числу от 10 до 200, включая все конечные точки; и

R^{B1} представляет собой C₅-C₂₅ алкил или C₅-C₂₅ алкенил, и

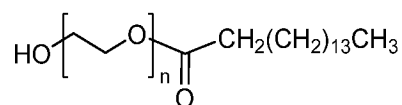
при этом ЛНЧ имеет молярное соотношение от около 0,001% до около 5% ПЭГ-липида.

61. ЛНЧ по п. 59 или 60, отличающаяся тем, что R¹ представляет собой C₁₅-C₁₇ алкил или C₁₅-C₁₇ алкенил.

62. ЛНЧ по п. 59 или 60, отличающаяся тем, что ПЭГ-липид представляет собой соединение формулы (B-a) или формулы (B-b):



Формула (B-a)



Формула (B-b)

или их фармацевтически приемлемой соли.

63. ЛНЧ по любому из пп. 52-62, отличающаяся тем, что n составляет в среднем около 20, около 40, около 50 или около 100.

64. ЛНЧ по любому из пп. 52-62, отличающаяся тем, что n в среднем составляет около 100.

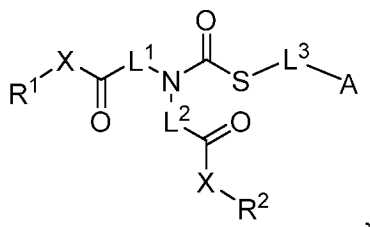
65. ЛНЧ по любому из пп. 52-64, отличающаяся тем, что ПЭГ-липид содержит фрагмент ПЭГ со средним молекулярным весом от около 200 дальтон до около 10 000 дальтон, от около 500 дальтон до около 7 000 дальтон, или от около 800 дальтон до около 6 000 дальтон.

66. ЛНЧ по любому из пп. 52-65, отличающаяся тем, что ПЭГ-липид выбран из группы, состоящей из HO-PEG100-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₄CH₃, HO-PEG20-C₁₈H₃₅, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃ и HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃.

67. ЛНЧ по любому из пп. 52-66, отличающаяся тем, что ЛНЧ индуцирует сниженный иммунный ответ *in vivo* по сравнению с контрольной ЛНЧ, не содержащей ПЭГ-липида формулы (A'') и/или ионизируемого липида формулы (I), необязательно, при этом ПЭГ-липид в контрольной ЛНЧ представляет собой PEG2K-DPG или PEG2K-DMG.

68. ЛНЧ по п. 67, отличающаяся тем, что иммунный ответ представляет собой ускоренный клиренс ЛНЧ из крови (ABC) и/или ответ IgM на ПЭГ.

69. ЛНЧ по любому из пп. 52-68, отличающаяся тем, что катионный липид представляет собой соединение формулы (I):



Формула (I)

или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где:

A представляет собой $-\text{N}(\text{CH}_2\text{R}^{\text{N}1})(\text{CH}_2\text{R}^{\text{N}2})$ или 4-7-членное гетероциклическое кольцо, содержащее по меньшей мере один N, где 4-7-членное гетероциклическое кольцо необязательно замещено 0-6 R³;

каждый X независимо представляет собой $-\text{O}-$, $-\text{N}(\text{R}^1)-$ или $-\text{N}(\text{R}^2)-$;

R¹ выбран из группы, состоящей из необязательно замещенных C₁-C₃₁ алифатических групп и стероида;

R² выбран из группы, состоящей из необязательно замещенных C₁-C₃₁ алифатических групп и стероида;

R³ необязательно замещен C₁-C₆ алифатическими группами;

каждый из R^{N1} и R^{N2} независимо представляет собой водород, гидроксигруппу, алкил, C_2-C_6 алкенил или C_3-C_7 циклоалкил;

L^1 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенной C_1-C_{20} алкиленовой цепи и двухвалентной необязательно замещенной C_2-C_{20} алкениленовой цепи;

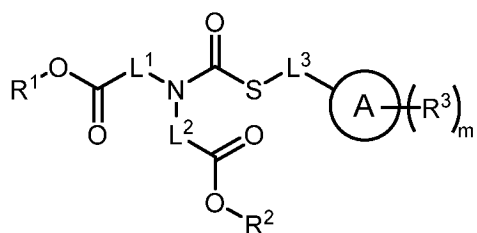
L^2 выбран из группы, состоящей из необязательно замещенной C_1-C_{20} алкиленовой цепи и двухвалентной необязательно замещенной C_2-C_{20} алкениленовой цепи; и

L^3 представляет собой связь, необязательно замещенную C_1-C_6 алкиленовую цепь или двухвалентный необязательно замещенный C_3-C_7 циклоалкилен; и

при условии, что когда А представляет собой $-N(CH_3)(CH_3)$ и Х представляет собой О, L^3 не является C_1-C_6 алкиленовой цепью.

70. ЛНЧ по п. 69, отличающаяся тем, что количество атомов углерода между S тиолата и ближайшим N, содержащимся в А, составляет 2-4.

71. ЛНЧ по п. 69 или 70, отличающаяся тем, что катионный липид представляет собой соединение формулы (I-a):



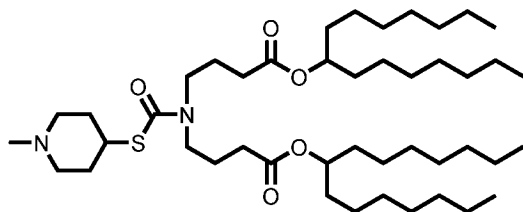
Формула (I-a)

или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где:

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

72. ЛНЧ по любому из пп. 69-71, отличающаяся тем, что А представляет собой необязательно замещенное 5-6-членное гетероциклическое кольцо.

73. ЛНЧ по п. 69, отличающаяся тем, что катионный липид представляет собой

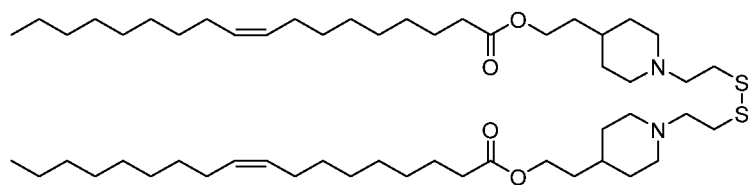


или его фармацевтически приемлемую соль или сольват.

74. ЛНЧ по любому из пп. 52-68, отличающаяся тем, что катионный липид выбран из DLinDMA, DLin-KC2-DMA, DLin-MC3-DMA (MC3), COATSOME® SS-LC (прежнее название: SS-18/4PE-13), COATSOME® SS-EC (прежнее название: SS-33/4PE-15), COATSOME® SS-OC, COATSOME® SS-OP, ди((Z)-нон-2-ен-1-ил)9-((4-диметиламино)бутаноил)окси)гептадекандиоат (L-319), N-(2,3-диолеилокси)пропил-

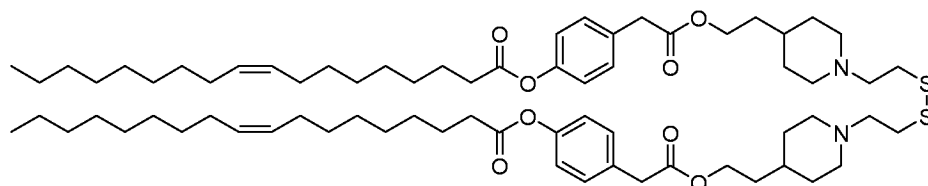
N,N,N-триметиламмонийхлорида (DOTAP) или их смеси.

75. ЛНЧ по любому из пп. 52-68, отличающаяся тем, что катионный липид представляет собой соединение формулы (II-1a):



Формула (II-1a), или

соединение формулы (II-2a):



Формула (II-2a).

76. ЛНЧ по любому из пп. 52-75, отличающаяся тем, что катионный липид представляет собой соединение формулы (II-1a), структурный липид представляет собой холестерин, вспомогательный липид представляет собой DSPC, а ПЭГ-липид представляет собой BRIJTM S100.

77. ЛНЧ по любому из пп. 52-75, отличающаяся тем, что катионный липид представляет собой соединение формулы (II-1a), структурный липид представляет собой холестерин, вспомогательный липид представляет собой DSPC и ПЭГ-липид представляет собой MYRJTM S100, MYRJTM S50 или MYRJTM S40.

78. ЛНЧ по любому из пп. 52-77, отличающаяся тем, что ЛНЧ содержит молярное соотношение от около 0,1% до около 2% ПЭГ-липида, например, от около 0,2% до около 0,8 мол%, от около 0,4% до около 0,6 мол%, от около от около 0,7% до около 1,3% или от около от около 1,2% до около 1,8% ПЭГ-липида.

79. ЛНЧ по любому из пп. 52-78, отличающаяся тем, что ЛНЧ содержит молярное соотношение от около 0,2% до около 0,8% или около 0,5% ПЭГ-липида.

80. ЛНЧ по любому из пп. 52-78, отличающаяся тем, что ЛНЧ содержит молярное соотношение от около 1,2% до около 1,8% или около 1,5% ПЭГ-липида.

81. ЛНЧ по любому из пп. 52-80, отличающаяся тем, что ЛНЧ имеет молярное соотношение от около 44% до около 54% катионного липида, от около 19% до около 25% вспомогательного липида, от около 24% до около 33% структурного липида и от около 0,2% до около 0,8% ПЭГ-липида.

82. ЛНЧ по любому из пп. 52-81, отличающаяся тем, что ЛНЧ содержит

соединение формулы (II-1a), холестерин, DSPC и ПЭГ-липид, выбранный из HO-PEG100-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₄CH₃, HO-PEG20-C₁₈H₃₅, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃ и HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, при этом молярное соотношение соединения формулы (II-1a): холестерин: DSPC : ПЭГ-липид составляет 49 : 28,5 : 22 : 0,5.

83. ЛНЧ по любому из пп. 52-81, отличающаяся тем, что ЛНЧ содержит соединение формулы (II-1a), холестерин, DSPC и ПЭГ-липид, выбранный из HO-PEG100-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₄CH₃, HO-PEG20-C₁₈H₃₅, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃ и HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, при этом молярное соотношение соединения формулы (II-1a): холестерин: DSPC : ПЭГ-липид составляет 49 : 27,5 : 22 : 1,5.

84. ЛНЧ по любому из пп. 52-81, отличающаяся тем, что ЛНЧ содержит соединение формулы (II-1a), холестерин, DSPC и ПЭГ-липид, выбранный из HO-PEG100-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₆CH₃, HO-PEG20-CH₂(CH₂)₁₄CH₃, HO-PEG20-C₁₈H₃₅, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₃CH₃, HO-PEG100-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, HO-PEG40-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃ и HO-PEG50-C(O)-CH₂(CH₂)₁₅CH₃, при этом молярное соотношение соединения формулы (II-1a): холестерин: DSPC : ПЭГ-липид составляет 49 : 38,5 : 11 : 1,5.

85. ЛНЧ по любому из пп. 52-84, отличающаяся тем, что ЛНЧ имеет соотношение липидного азот к фосфату (N:P) от около 1 до около 25.

86. ЛНЧ по любому из пп. 52-85, отличающаяся тем, что ЛНЧ имеет соотношение N:P около 14.

87. ЛНЧ по любому из пп. 1-86, отличающаяся тем, что гиалуронан конъюгирован с поверхностью ЛНЧ.

88. Фармацевтическая композиция, содержащая множество липидных наночастиц по любому из пп. 1-87.

89. Фармацевтическая композиция по п. 88, отличающаяся тем, что множество ЛНЧ имеет средний диаметр от около 50 нм до около 500 нм, от около 150 нм до около 500 нм, от около 200 нм до около 500 нм, от около 300 нм до около 500 нм, от около 350 нм до около 500 нм, от около 400 нм до около 500 нм, от около 425 нм до около 500 нм, от около 450 нм до около 500 нм или от около 475 нм до около 500 нм.

90. Фармацевтическая композиция по п. 88, отличающаяся тем, что множество ЛНЧ имеют средний диаметр от около 50 нм до около 120 нм.

91. Фармацевтическая композиция по п. 88, отличающаяся тем, что множество ЛНЧ имеют средний диаметр около 50 нм, 60 нм, 70 нм, 80 нм, 90 нм, 100 нм, 110 нм или около 120 нм.

92. Фармацевтическая композиция по п. 88, отличающаяся тем, что множество ЛНЧ имеют средний диаметр около 100 нм.

93. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 88-92, отличающаяся тем, что множество ЛНЧ имеют средний дзета-потенциал от около 40 мВ до около -40 мВ, от около 20 мВ до около -20 мВ, от около 10 мВ до около -10 мВ, от около 5 мВ до около -5 мВ или от около 20 мВ до около -40 мВ.

94. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 88-92, отличающаяся тем, что множество ЛНЧ имеют средний дзета-потенциал менее около 5 мВ, менее около 0 мВ, менее около -5 мВ, менее около -10 мВ, менее около -20 мВ, менее около -30 мВ, менее около -35 мВ или менее около -40 мВ.

95. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 88-92, отличающаяся тем, что множество ЛНЧ имеют средний дзета-потенциал от около -50 мВ до около -20 мВ, от около -40 мВ до около -20 мВ, от около -30 мВ до около -10 мВ, от около -20 мВ до около 0 мВ, от около -15 мВ до около 5 мВ или от около -10 мВ до около 10 мВ.

96. Фармацевтическая композиция по п. 94 или 95, отличающаяся тем, что средний дзета-потенциал множества ЛНЧ составляет около -30 мВ, около -31 мВ, около -32 мВ, около -33 мВ, около -34 мВ, около -35 мВ, около -36 мВ, около -37 мВ, около -38 мВ, около -39 мВ или около -40 мВ.

97. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 88-96, отличающаяся тем, что введение фармацевтической композиции субъекту доставляет в клетку-мишень субъекта полинуклеотид РНК, и при этом полинуклеотид рекомбинантной РНК продуцирует инфекционный онколитический вирус, способный лизировать клетку-мишень субъекта.

98. Фармацевтическая композиция по п. 97, отличающаяся тем, что клетка-мишень представляет собой раковую клетку.

99. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 88-98, отличающаяся тем, что составлена для внутривенной и/или внутриопухолевой доставки.

100. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 88-99, отличающаяся тем, что имеет продолжительность терапевтического эффекта *in vivo* больше, чем у композиции, не содержащей ПЭГ-липиды Формулы (А'') и/или ионизируемого липида Формулы (I).

101. Фармацевтическая композиция по п. 99 или 100, отличающаяся тем, что

имеет продолжительность терапевтического эффекта *in vivo* около 1 часа или более, около 2 часов или более, около 3 часов или более, около 4 часов или более, около 5 часов или более, около 6 часов или более, около 7 часов или более, около 8 часов или более, около 9 часов или более, около 10 часов или более, около 12 часов или более, около 14 часов или более, около 16 часов или более, около 18 часов или более, около 20 часов или более, около 25 часов или более, около 30 часов или более, около 35 часов или более, около 40 часов или более, около 45 часов или более или около 50 часов или более.

102. Фармацевтическая композиция по п. 99 или 100, отличающаяся тем, что имеет период полувыведения и/или AUC *in vivo*, превышающий или равный предварительно определенному пороговому значению.

103. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 88-102, отличающаяся тем, что эффективность инкапсуляции синтетического РНК-вирусного генома с помощью ЛНЧ составляет не менее 70 %, не менее 75 %, не менее 80 %, не менее 85 %, не менее 90 %, не менее 91 %, не менее 92 %, не менее 93 %, не менее 94 %, не менее 95 %, не менее 96 %, не менее 97 %, не менее 98 %, не менее 99 % или 100 %.

104. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 88-103, отличающаяся тем, что имеет общую концентрацию липидов около 10 мМ, около 20 мМ, около 30 мМ, около 40 мМ или около 50 мМ.

105. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 88-104, отличающаяся тем, что составлена при рН около 2,5, около 3, около 3,5, около 4, около 4,5, около 5, около 5,5 или около 6.

106. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 88-105, отличающаяся тем, что составлена для многократного введения.

107. Фармацевтическая композиция по п. 106, отличающаяся тем, что последующее введение проводят по меньшей мере через 3 дня, по меньшей мере через 5 дней, по меньшей мере через 7 дней, по меньшей мере через 9 дней, по меньшей мере через 11 дней, по меньшей мере через 14 дней или по меньшей мере через 21 день после первого введения.

108. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 88-107, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

109. Молекула рекомбинантной РНК, содержащая синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий онколитический вирус Коксаки, где вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21, выбранный из штамма Kuykendall, штамма EF и штамма KY.

110. Молекула рекомбинантной РНК по п. 109, отличающаяся тем, что вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21-KY, при этом штамм CVA21-KY содержит

полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 5.

111. Молекула рекомбинантной РНК по п. 109, отличающаяся тем, что вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21-EF, при этом штамм CVA21-EF содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 9.

112. Молекула рекомбинантной РНК по п. 109, отличающаяся тем, что вирус Коксаки содержит последовательность 5'-UTR (IRES), по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичную последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 6 или 10.

113. Молекула рекомбинантной РНК по п. 109, отличающаяся тем, что вирус Коксаки содержит последовательность P1, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичную последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 7 или 11.

114. Молекула рекомбинантной РНК по п. 109, отличающаяся тем, что вирус Коксаки содержит последовательность 3D, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичную последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 8 или 12.

115. Молекула рекомбинантной РНК по любому из пп. 109-114, отличающаяся тем, что синтетический РНК-вирусный геном не содержит полинуклеотидную последовательность, более чем на 95%, более чем на 90%, более чем на 85% или более чем на 80% идентичную последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1.

116. Молекула рекомбинантной РНК по любому из пп. 109-115, отличающаяся тем, что молекула рекомбинантной РНК не содержит РНК-вирусный геном, обладающий 100% идентичностью последовательности с вирусом Коксаки дикого типа.

117. Молекула рекомбинантной РНК, содержащая синтетический РНК-вирусный геном, кодирующий вирус долины Сенека (SVV), при этом SVV представляет собой химерный SVV, и при этом синтетический РНК-вирусный геном содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 68.

118. Молекула рекомбинантной РНК по любому из пп. 109-117, дополнительно содержащая кассету целевой последовательности микроРНК (miРНК) (miR-TS),

вставленную в полинуклеотидную последовательность, кодирующую онколитический вирус, при этом кассета miR-TS содержит одну или несколько целевых последовательностей микроРНК, и при этом экспрессия одной или нескольких соответствующих микроРНК в клетке ингибирует репликацию кодируемого вируса в клетке.

119. Молекула рекомбинантной РНК по п. 118, отличающаяся тем, что одна или несколько микроРНК выбраны из miR-124, miR-1, miR-143, miR-128, miR-219, miR-219a, miR-122, miR-204, miR-217, miR-137, miR-142 и miR-126.

120. Молекула рекомбинантной РНК по п. 119, отличающаяся тем, что кассета miR-TS содержит:

- a. одну или несколько копий целевой последовательности miR-124, одну или несколько копий целевой последовательности miR-1 и одну или несколько копий целевой последовательности miR-143;
- b. одну или несколько копий целевой последовательности miR-128, одну или несколько копий целевой последовательности miR-219a и одну или несколько копий целевой последовательности miR-122;
- c. одну или несколько копий целевой последовательности miR-128, одну или несколько копий целевой последовательности miR-204 и одну или несколько копий целевой последовательности miR-219; или
- d. одну или несколько копий целевой последовательности miR-217, одну или несколько копий целевой последовательности miR-137 и одну или несколько копий целевой последовательности miR-126.

121. Молекула рекомбинантной РНК по любому из пп. 109-120, отличающаяся тем, что способна продуцировать репликационно-компетентный онколитический вирус при введении в клетку невирусным средством доставки.

122. Молекула рекомбинантной РНК по п. 121, отличающаяся тем, что клетка представляет собой клетку млекопитающего.

123. Молекула рекомбинантной РНК по п. 122, отличающаяся тем, что клетка представляет собой клетку млекопитающего, присутствующую в субъекте-млекопитающем.

124. Молекула рекомбинантной РНК по любому из пп. 118-123, отличающаяся тем, что одна или более кассет miR-TS встроена в 5'-нетранслируемую область (UTR) или 3'-UTR одного или более вирусных генов.

125. Молекула рекомбинантной РНК по любому из пп. 118-123, отличающаяся тем, что одна или более кассет miR-TS включены в открытую рамку считывания (ORF), 5'-

нетранслируемую область (UTR) или 3'-UTR одного или больше вирусных генов.

126. Молекула рекомбинантной РНК по любому из пп. 109-125, отличающаяся тем, что молекула рекомбинантной РНК вставлена в вектор нуклеиновой кислоты.

127. Молекула рекомбинантной РНК по п. 126, отличающаяся тем, что вектор нуклеиновой кислоты представляет собой репликон.

128. Молекула рекомбинантной РНК по любому из пп. 109-127, отличающаяся тем, что синтетический РНК-вирусный геном дополнительно содержит гетерологичный полинуклеотид, кодирующий экзогенный белок полезной нагрузки.

129. Молекула рекомбинантной РНК по п. 128, отличающаяся тем, что экзогенный белок полезной нагрузки содержит или состоит из домена 4HB MLKL, N-концевого фрагмента гасдермина D, N-концевого фрагмента гасдермина E, домена Box B HMGB1, SMAC/Diablo, мелиттина, оксидазы L-аминокислот (LAAO), дезинтегрин, TRAIL (TNFSF10), нитроредуктазы, белка FAST реовируса, лептина/FOSL2, α -1,3-галактозилтрансферазы или аденозиндезаминазы 2 (ADA2).

130. ЛНЧ по п. 129, отличающаяся тем, что нитроредуктаза представляет собой NfsB или NfsA.

131. ЛНЧ по п. 129, отличающаяся тем, что белок FAST реовируса представляет собой ARV p14, BRV p15 или гибрид p14-p15.

132. Молекула рекомбинантной РНК по п. 128, отличающаяся тем, что экзогенный белок полезной нагрузки представляет собой флуоресцентный белок, белок-фермент, цитокин, хемокин, антигенсвязывающую молекулу, способную связываться с рецептором клеточной поверхности, или лиганд, способный связываться с рецептором клеточной поверхности.

133. Молекула рекомбинантной РНК по п. 132, отличающаяся тем, что

а) цитокин выбран из GM-CSF, IFN γ , IL-2, IL-7, IL-12, IL-18, IL-21 и IL-36 γ ;

б) лиганд для рецептора клеточной поверхности представляет собой лиганд Flt3 или TNFSF14;

с) хемокин выбран из CXCL10, CCL4, CCL21 и CCL5.

134. Молекула рекомбинантной РНК по п. 132, отличающаяся тем, что антигенсвязывающая молекула способна связываться с рецептором иммунной контрольной точки и ингибировать его.

135. Молекула рекомбинантной РНК по п. 134, отличающаяся тем, что рецептор иммунной контрольной точки представляет собой PD-1.

136. Молекула рекомбинантной РНК по п. 132, отличающаяся тем, что антигенсвязывающая молекула способна связываться с опухолевым антигеном.

137. Молекула рекомбинантной РНК по п. 136, отличающаяся тем, что антигенсвязывающая молекула представляет собой молекулу привлекающего Т-клетки биспецифического активатора (BiTE), или молекулу привлекающего Т-клетки биспецифического «легкого» активатора (LiTE).

138. Молекула рекомбинантной РНК по п. 136 или 137, отличающаяся тем, что опухолевый антиген представляет собой вирусный антиген, выбранный из HBV-core (внутренний антиген гепатита В), HBV-pol, HbS-Ag, HPV E6, HPV E7, большого Т-антигена полиомавируса клеток Меркеля и антигена EBNA2 или BZLF1 вируса Эпштейна-Барра.

139. Молекула рекомбинантной РНК по п. 136 или 137, отличающаяся тем, что опухолевый антиген представляет собой DLL3 или EpCAM.

140. Рекомбинантная матрица ДНК, содержащая от 5' к 3' последовательность промотора, 5' соединительную последовательность расщепления, полинуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу РНК, содержащую синтетический РНК-вирусный геном, хвост поли-А и 3' соединительную последовательность расщепления.

141. Молекула рекомбинантной ДНК, содержащая от 5' к 3' последовательность промотора, 5' соединительную последовательность расщепления, полинуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу РНК, содержащую синтетический РНК-вирусный геном, хвост поли-А и 3' соединительную последовательность расщепления, при этом молекула РНК выбрана из любого из пп. 109-139.

142. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 140 или 141, содержащая лидерную последовательность между последовательностью промотора и 5' соединительной последовательностью расщепления.

143. Молекула рекомбинантной ДНК, содержащая от 5' к 3' последовательность промотора, 5' соединительную последовательность расщепления, полинуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу рекомбинантной РНК, содержащую синтетический РНК-вирусный геном, хвост поли-А и 3' соединительную последовательность расщепления.

144. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 142 или 143, отличающаяся тем, что лидерная последовательность имеет длину менее 100 п.н.

145. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из п. 140-144, отличающаяся тем, что последовательность промотора представляет собой последовательность промотора T7.

146. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из пп. 140-145, отличающаяся тем, что хвост поли-А имеет длину около 50-90 п.н. или около 65-75 п.н.

147. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 145, отличающаяся тем, что хвост поли-А имеет длину около 70 п.н.

148. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из пп. 140-145, отличающаяся тем, что хвост поли-А имеет длину около 10-50 п.н. или 25-35 п.н.

149. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из пп. 140-148, отличающаяся тем, что 5' соединительная последовательность расщепления содержит последовательность рибозима или состоит из нее, и 3' соединительная последовательность расщепления содержит последовательность рибозима или состоит из нее.

150. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 149, отличающаяся тем, что 5' последовательность рибозима представляет собой последовательность рибозима типа «головка молотка» (hammerhead ribozyme), а 3' последовательность рибозима представляет собой последовательность рибозима вируса гепатита дельта.

151. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из пп. 140-148, отличающаяся тем, что 5' соединительная последовательность расщепления содержит последовательность связывания праймера РНКазы Н или состоит из нее, а 3' соединительная последовательность расщепления содержит последовательность распознавания ферментом рестрикции или состоит из нее.

152. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из пп. 140-148, отличающаяся тем, что 5' соединительная последовательность расщепления содержит последовательность рибозима или состоит из нее, и 3' соединительная последовательность расщепления содержит последовательность распознавания ферментом рестрикции или состоит из нее.

153. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 152, отличающаяся тем, что 5' последовательность рибозима содержит или состоит из последовательности рибозима типа «головка молотка», последовательности рибозима типа «пистолет» (Pistol) или модифицированной последовательности рибозима типа «пистолет».

154. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из пп. 140-153, отличающаяся тем, что 3' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности распознавания ферментом рестрикции типа IIS.

155. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из пп. 140-154, отличающаяся тем, что молекула РНК кодирует РНК-вирусный геном вируса Коксаки (CVA).

156. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 155, отличающаяся тем, что вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21.

157. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из пп. 155-156, отличающаяся

тем, что лидерная последовательностью содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70 %, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 14 или 15.

158. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из пп. 155-157, отличающаяся тем, что 5' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности рибозима типа «пистолет», по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 % или на 100 % идентичной последовательности с SEQ ID NO: 18, и при этом мотив P2 5' последовательности рибозима имеет полинуклеотидную последовательность «TTTT».

159. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из пп. 155-157, отличающаяся тем, что 5' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности рибозима типа «пистолет», по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 % или на 100 % идентичной последовательности с SEQ ID NO: 17, и при этом мотив P2 5' последовательности рибозима имеет полинуклеотидную последовательность «TTTA».

160. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из пп. 155-159, отличающаяся тем, что 3' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности распознавания BsmBI.

161. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из пп. 155-159, отличающаяся тем, что 3' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности распознавания BsaI.

162. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 156, отличающаяся тем, что последовательность промотора представляет собой последовательность промотора T7, при этом лидерная последовательность состоит из полинуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 15, при этом 5' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности рибозима типа «пистолет» в соответствии с SEQ ID NO: 18, при этом хвост поли-А имеет длину около 70 п.н., и при этом 3' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности распознавания BsmBI.

163. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 156, отличающаяся тем, что последовательность промотора представляет собой последовательность промотора T7, при этом лидерная последовательность состоит из полинуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 15, при этом 5' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности рибозима типа «пистолет» в

соответствии с SEQ ID NO: 18, при этом хвост поли-А имеет длину около 70 п.н., и при этом 3' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности распознавания BsaI.

164. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из пп. 140-154, отличающаяся тем, что молекула РНК кодирует РНК-вирусный геном вируса долины Сенека (SVV).

165. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 164, отличающаяся тем, что лидерная последовательностью содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70 %, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичной любой последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 53-63.

166. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 164, отличающаяся тем, что лидерная последовательностью содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70 %, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 58.

167. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из пп. 164-166, отличающаяся тем, что 5' последовательность рибозима представляет собой последовательность рибозима типа «пистолет», по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или на 100 % идентичную последовательности SEQ ID NO: 64 или 65, и при этом мотив P2 5' последовательности рибозима имеет полинуклеотидную последовательность «ТCAA» или «ТТАА».

168. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из пп. 164-167, отличающаяся тем, что РНК-вирусный геном содержит последовательность 5'-UTR (IRES), по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную нуклеиновым кислотам 1–670 последовательности SEQ ID NO: 68.

169. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из пп. 164-168, отличающаяся тем, что 3' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности распознавания SapI.

170. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 164, отличающаяся тем, что последовательность промотора представляет собой последовательность промотора T7, при этом лидерная последовательность состоит из полинуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 53, при этом 5' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности рибозима типа «пистолет» в соответствии с SEQ ID NO: 64, при этом хвост поли-А имеет длину около 70 п.н., и при

этом 3' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности распознавания SapI.

171. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 164, отличающаяся тем, что последовательность промотора представляет собой последовательность промотора T7, при этом лидерная последовательность состоит из полинуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 58, при этом 5' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности рибозима типа «пистолет» в соответствии с SEQ ID NO: 64, при этом хвост поли-А имеет длину около 70 п.н., и при этом 3' соединительная последовательность расщепления содержит или состоит из последовательности распознавания SapI.

172. Молекула рекомбинантной ДНК по любому из пп. 140-171, отличающаяся тем, что молекула рекомбинантной ДНК не содержит дополнительной нуклеиновой кислоты в области, охватывающей последовательность промотора и 3' соединительную последовательность расщепления.

173. Способ получения молекулы рекомбинантной РНК, включающий транскрипцию *in vitro* молекулы ДНК по любому из пп. 140-172 и очистку полученной молекулы рекомбинантной РНК.

174. Способ по п. 173, отличающийся тем, что молекула рекомбинантной РНК содержит 5'- и 3'-концы, которые являются нативными для онколитического вируса, кодируемого синтетическим РНК-вирусным геномом.

175. Композиция, содержащая эффективное количество молекулы рекомбинантной РНК по любому из пп. 109-139, и носитель, подходящий для введения субъекту-млекопитающему.

176. Частица, содержащая молекулу рекомбинантной РНК по любому из пп. 109-139.

177. Частица по п. 176, отличающаяся тем, что является биоразлагаемой.

178. Частица по п. 177, отличающаяся тем, что выбрана из группы, состоящей из наночастицы, экзосомы, липосомы и липоплекса.

179. Частица по п. 178, отличающаяся тем, что экзосома представляет собой модифицированную экзосому, полученную из интактной экзосомы или пустой экзосомы.

180. Фармацевтическая композиция, содержащая множество частиц по любому из пп. 176-179.

181. Фармацевтическая композиция по п. 180, отличающаяся тем, что множество частиц имеет средний размер от около 50 нм до около 500 нм, от около 150 нм до около 500 нм, от около 200 нм до около 500 нм, от около 300 нм до около 500 нм, от около 350

нм до около 500 нм, от около 400 нм до около 500 нм, от около 425 нм до около 500 нм, от около 450 нм до около 500 нм или от около 475 нм до около 500 нм.

182. Фармацевтическая композиция по п. 180, отличающаяся тем, что множество частиц имеют средний размер от около 50 нм до около 120 нм.

183. Фармацевтическая композиция по п. 180, отличающаяся тем, что множество частиц имеют средний размер около 50 нм, 60 нм, 70 нм, 80 нм, 90 нм, 100 нм, 110 нм или около 120 нм.

184. Фармацевтическая композиция по п. 180, отличающаяся тем, что множество частиц имеют средний размер около 100 нм.

185. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 180-184, отличающаяся тем, что множество частиц имеют средний дзета-потенциал от около 40 мВ до около -40 мВ, от около 20 мВ до около -20 мВ, от около 10 мВ до около -10 мВ, от около 5 мВ до около -5 мВ или от около 20 мВ до около -40 мВ.

186. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 180-184, отличающаяся тем, что множество частиц имеют средний дзета-потенциал менее около 5 мВ, менее около 0 мВ, менее около -5 мВ, менее около -10 мВ, менее около -20 мВ, менее около -30 мВ, менее около -35 мВ или менее около -40 мВ.

187. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 180-186, отличающаяся тем, что множество частиц имеют средний дзета-потенциал от около -50 мВ до около -20 мВ, от около -40 мВ до около -20 мВ, от около -30 мВ до около -10 мВ, от около -20 мВ до около 0 мВ, от около -15 мВ до около 5 мВ или от около -10 мВ до около 10 мВ.

188. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 180-186, отличающаяся тем, что средний дзета-потенциал множества частиц составляет около -30 мВ, около -31 мВ, около -32 мВ, около -33 мВ, около -34 мВ, около -35 мВ, около -36 мВ, около -37 мВ, около -38 мВ, около -39 мВ или около -40 мВ.

189. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 180-188, отличающаяся тем, что доставка композиции субъекту доставляет инкапсулированную молекулу рекомбинантной РНК в клетку-мишень, при этом инкапсулированная молекула рекомбинантной РНК продуцирует инфекционный вирус, способный лизировать клетку-мишень.

190. Неорганическая частица, содержащая молекулу рекомбинантной РНК по любому из пп. 109-139.

191. Неорганическая частица по п. 190, отличающаяся тем, что неорганическая частица выбрана из группы, состоящей из золотой наночастицы (ЗНЧ), золотого наностержня (ЗНС), магнитной наночастицы (МНЧ), магнитной нанотрубки (МНТ),

углеродного нанорога (УНР), углеродного фуллерена, углеродной нанотрубки (УНТ), наночастицы фосфата кальция (НЧФК), наночастицы мезопористого кремнезема (НЧМК), нанотрубки кремнезема (НТК) или звездообразной полый наночастицы кремнезема (ЗПНЧ).

192. Композиция, содержащая неорганическую частицу по любому из пп. 190-191, отличающаяся тем, что средний диаметр частиц составляет менее около 500 нм, составляет от около 50 нм до 500 нм, составляет от около 250 нм до около 500 нм или составляет около 350 нм.

193. ЛНЧ по любому из пп. 1-87, частица по любому из пп. 176-179 или неорганическая частица по любому из пп. 190-191, дополнительно содержащая вторую молекулу рекомбинантной РНК, кодирующую молекулу полезной нагрузки.

194. ЛНЧ, частица или неорганическая частица по п. 193, отличающаяся тем, что вторая молекула рекомбинантной РНК представляет собой репликон.

195. Фармацевтическая композиция, содержащая ЛНЧ по любому из пп. 1-87, частицу по любому из пп. 176-179 или неорганическую частицу по любому из пп. 190-191, отличающаяся тем, что композиция составлена для внутривенной и/или внутриопухолевой доставки.

196. Фармацевтическая композиция по п. 195, отличающаяся тем, что клетка-мишень ЛНЧ, частицы или неорганической частицы представляет собой раковую клетку.

197. Способ уничтожения раковой клетки, включающий воздействие на раковую клетку частицей по любому из пп. 1-87, 176-179 или 190-191, молекулой рекомбинантной РНК по любому из пп. 109-139, или их композициями, в условиях, достаточных для внутриклеточной доставки частицы в указанную раковую клетку, при этом репликационно-компетентный вирус, продуцируемый инкапсулированным полинуклеотидом, приводит к уничтожению раковой клетки.

198. Способ по п. 197, отличающийся тем, что репликационно-компетентный вирус не продуцируется в нераковых клетках.

199. Способ по п. 197 или 198, отличающийся тем, что его осуществляют *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*.

200. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту, страдающему раком, эффективного количества частицы по любому из пп. 1-87, 176-179 или 190-191, молекулы рекомбинантной РНК по любому из пп. 109-139, или их композиций.

201. Способ по п. 200, отличающийся тем, что частицу или ее композицию вводят внутривенно, интраназально, внутриопухолёво, внутрибрюшинно или в виде

ингаляции.

202. Способ по п. 200, отличающийся тем, что частицу или ее композицию вводят интратрахеально и/или внутривенно.

203. Способ по любому из пп. 200-202, отличающийся тем, что частицу или ее композицию вводят субъекту многократно.

204. Способ по любому из пп. 200-203, отличающийся тем, что субъектом является мышь, крыса, кролик, кошка, собака, лошадь, примат, не являющийся человеком, или человек.

205. Способ по любому из пп. 200-204, отличающийся тем, что рак представляет собой рак легкого, рак молочной железы, рак толстой кишки или рак поджелудочной железы, при этом синтетический РНК-вирусный геном содержит полинуклеотидную последовательность, полученную из штамма KY.

206. Способ по любому из пп. 200-204, отличающийся тем, что рак представляет собой рак мочевого пузыря, почечно-клеточную карциному, рак яичников, рак желудка или рак печени, при этом синтетический РНК-вирусный геном содержит полинуклеотидную последовательность, полученную из штамма EF.

207. Способ по любому из пп. 197-204, отличающийся тем, что рак выбран из рака легких, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака предстательной железы, рака яичек, колоректального рака, рака толстой кишки, рака поджелудочной железы, рака печени, почечно-клеточной карциномы, рака желудка, рака головы и шеи, рака щитовидной железы, злокачественной глиомы, глиобластомы, меланомы, В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза, множественной миеломы, моноклональной гаммапатии неустановленной значимости (MGUS), карциномы из клеток Меркеля, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), саркомы, нейробластомы, нейроэндокринного рака, рабдомиосаркомы, медуллобластомы, рака мочевого пузыря и лимфомы маргинальной зоны (MZL).

208. Способ по любому из пп. 197-204, отличающийся тем, что рак выбран из групп, состоящей из рака легкого, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, почечно-клеточной саркомы, рака яичников, рака желудка и рака печени.

209. Способ по любому из пп. 197-204, отличающийся тем, что рак представляет собой почечно-клеточную карциному, рак легкого или рак печени.

210. Способ по п. 205, 207 или 208, отличающийся тем, что рак легкого представляет собой мелкоклеточный рак легкого или немелкоклеточный рак легкого (например, плоскоклеточный рак легкого или аденокарциному легкого).

211. Способ по любому из пп. 206, 207 и 208, отличающийся тем, что рак печени представляет собой гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК) (например, ГЦК, ассоциированную с вирусом гепатита В).

212. Способ по п. 207, отличающийся тем, что рак предстательной железы представляет собой возникший после начала лечения нейроэндокринный рак предстательной железы.

213. Способ по любому из пп. 197-204, отличающийся тем, что рак представляет собой рак легкого, рак печени, рак предстательной железы (например, CRPC-NE), рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, рак желудка, рак молочной железы, нейробластому, почечно-клеточную карциному, рак яичников, рабдомиосаркому, медуллобластому, нейроэндокринный рак, карциному из клеток Меркеля или меланому.

214. Способ по любому из пп. 197-204, отличающийся тем, что рак представляет собой мелкоклеточный рак легкого (МРЛ) или нейробластому.

215. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества вируса CVA21-EF.

216. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества вируса CVA21-KY.

217. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества вируса CVA21-Kuykendall.

218. Способ по любому из пп. 215-217, отличающийся тем, что вирус вводят внутриопухолево и/или внутривенно.

219. Способ по любому из пп. 197-218, дополнительно включающий введение субъекту ингибитора иммунной контрольной точки.

220. Способ по п. 219, отличающийся тем, что ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор PD-1.

221. Способ по любому из пп. 197-218, дополнительно включающий введение сконструированной иммунной клетки, содержащей сконструированный антигенный рецептор.

222. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества онколитического вируса Коксаки, при этом вирус Коксаки представляет собой штамм CVA21, или полинуклеотида, кодирующего CVA21, при этом рак классифицируется как чувствительный к инфекции CVA21 на основе экспрессии ICAM-1 и/или процентного содержания ICAM-1-положительных раковых клеток.

223. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий:

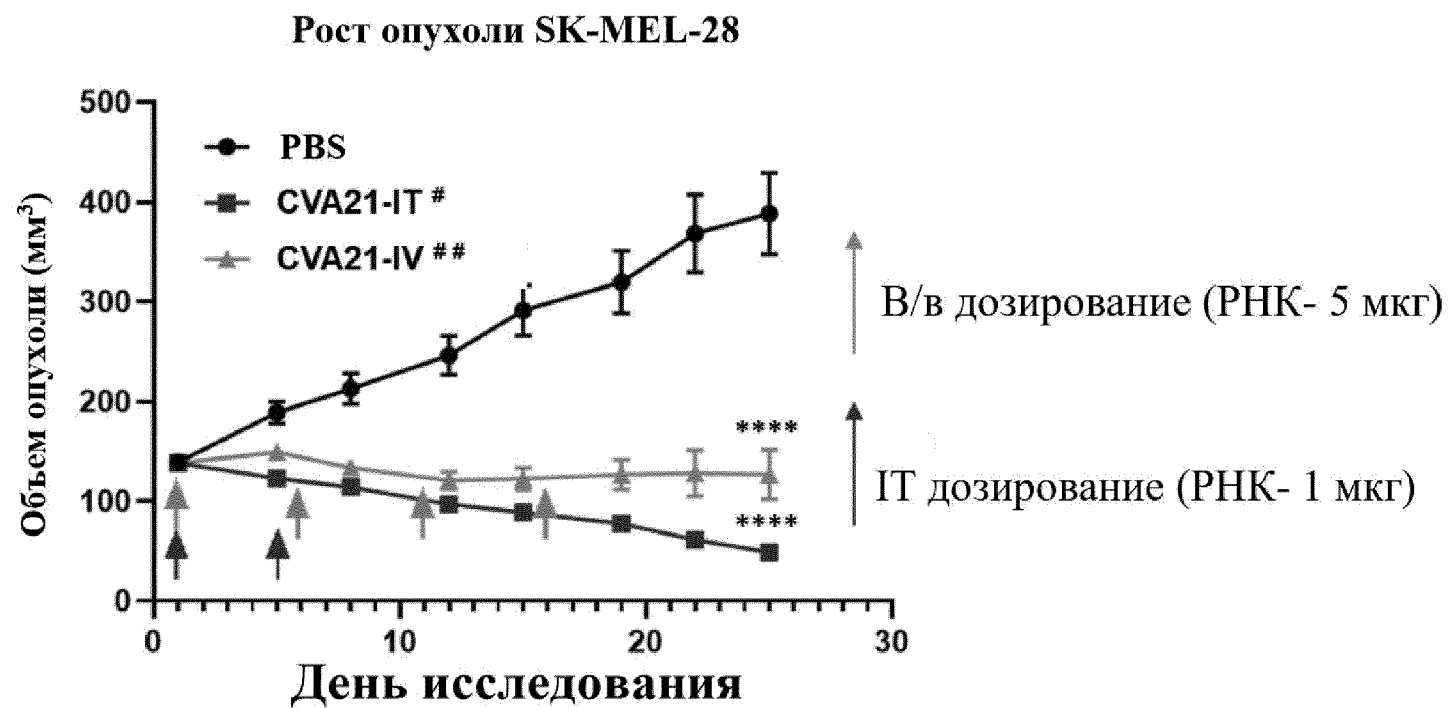
- (а) определение уровня экспрессии ICAM1 и/или процентного содержания ICAM-1-положительных раковых клеток при раке;
- (b) классификацию рака как чувствительного к инфекции вирусом Коксаки 21 (CVA21) на основе экспрессии ICAM-1 и/или процентного содержания ICAM-1-положительных раковых клеток, определенных на стадии (а); и
- (с) введение субъекту терапевтически эффективного количества CVA21 или полинуклеотида, кодирующего CVA21, если рак классифицируется как чувствительный к инфекции CVA21 на стадии (b).

224. Способ выбора субъекта, страдающего раком, для лечения вирусом Коксаки 21 (CVA21) или полинуклеотидом, кодирующим CVA21, включающий:

- (а) определение уровня экспрессии ICAM-1 и/или процентного содержания ICAM-1-положительных раковых клеток при раке;
- (b) классификацию рака как чувствительного к инфекции вирусом CVA21 на основе уровня экспрессии ICAM-1 и/или процентного содержания ICAM1-положительных раковых клеток, как определено на стадии (а);
- (с) выбор субъекта для лечения CVA21 или полинуклеотидом, кодирующим CVA21, если рак классифицируется как чувствительный к инфекции CVA21 на стадии (b); и
- (d) введение CVA21 или полинуклеотида, кодирующего CVA21, выбранным субъектам

225. Способ по любому из пп. 222-224, отличающийся тем, что штамм CVA21 представляет собой CVA21-KY.

ФИГ. 1

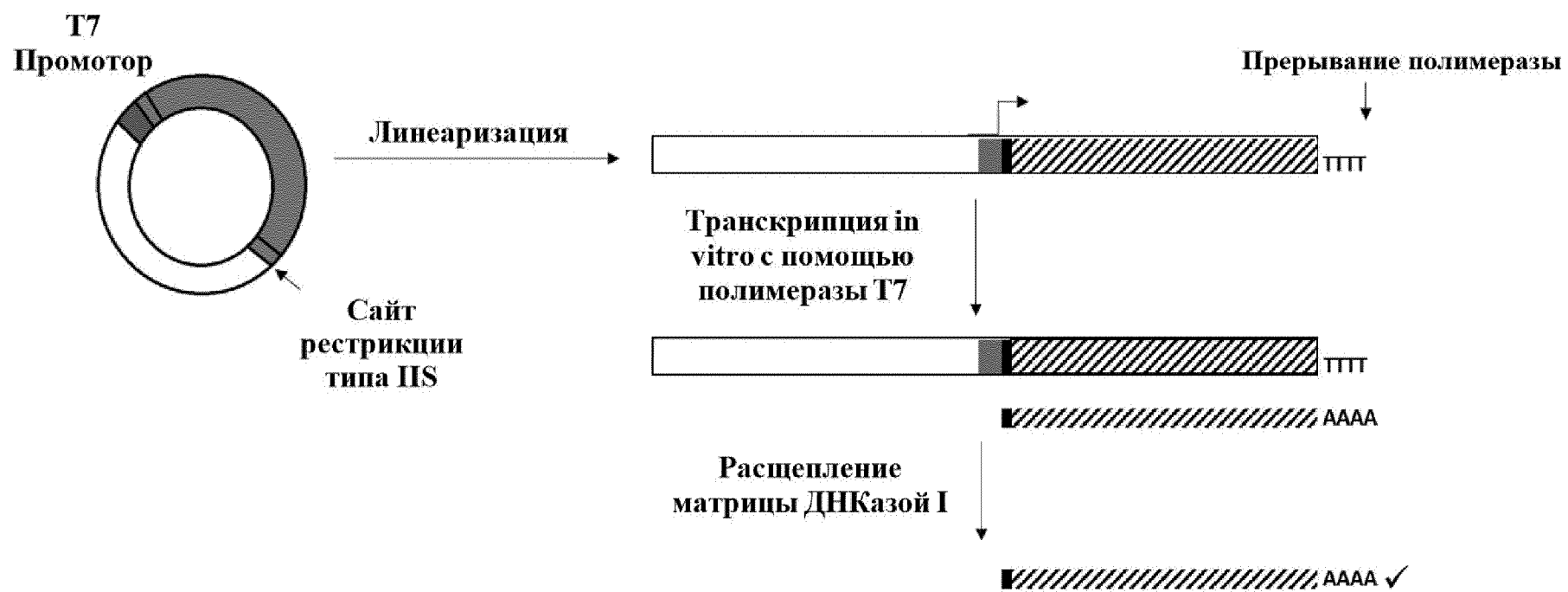


**** двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, критерий Тьюки $p < 0,0001$

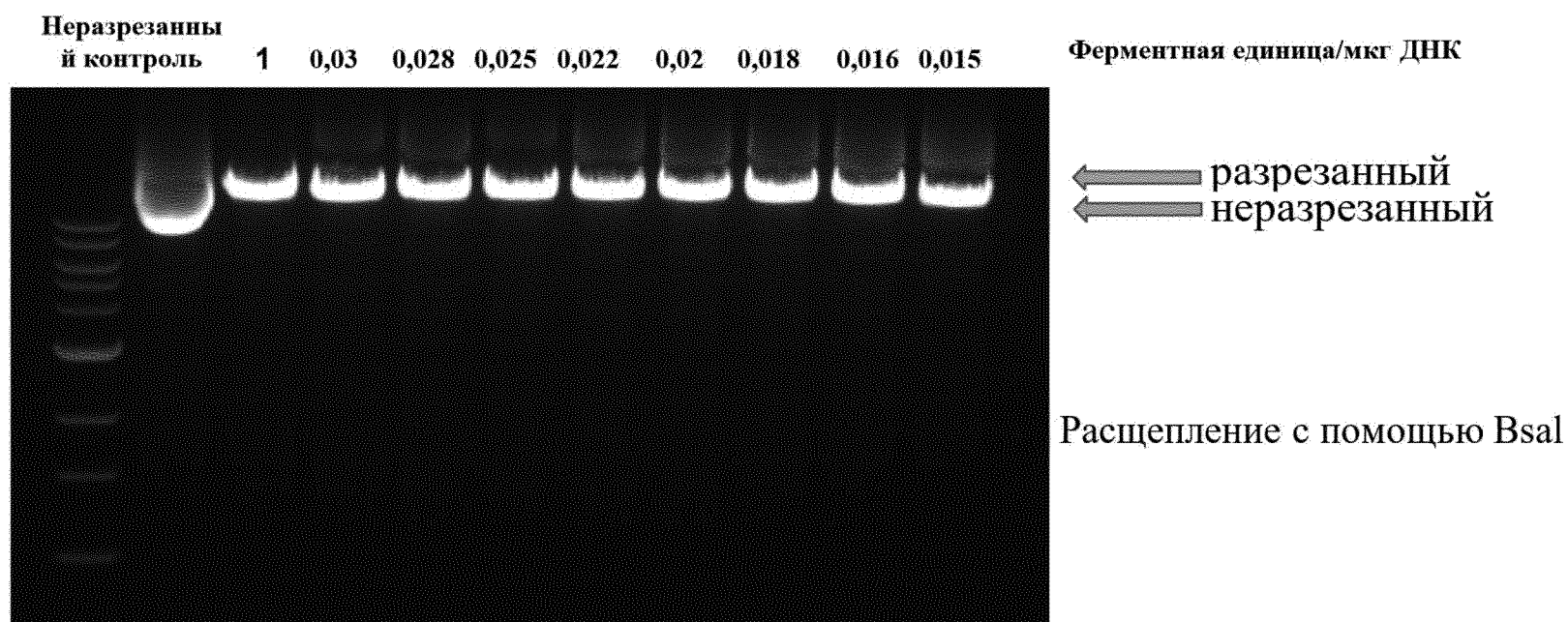
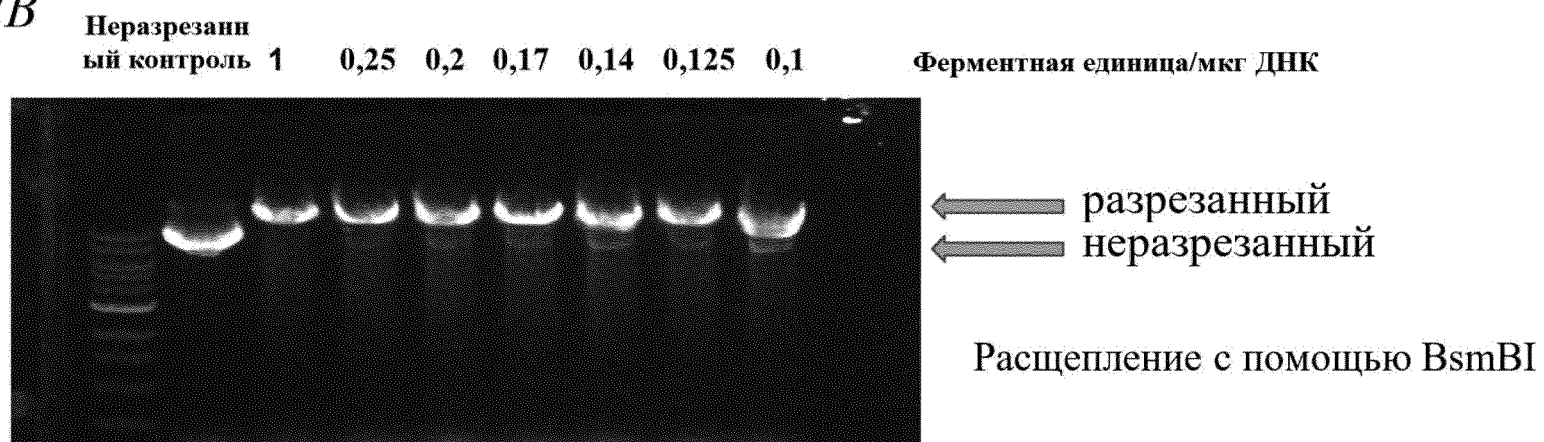
РНК, кодирующая CVA21, в составе с липофектаминоном (положительный контроль)

Состав ЛНЧ с CVA21 № 70032-6.C

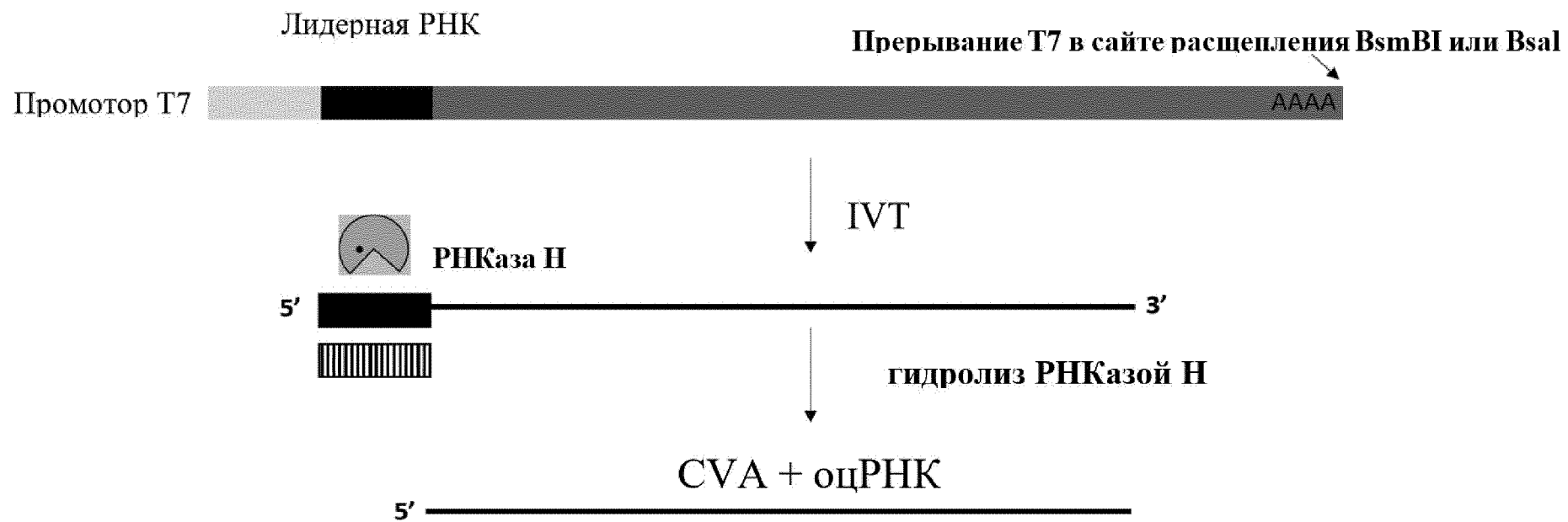
ФИГ. 2А



ФИГ. 2В



ФИГ. 3

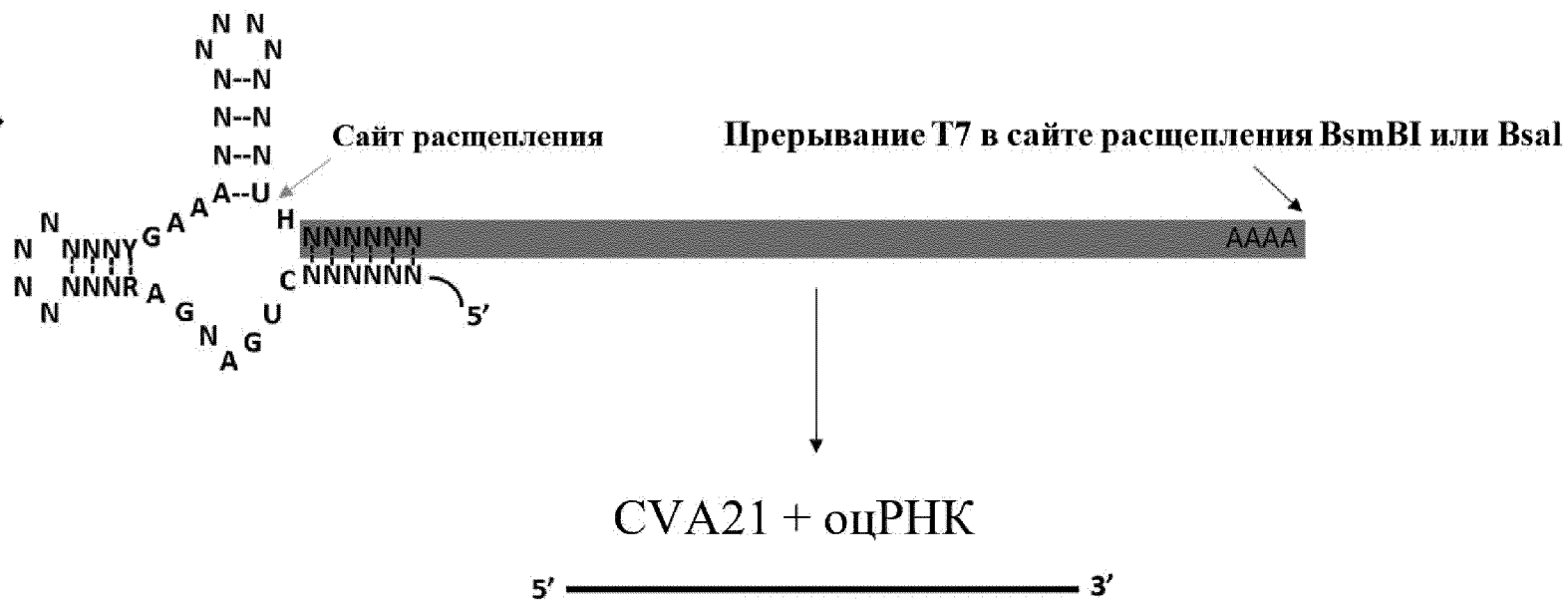


ФИГ. 4

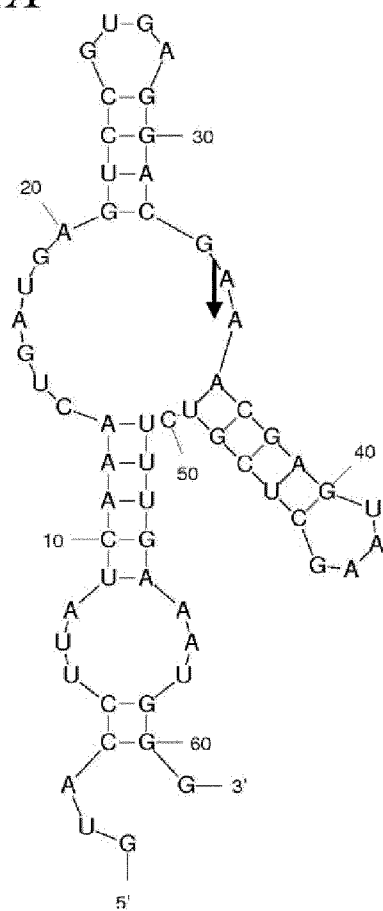
Рибозим типа
«ГОЛОВКИ МОЛОТКА»
(HHR)

Или

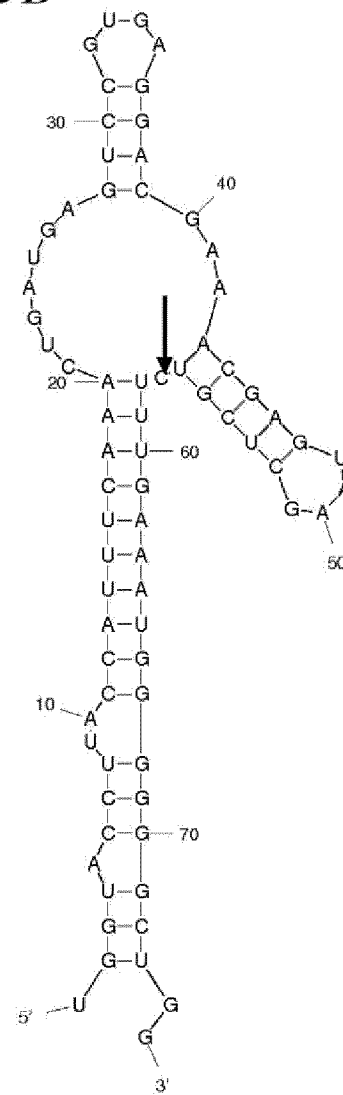
Рибозим типа
«пистолет»
(PR)



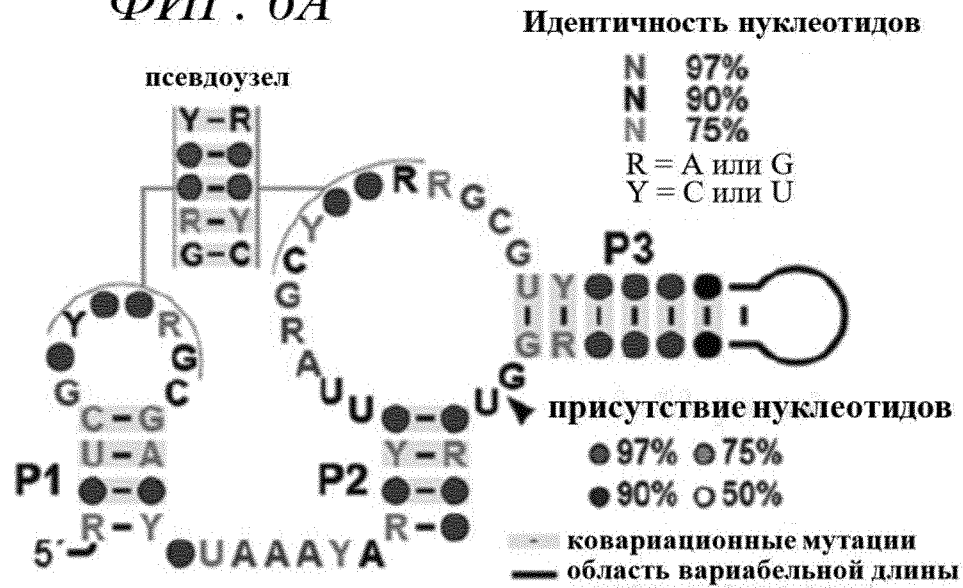
ФИГ. 5А



ФИГ. 5В

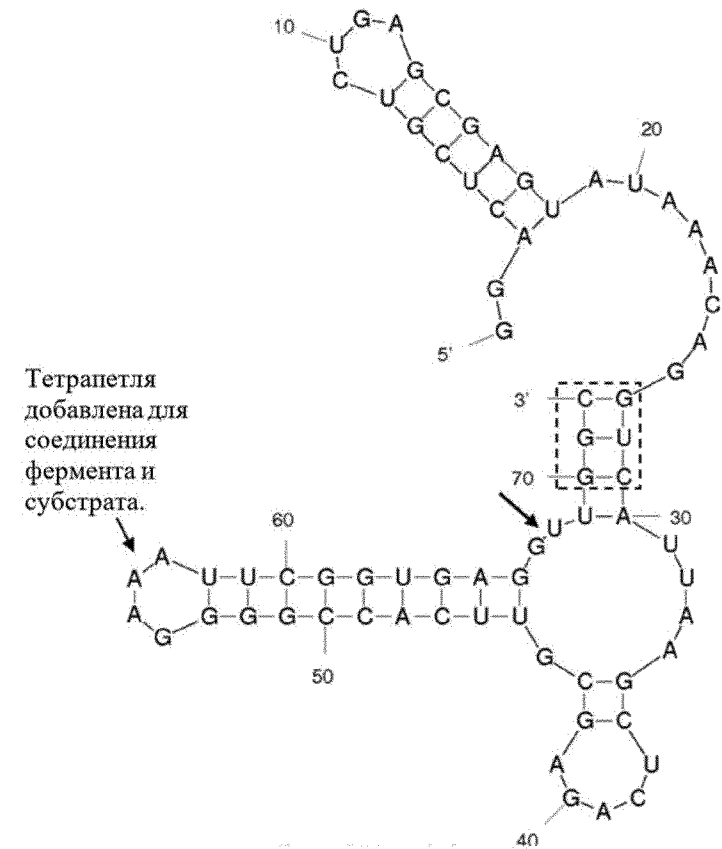


ФИГ. 6А



PMID: 22454536

ФИГ. 6В



ФИГ. 6С

DSM36 (SEQ ID NO:24)
M1 (SEQ ID NO:23)
«Пистолет» (SEQ ID NO:16)
PP-G (SEQ ID NO:19)
PP (SEQ ID NO:17)
PP-T (SEQ ID NO:18)

DSM36 (SEQ ID NO:24)
M1 (SEQ ID NO:23)
«Пистолет» (SEQ ID NO:16)
PP-G (SEQ ID NO:19)
PP (SEQ ID NO:17)
PP-T (SEQ ID NO:18)

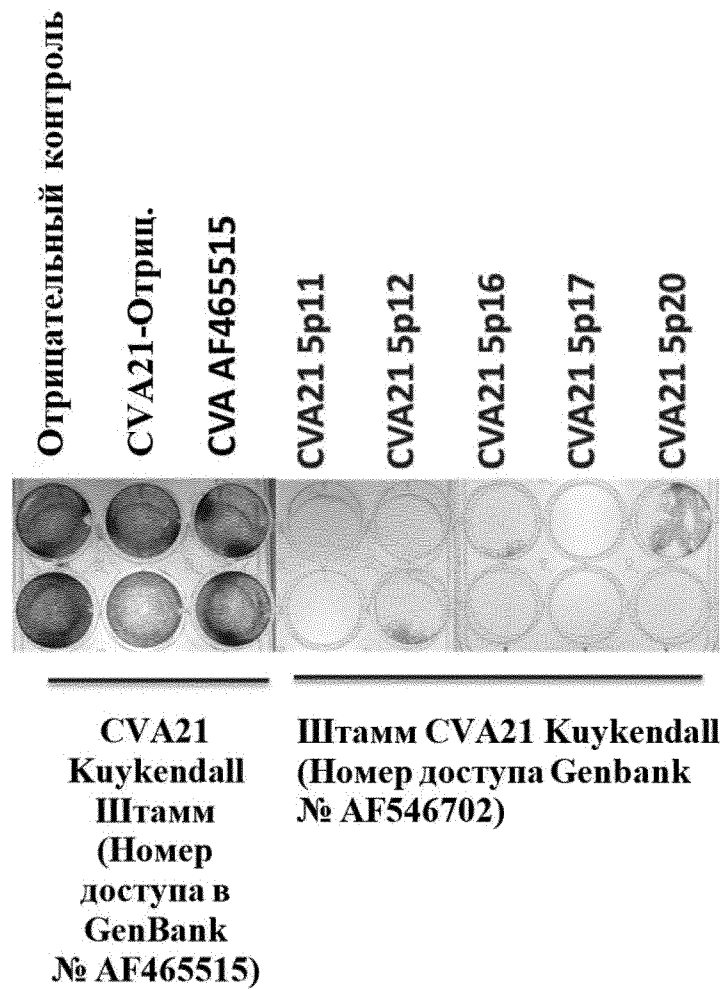
Мотив Р2



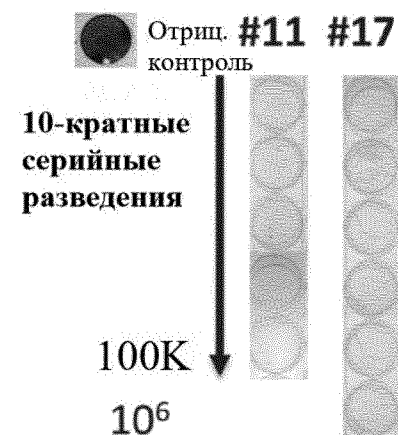
AAACTCGTCTGAGCGAGTATAAACAGGTCATTAAGCTCAGAGCGTTCACCGGGATCATTC 60
AAACTCGTCTGAGCGAGTATAAACAGGTCATTAAGCTCAGAGCGTTCACCGGGATCATGC 60
GGACTCGTCTGAGCGAGTATAAACAGGTCATTAAGCTCAGAGCGTTCACCGGGGAAATTC 60
GGACTCGTCTGAGCGAGTATAAACAGTTGTTTAAGCTCAGAGCGTTCACCGGGGAAATTC 60
GGACTCGTCTGAGCGAGTATAAACAGTTTATTAAGCTCAGAGCGTTCACCGGGGAAATTC 60
GGACTCGTCTGAGCGAGTATAAACAGTTTTTTAAGCTCAGAGCGTTCACCGGGGAAATTC 60
***** * ***** ** *

GGTGAGG 67
GGTGAGG 67
GGTGAGG 67
GGTGAGG 67
GGTGAGG 67
GGTGAGG 67

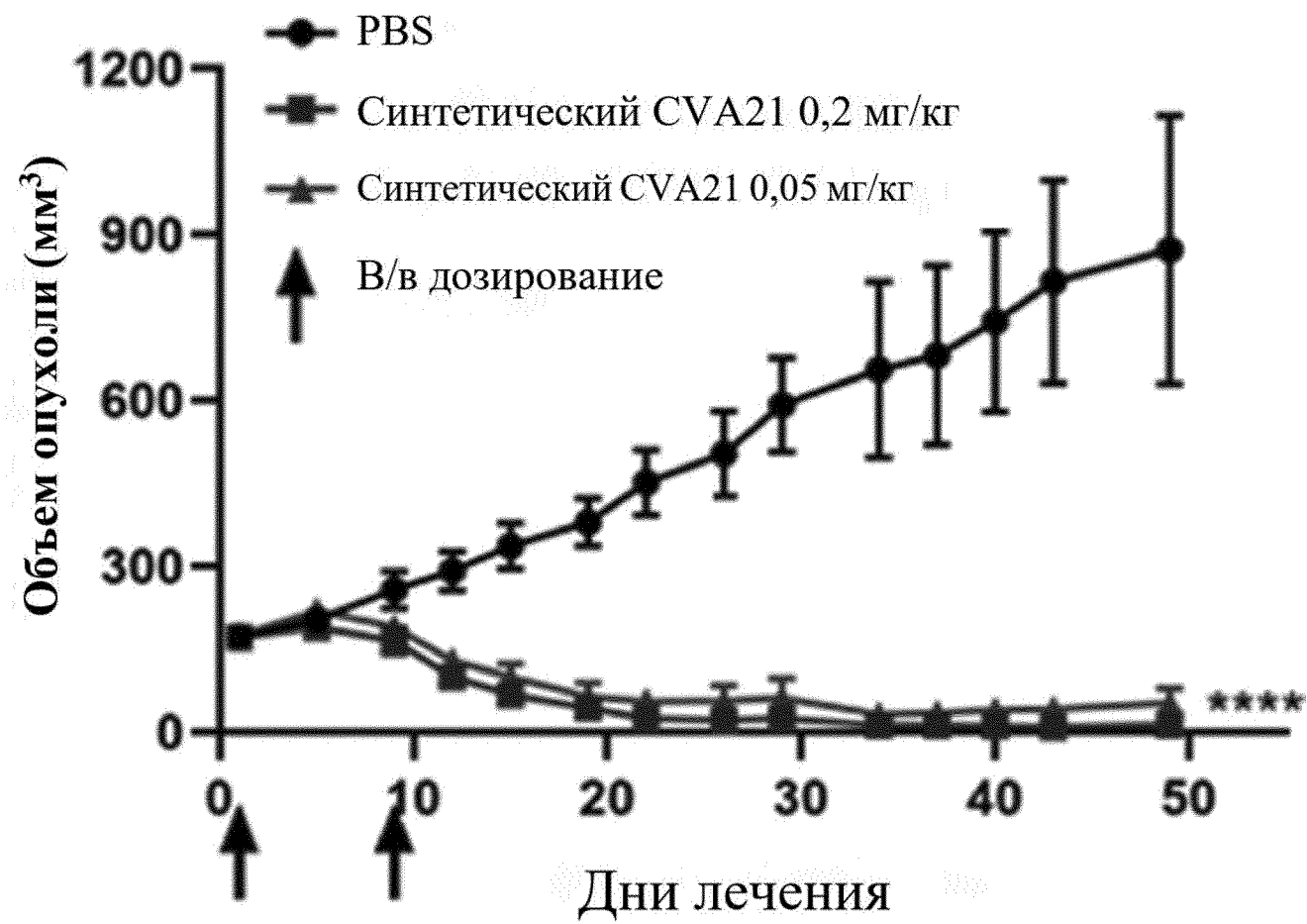
ФИГ. 7A



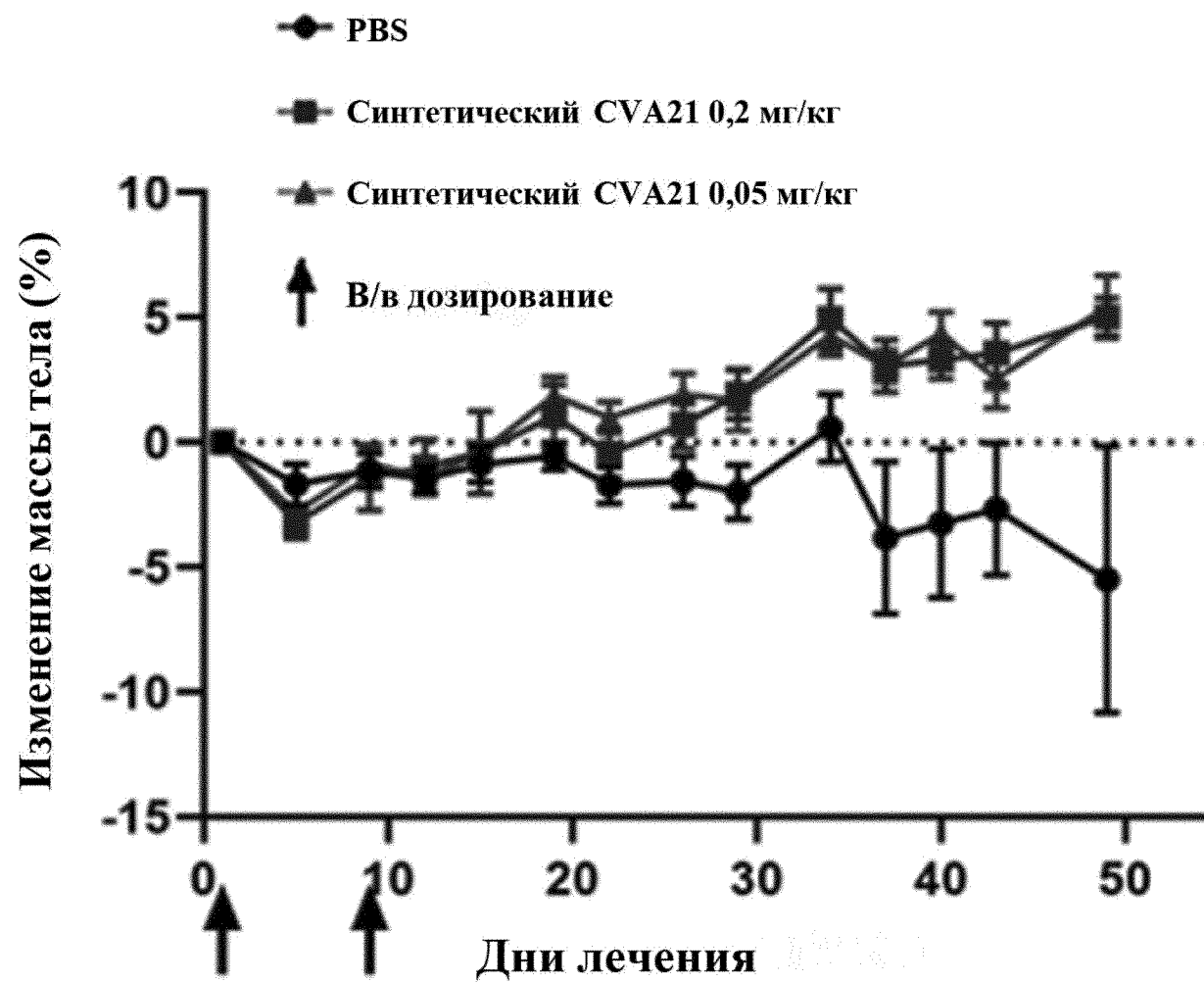
ФИГ. 7B



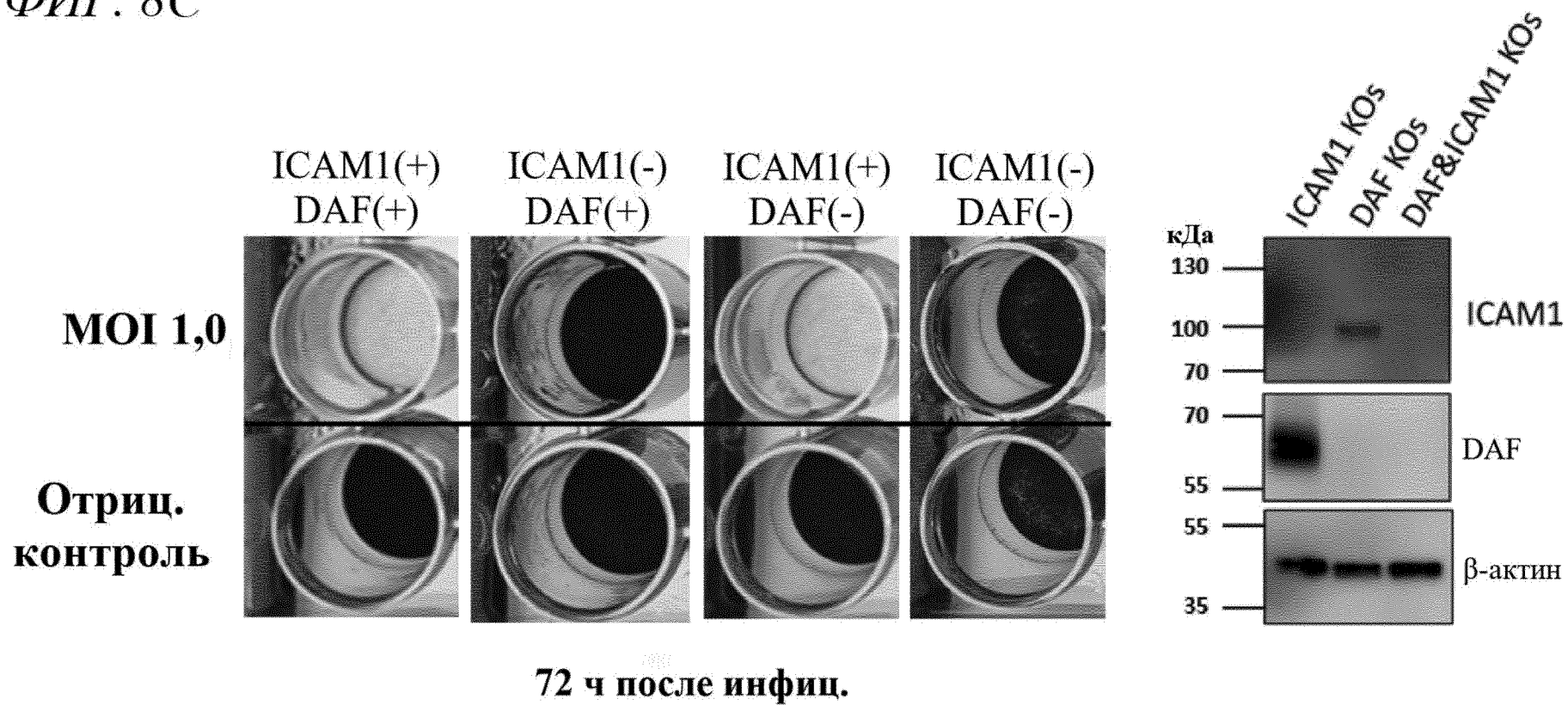
ФИГ. 8А



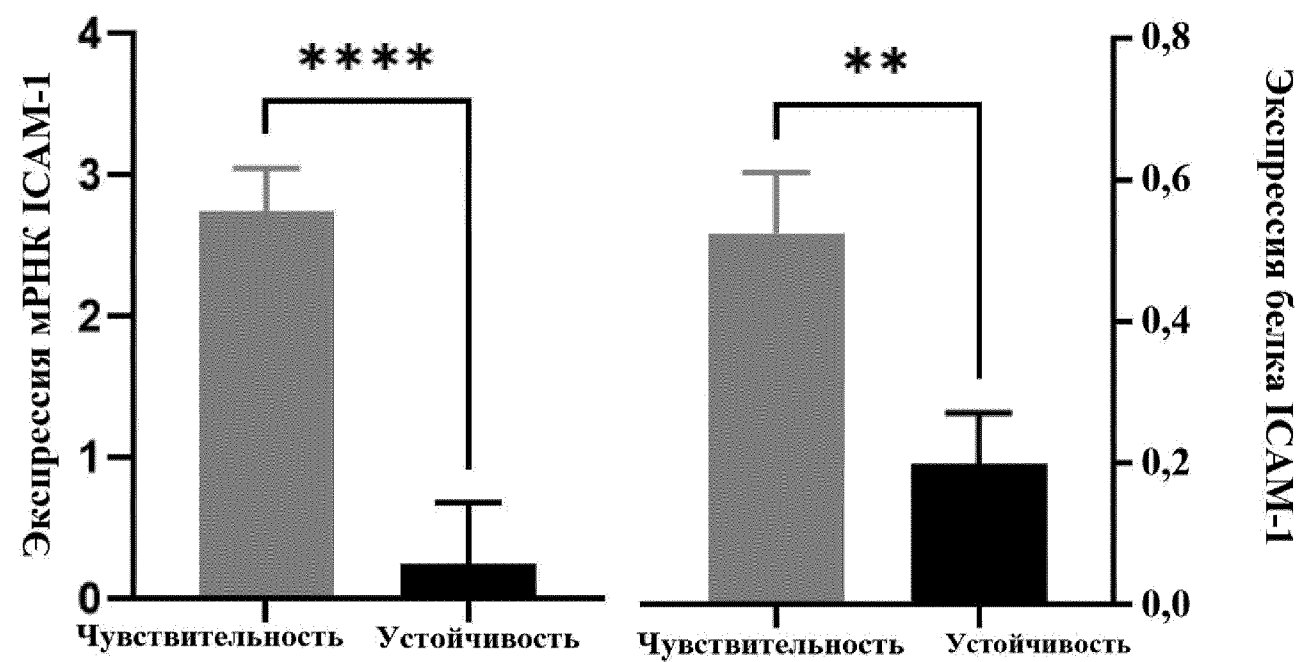
ФИГ. 8В



ФИГ. 8С

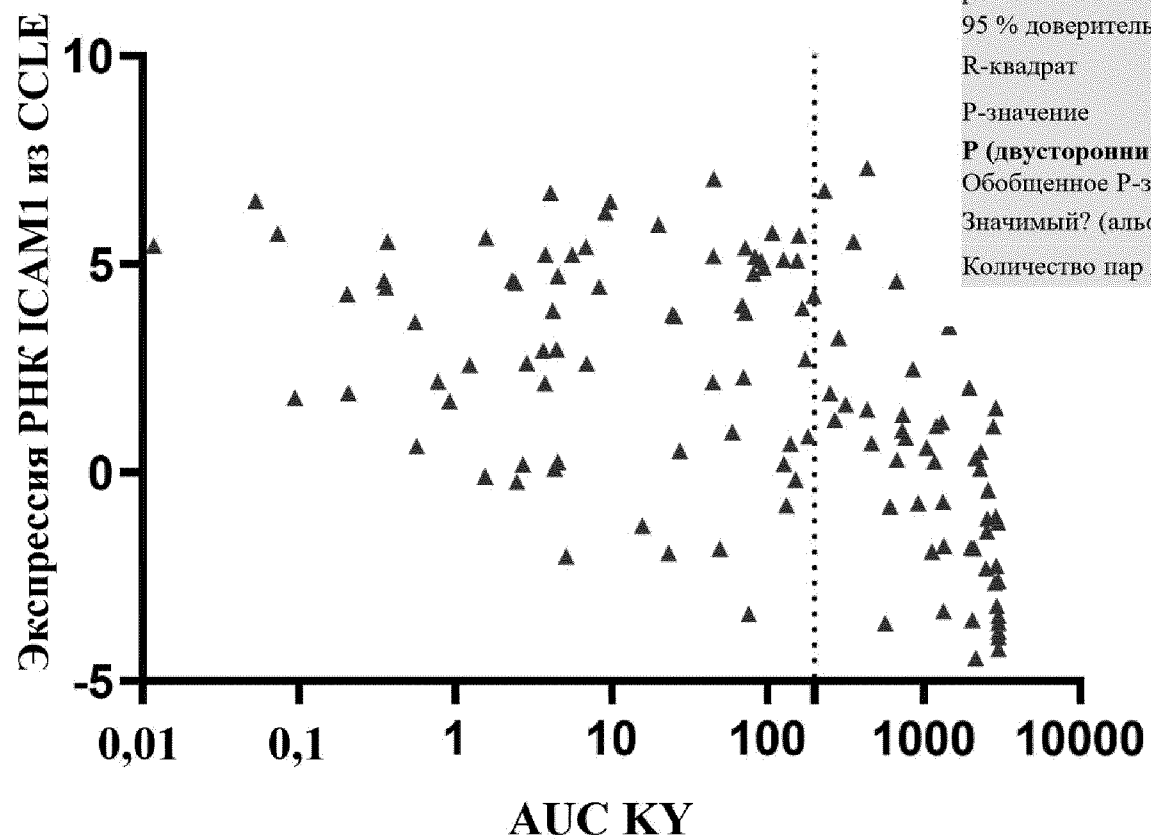


ФИГ. 8D



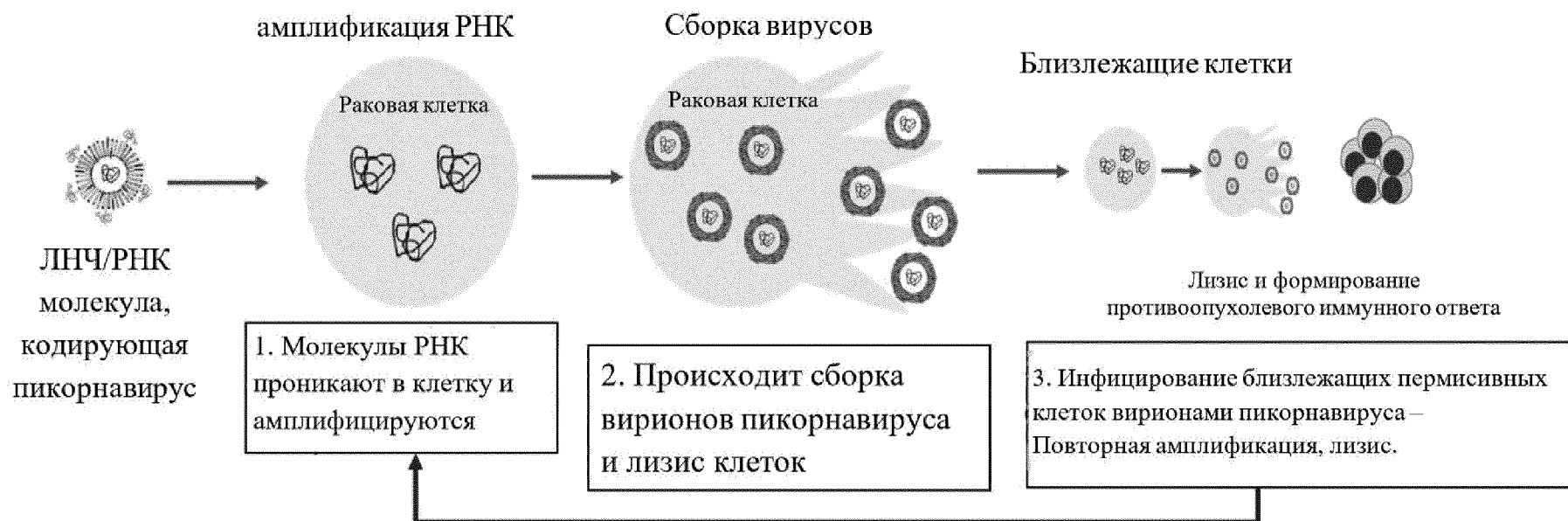
ФИГ. 8E

Экспрессия РНК ICAM1 в срав. с пермисивностью KY

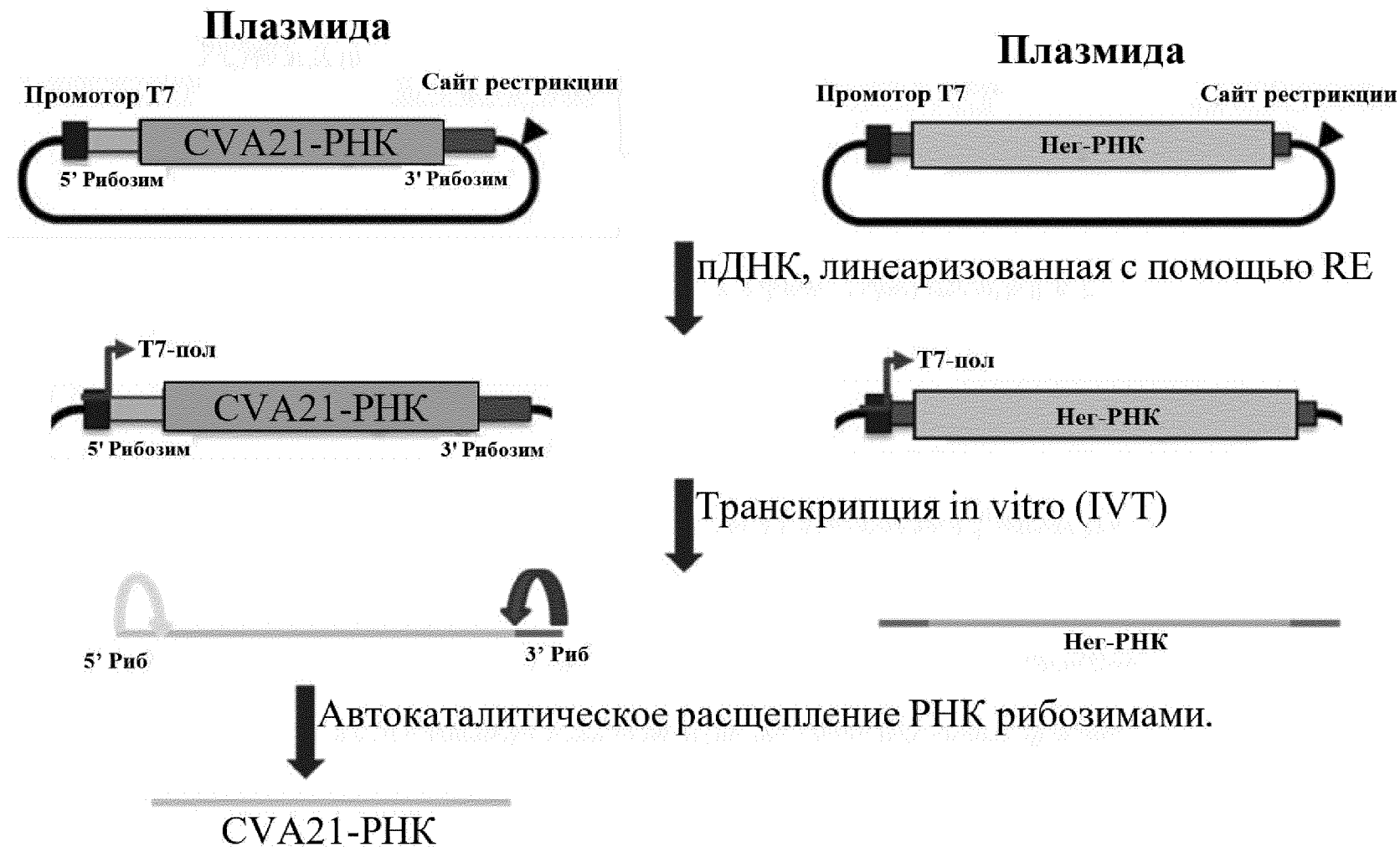


Коеф. корреляции Пирсона	
r	-0,6475
95 % доверительный	от -0,7405 до -0,5304
R-квадрат	0,4193
P-значение	
P (двусторонний)	< 0,0001
Обобщенное P-значение	****
Значимый? (альфа = 0,05)	Да
Количество пар XY	121

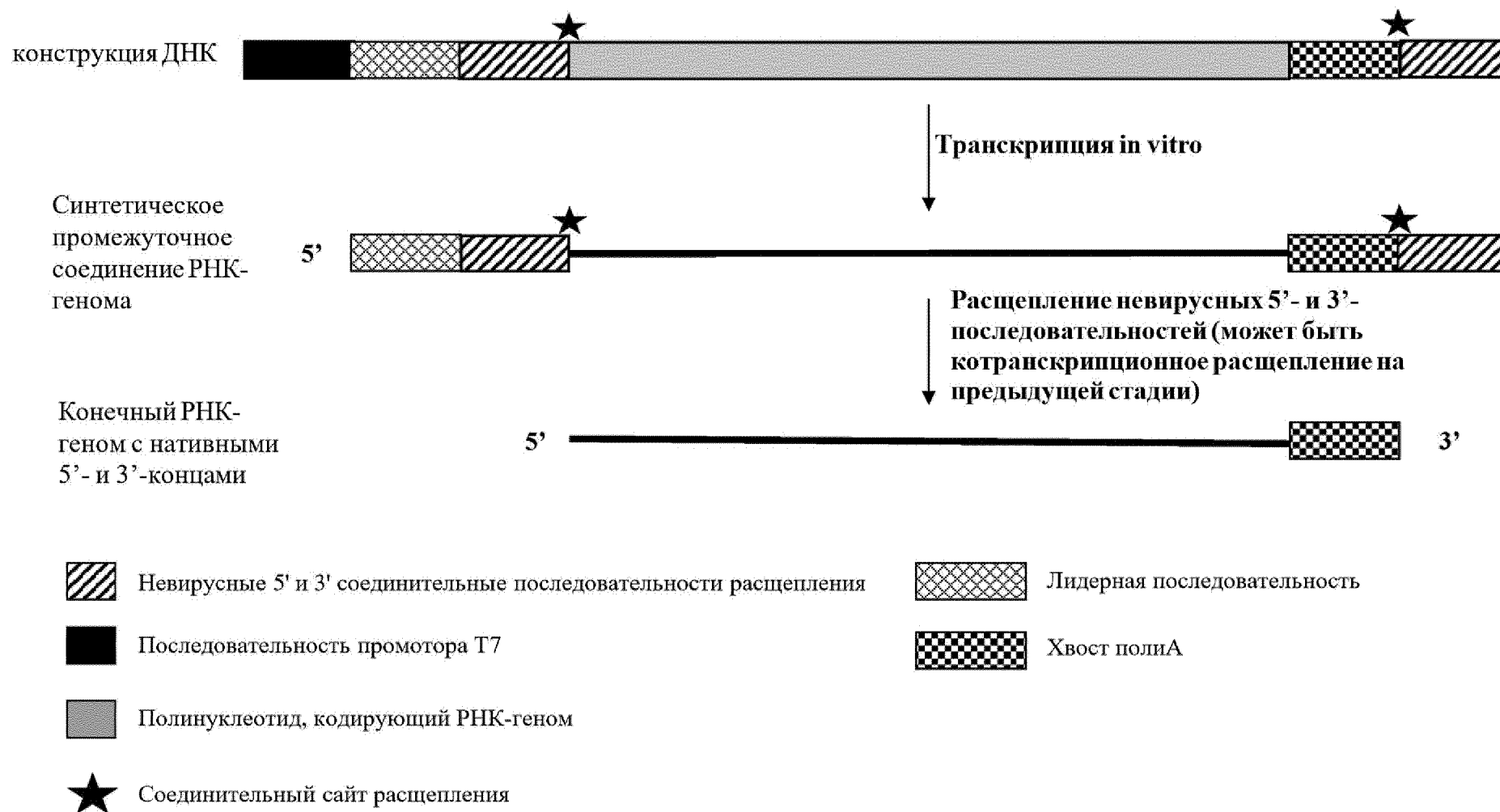
ФИГ. 9



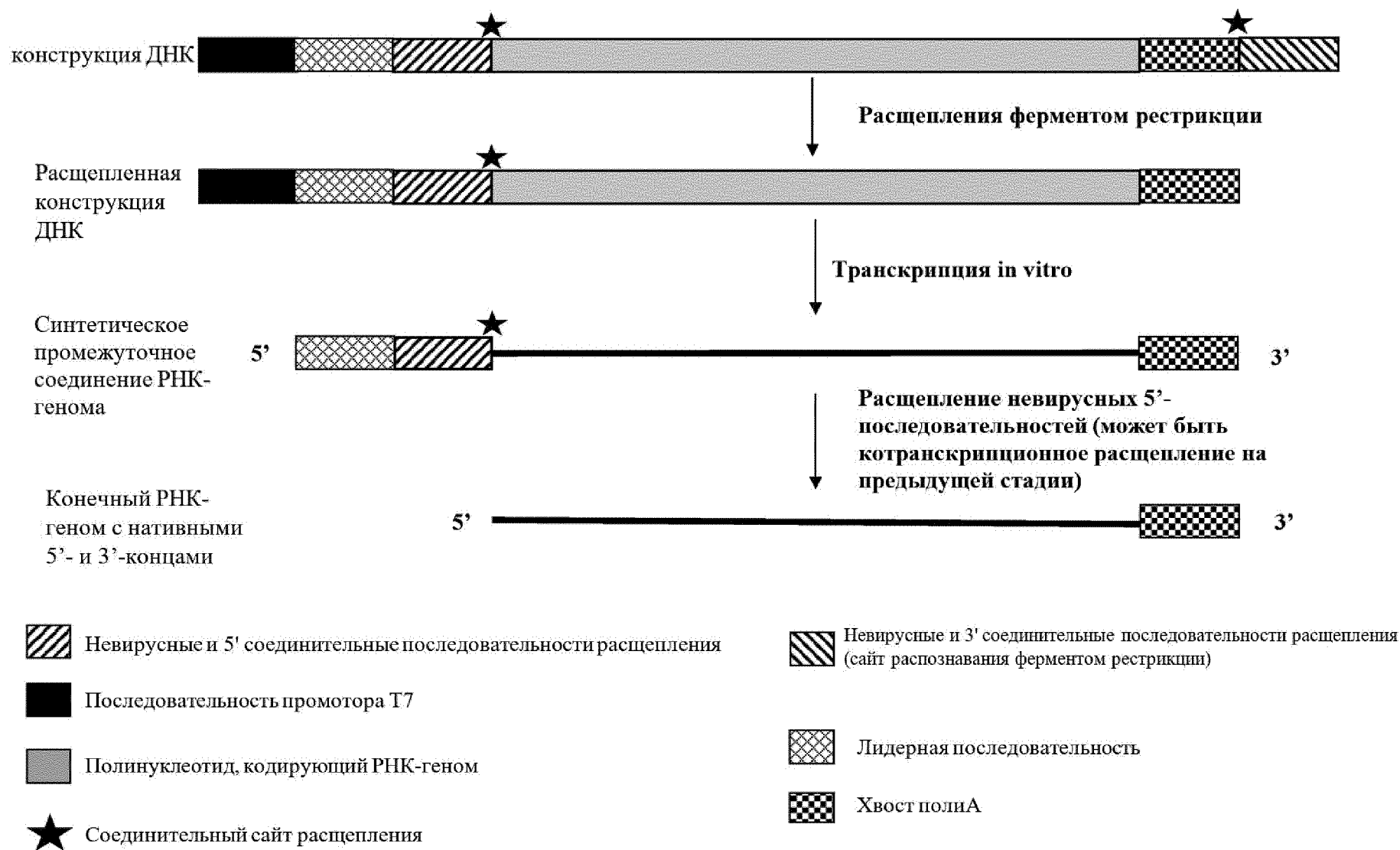
ФИГ. 10



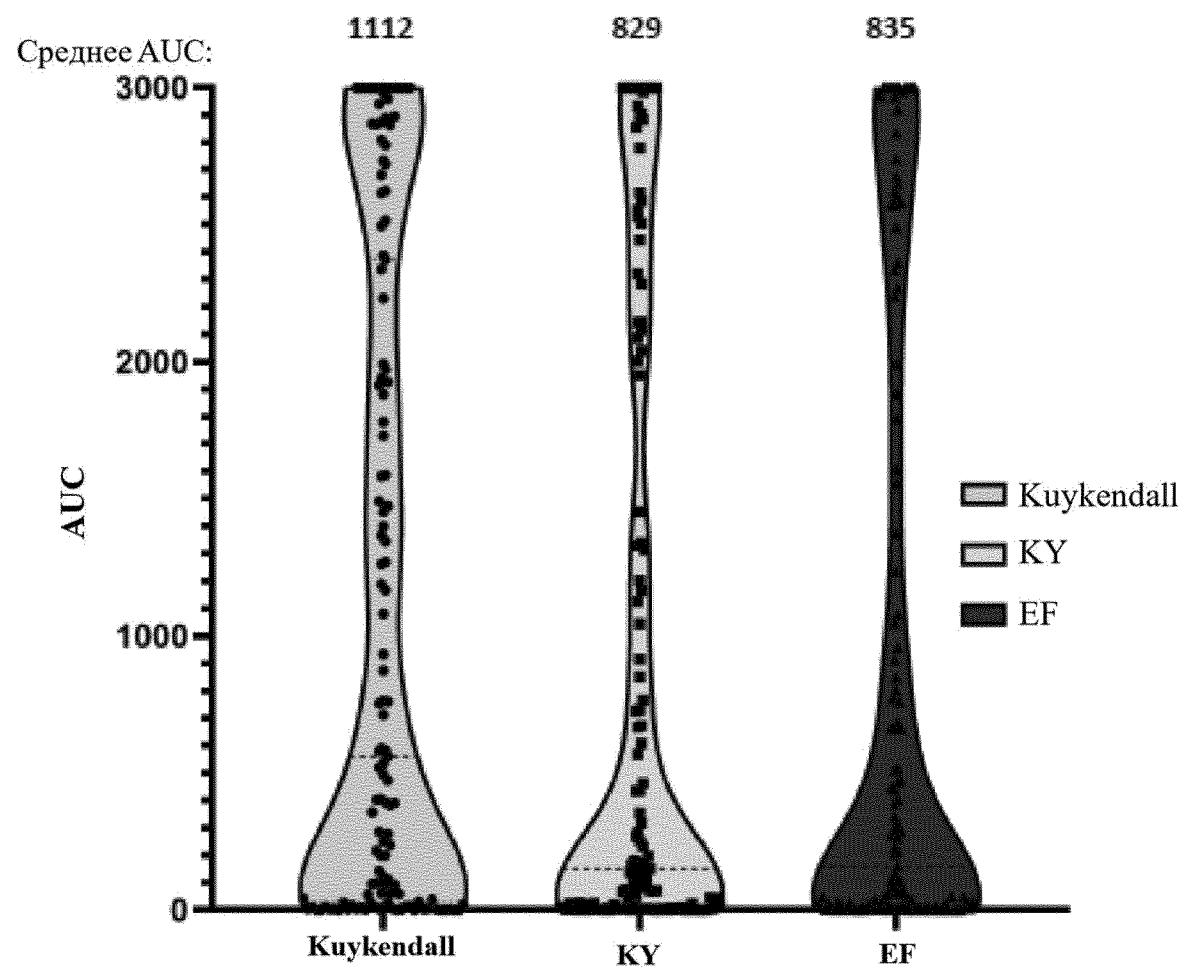
ФИГ. 11А



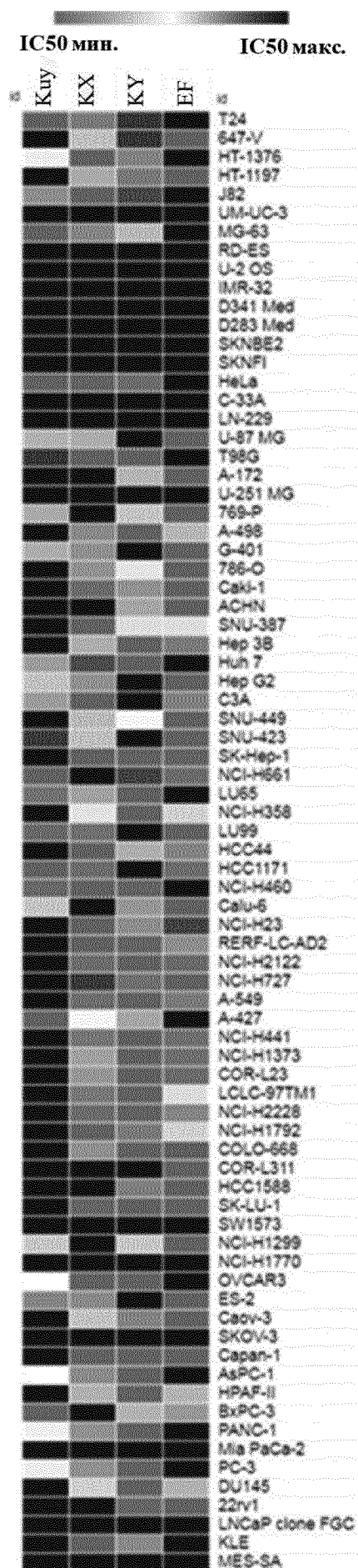
ФИГ. 11В



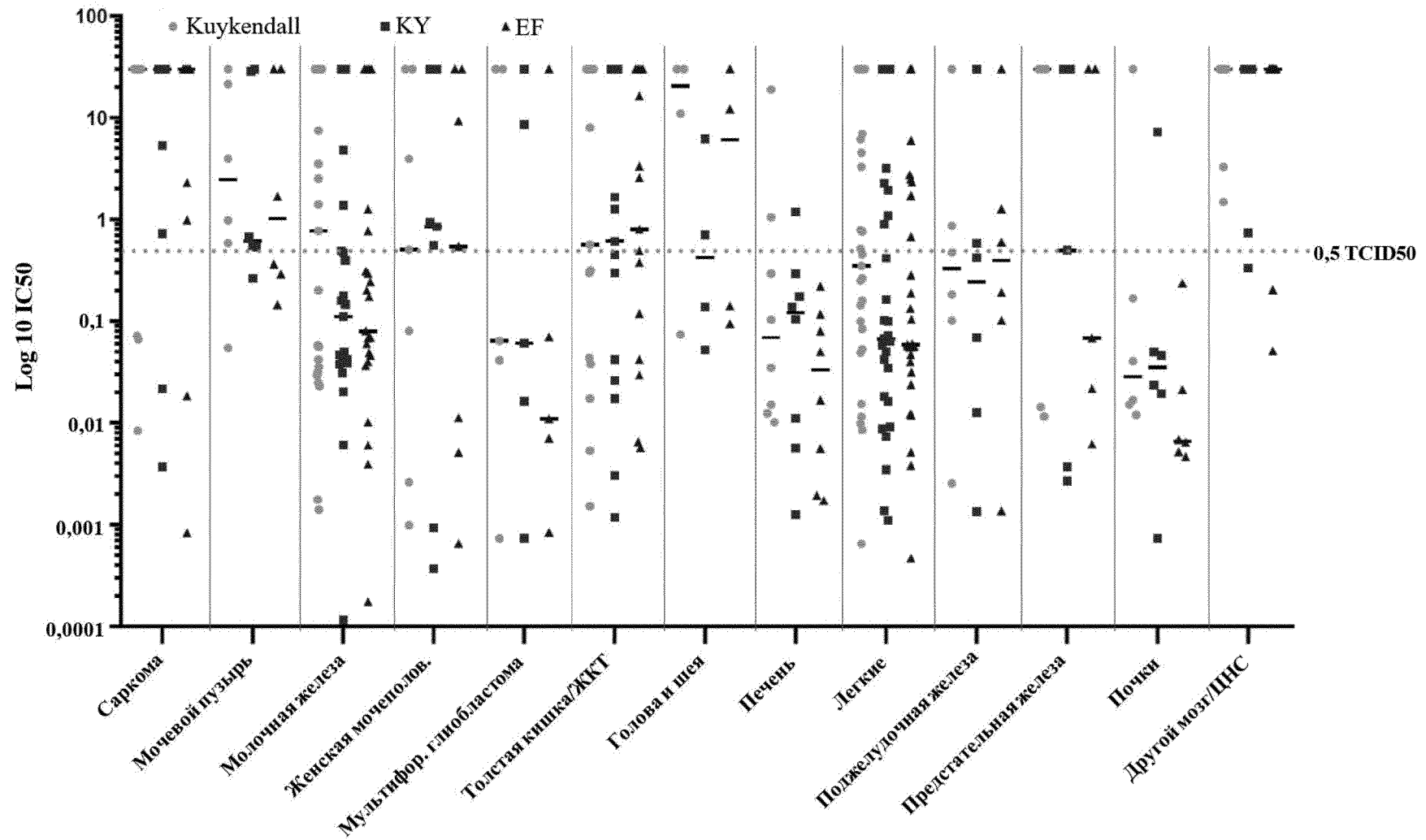
ФИГ. 12А



ФИГ. 12В



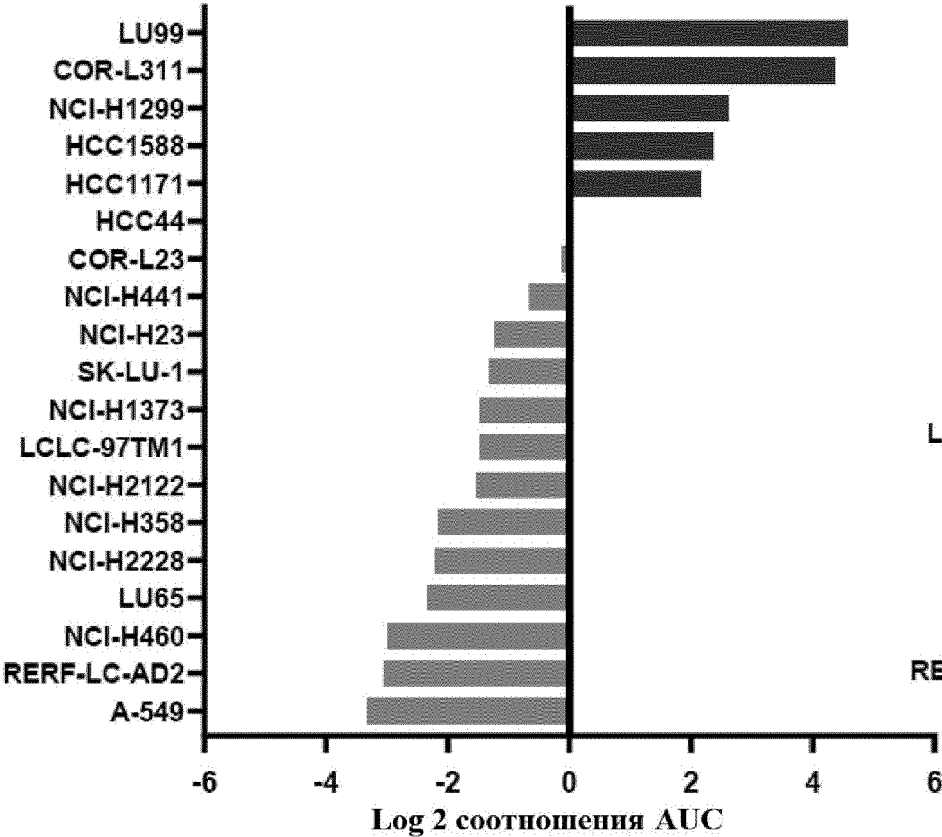
ФИГ. 13



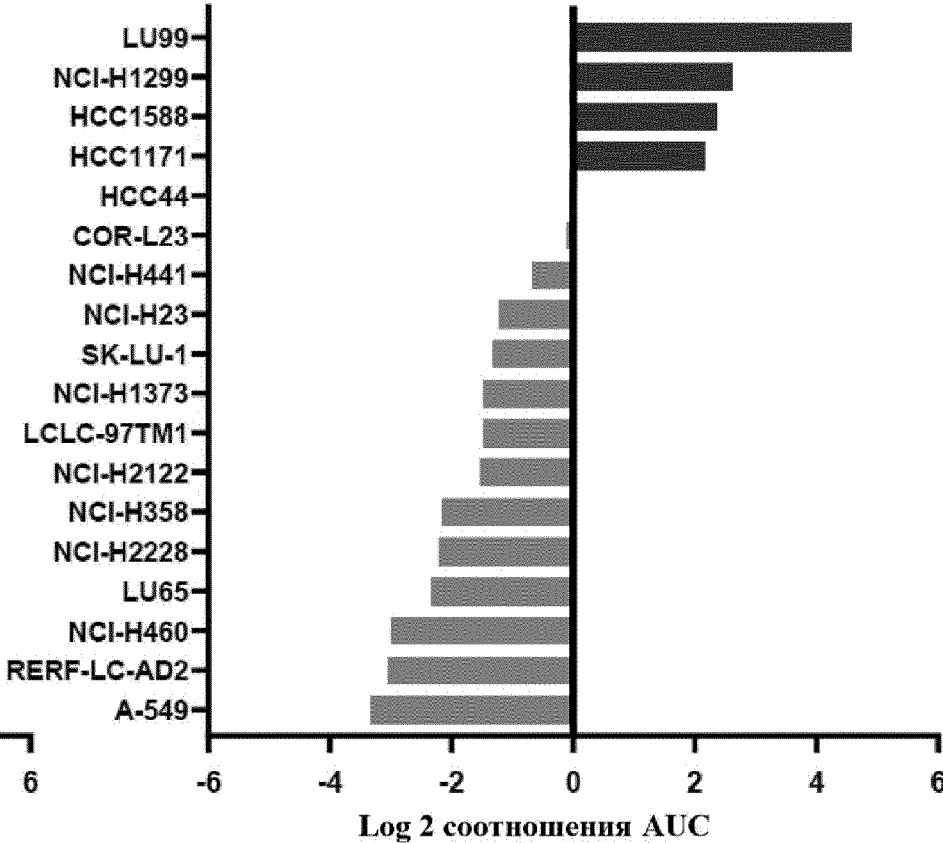
ФИГ. 14

351

Легкие
КУ в срав. с EF

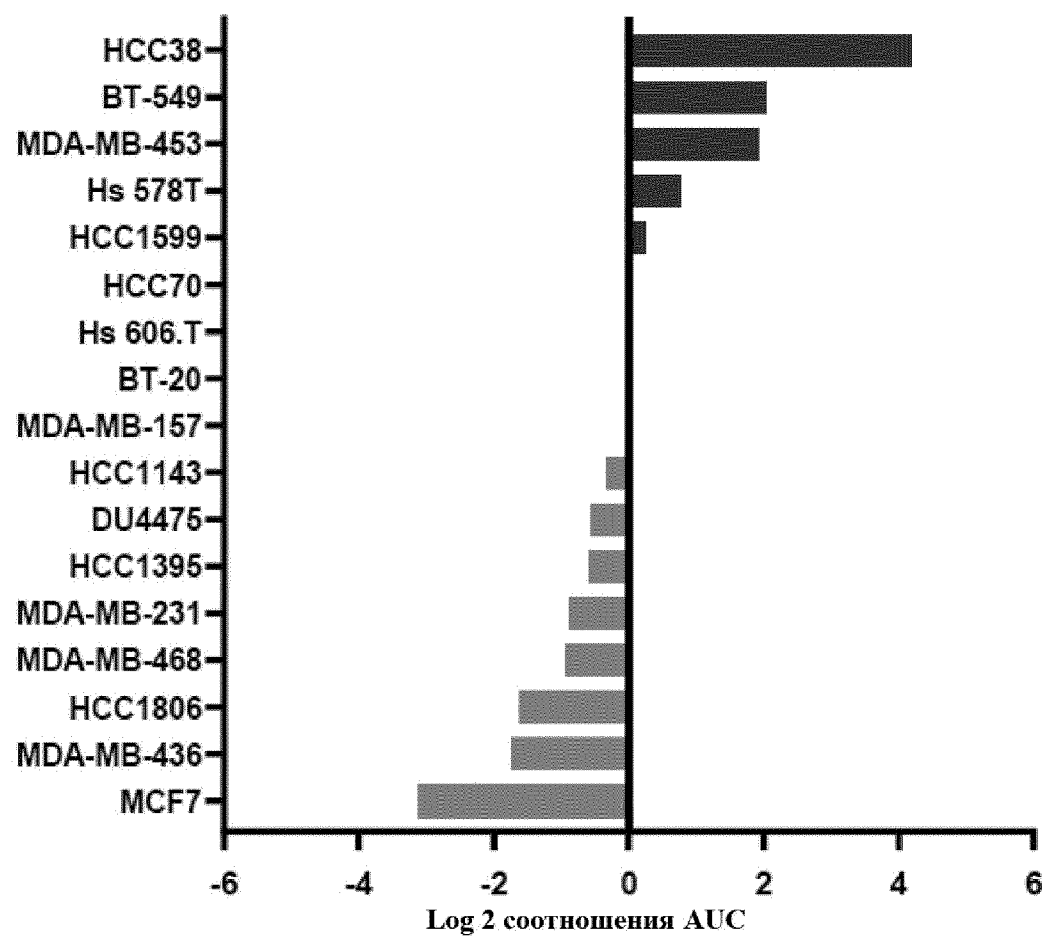


NSCLC
КУ в срав. с EF



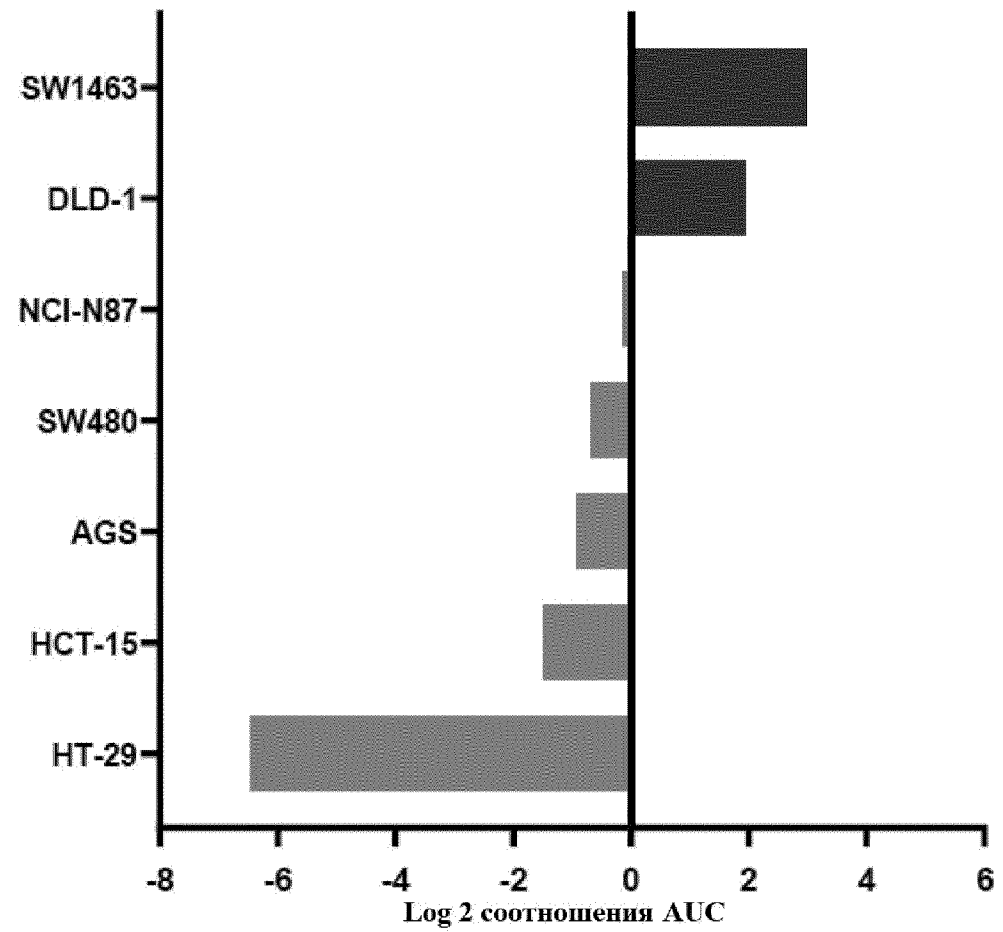
ФИГ. 15А

Молочная железа
КУ в срав. с EF



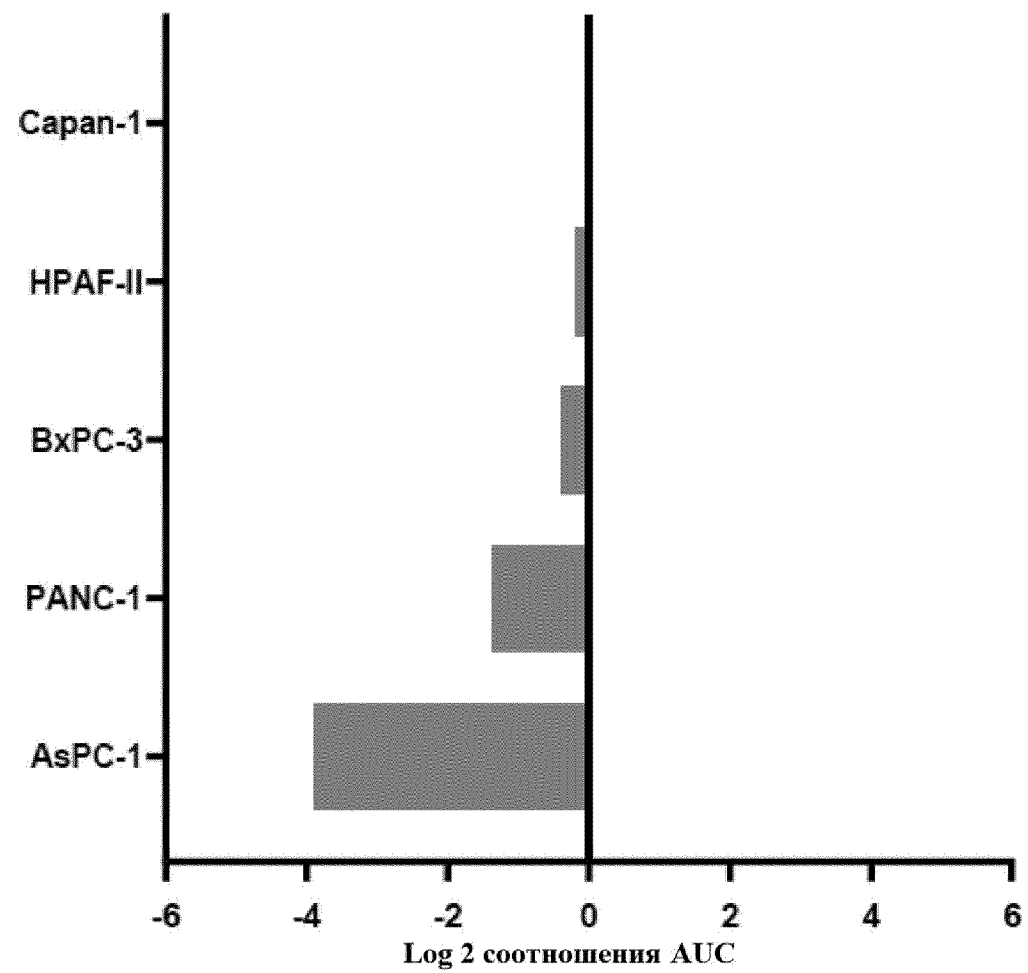
ФИГ. 15В

**Толстая кишка/ЖКТ
КУ в срав. с ЕФ**

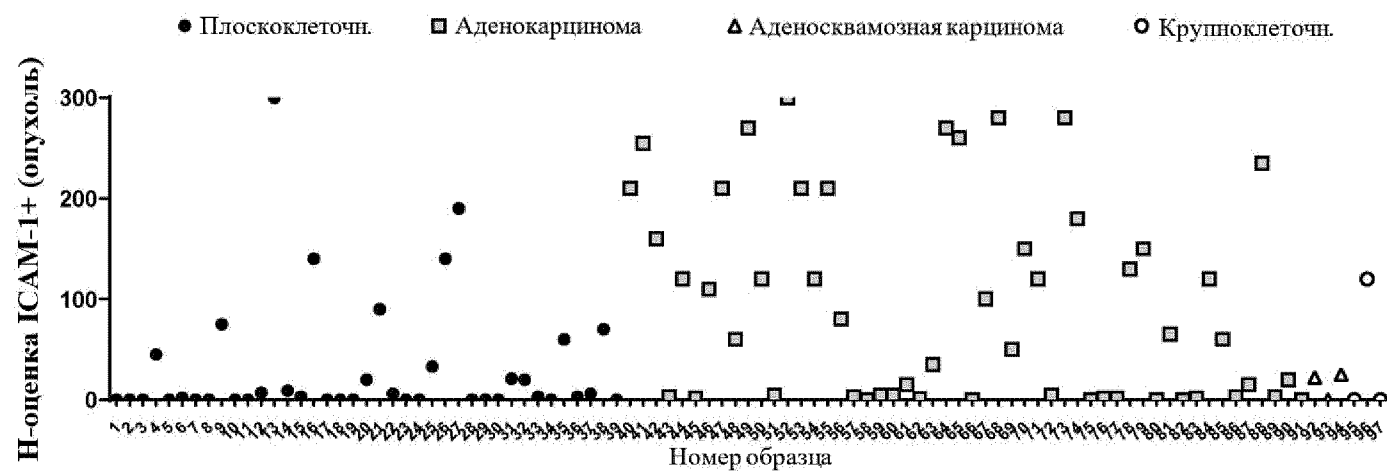
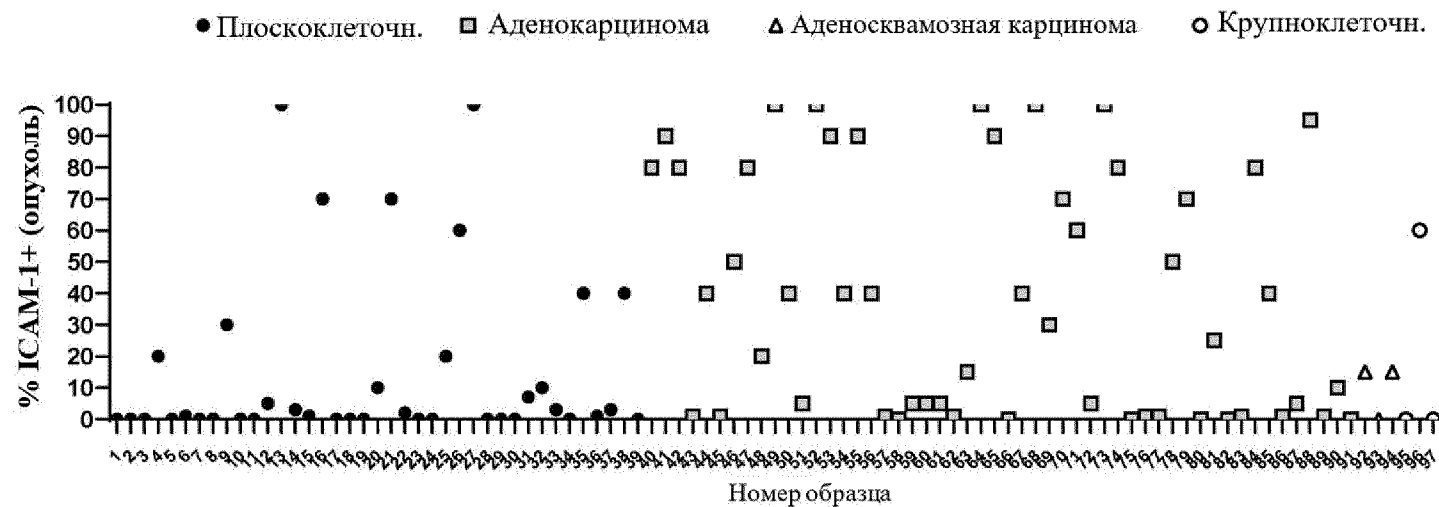


ФИГ. 15С

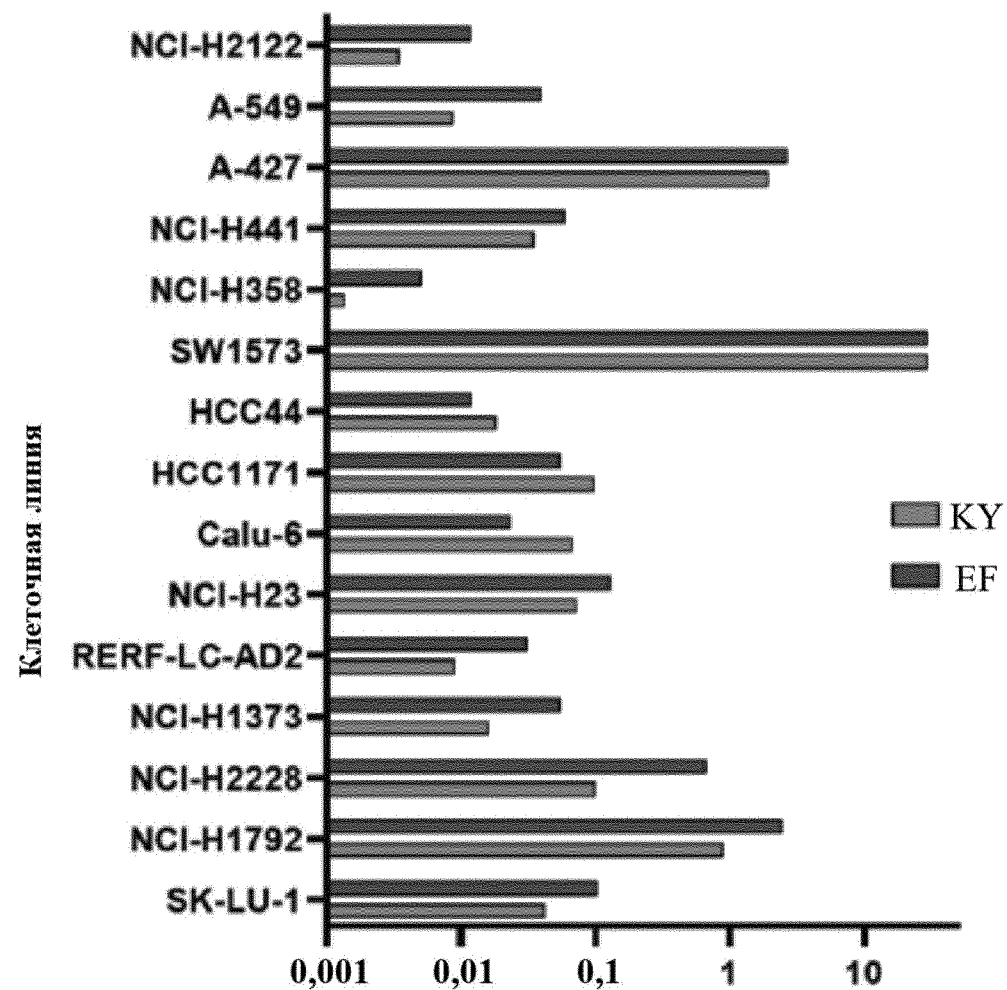
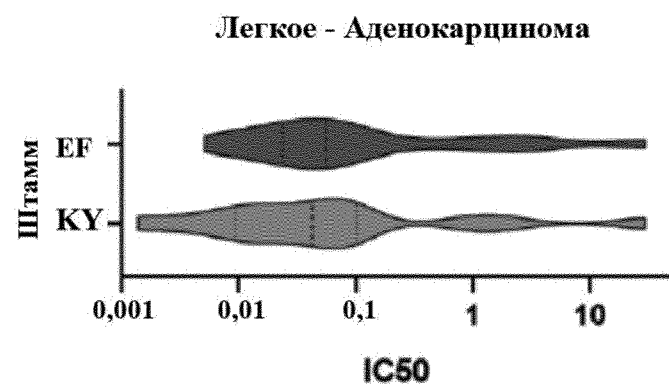
**Поджелудочная железа
КУ в срав. с EF**



ФИГ. 16А

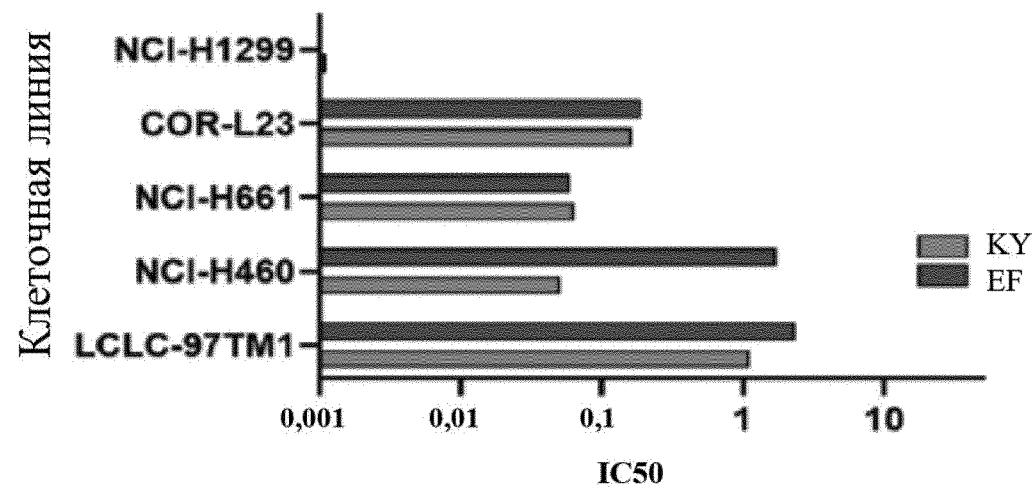
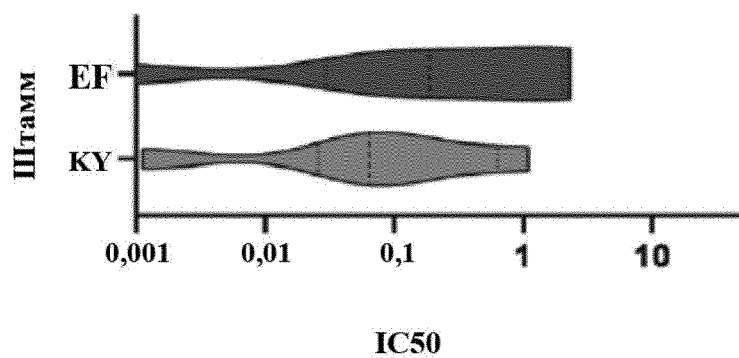


ФИГ. 16В



ФИГ. 16С

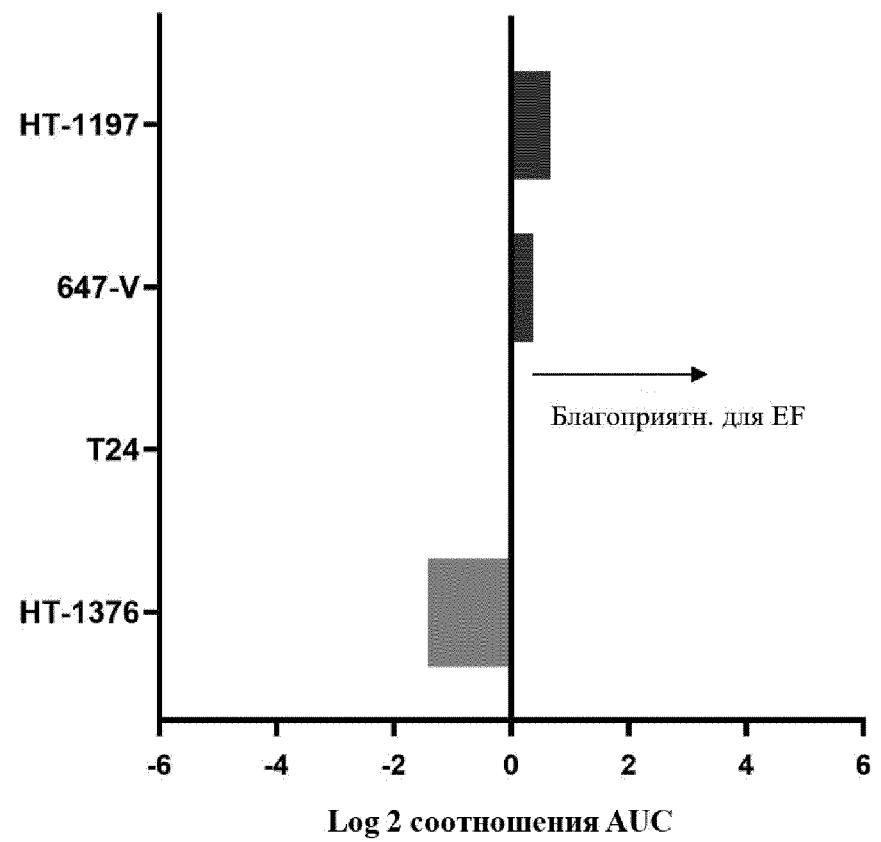
Легкое – Крупноклеточная карцинома



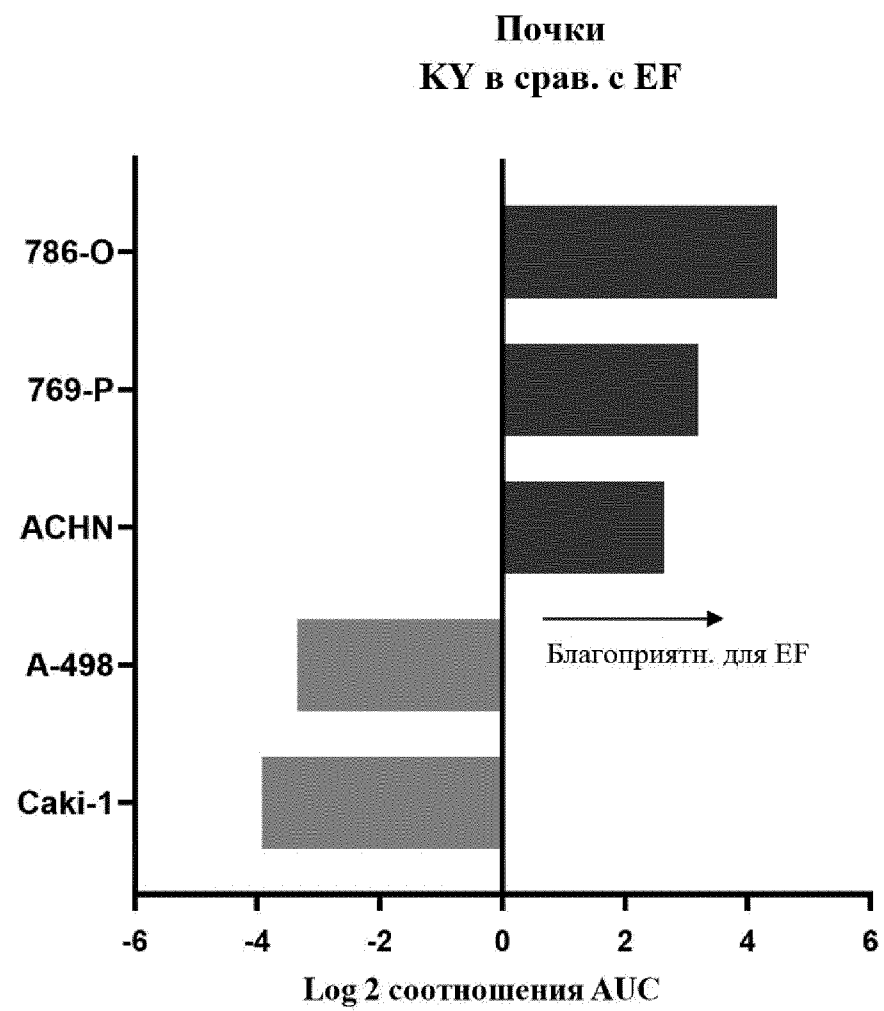
В одиночной линии SCC EF лучше в 56 раз.

ФИГ. 17А

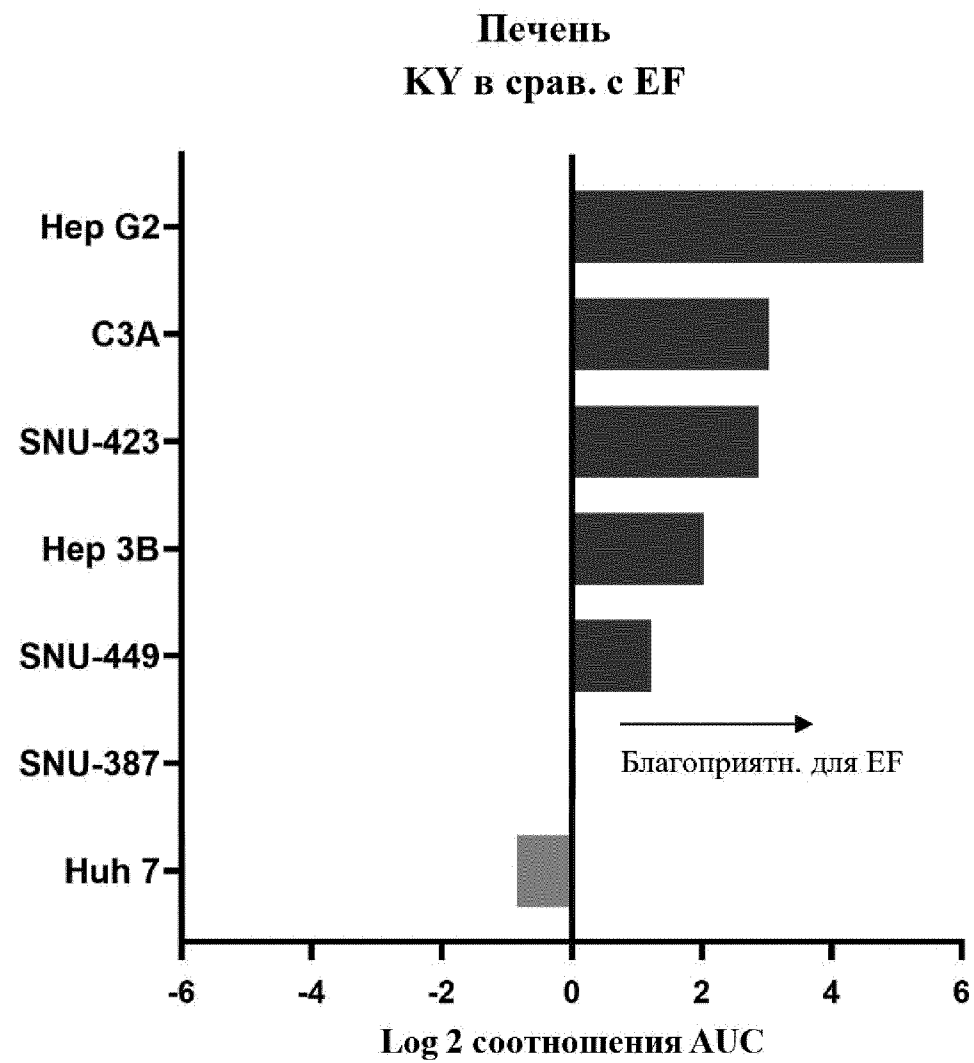
Мочевой пузырь
КУ в срав. с EF



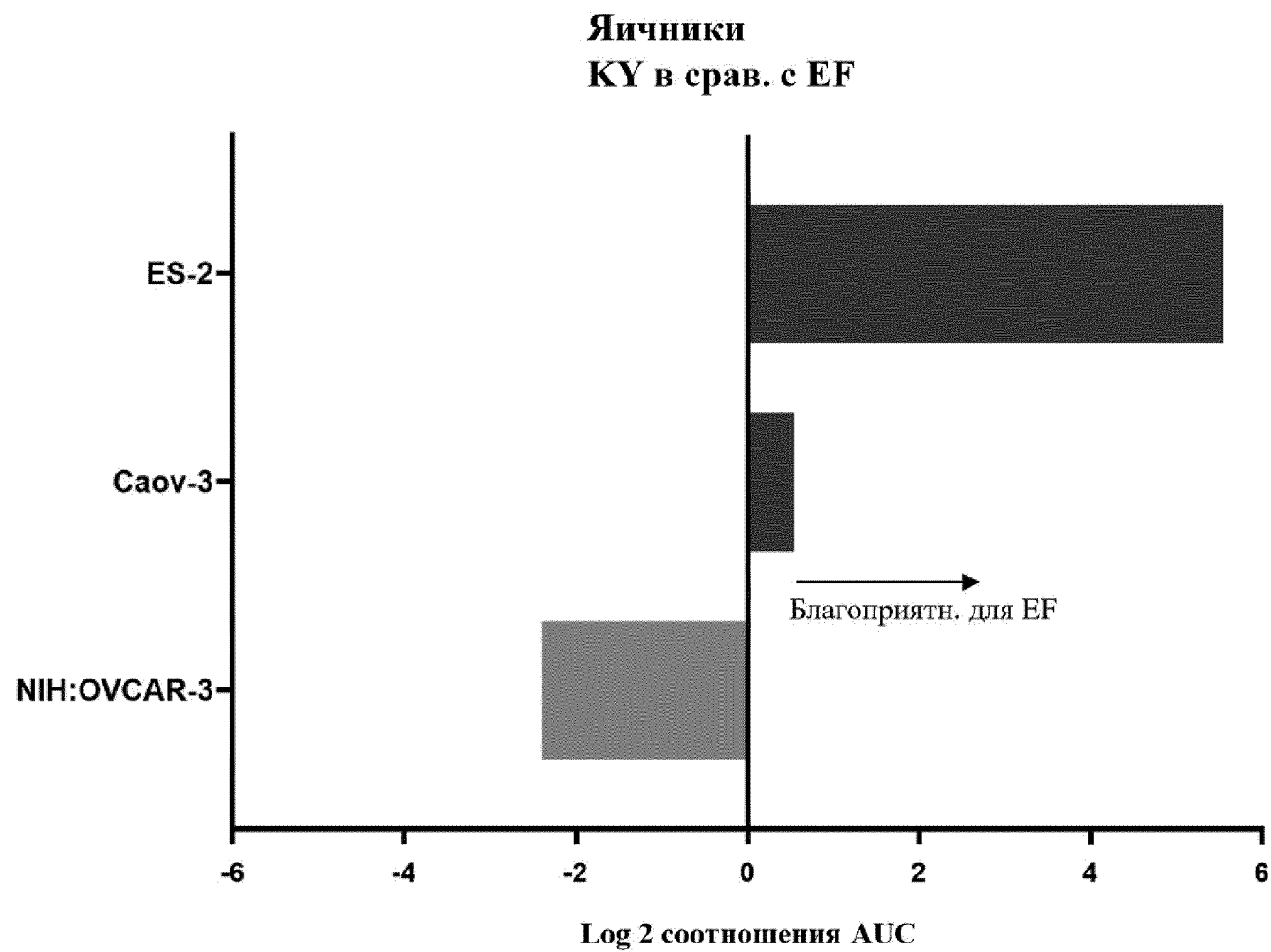
ФИГ. 17В



ФИГ. 17С

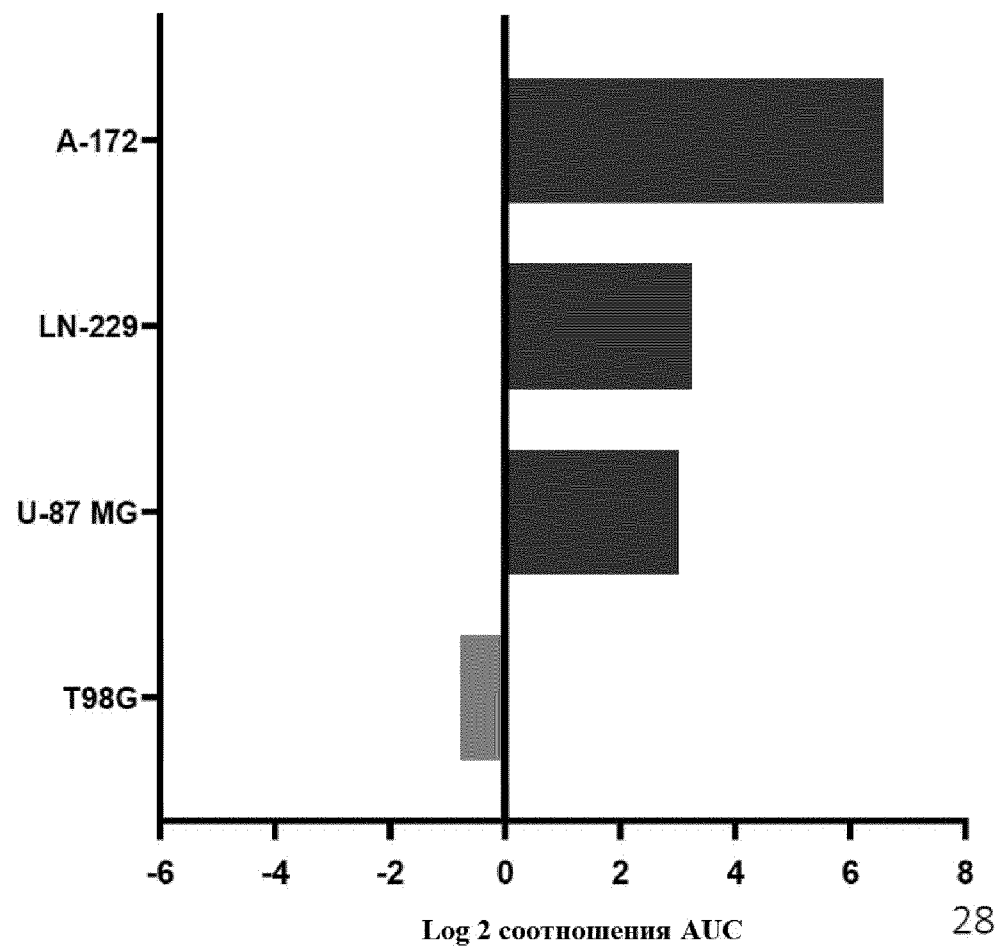


ФИГ. 17D

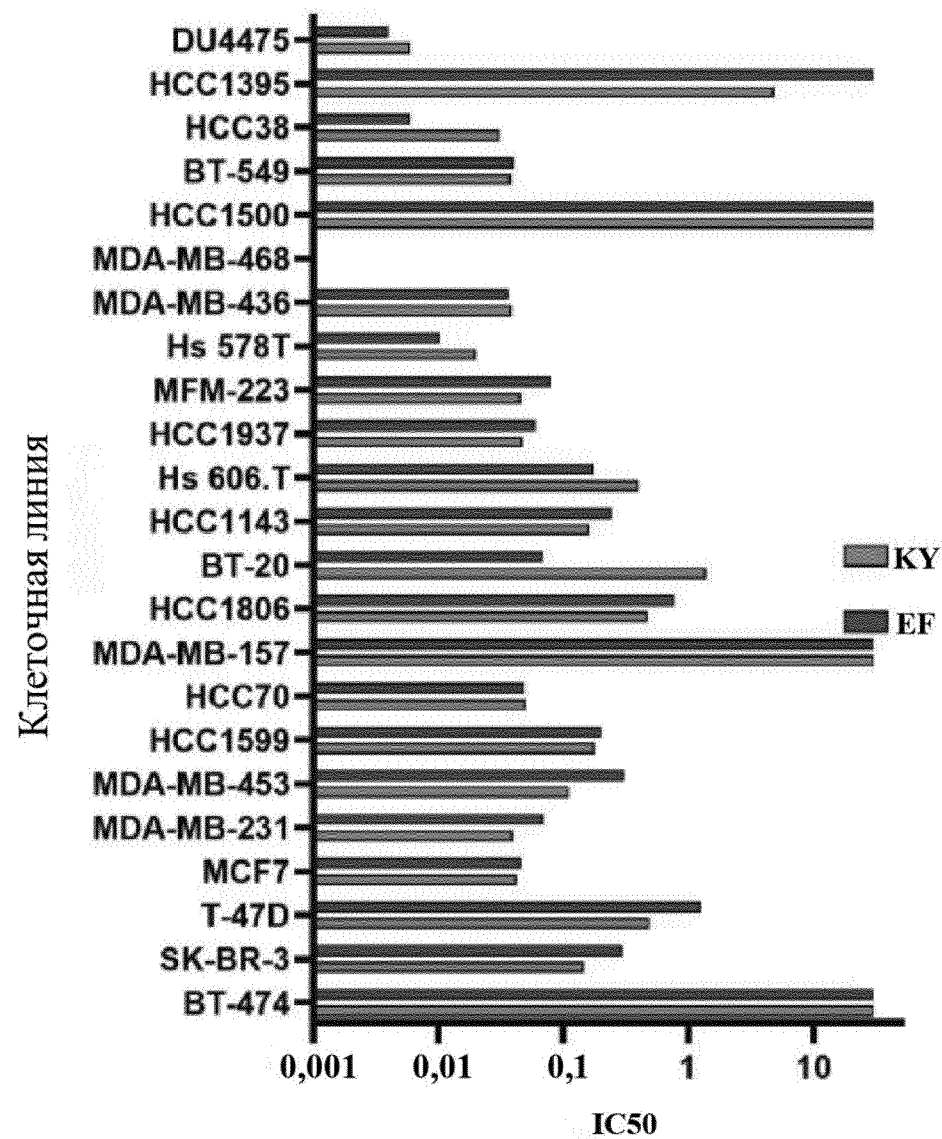
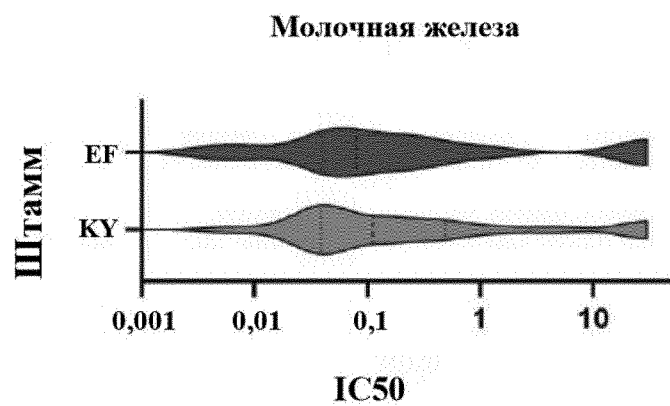


ФИГ. 17Е

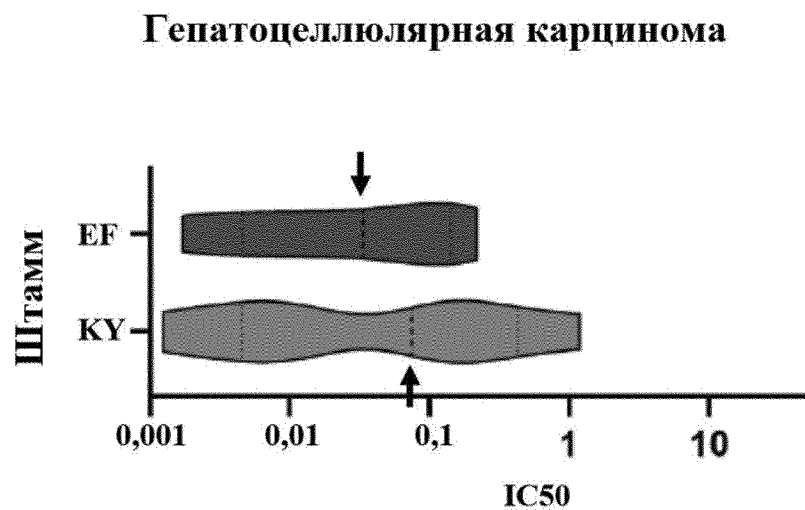
Мультифор. глиобластома
КУ в срав. с EF



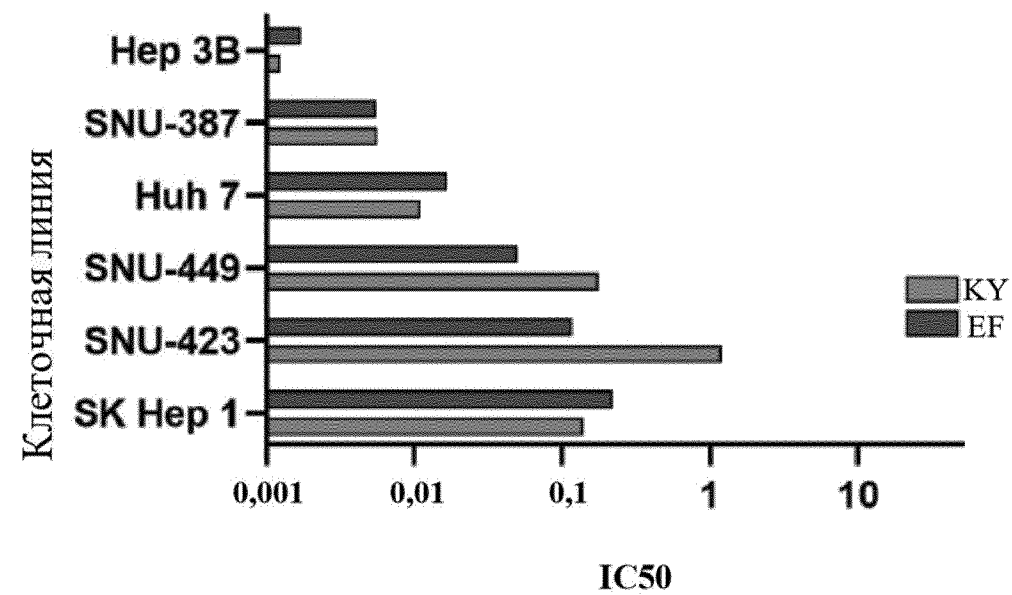
ФИГ. 18А



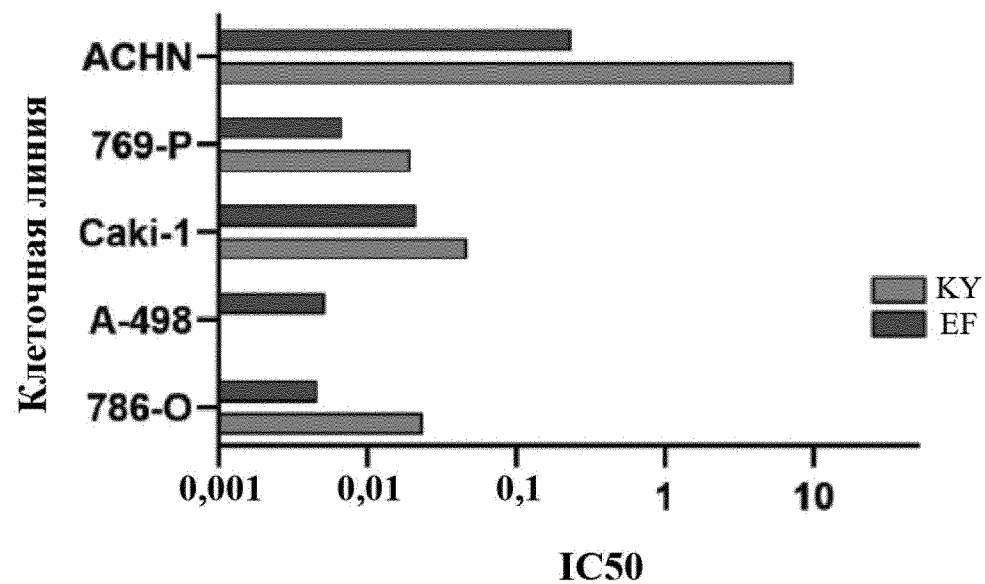
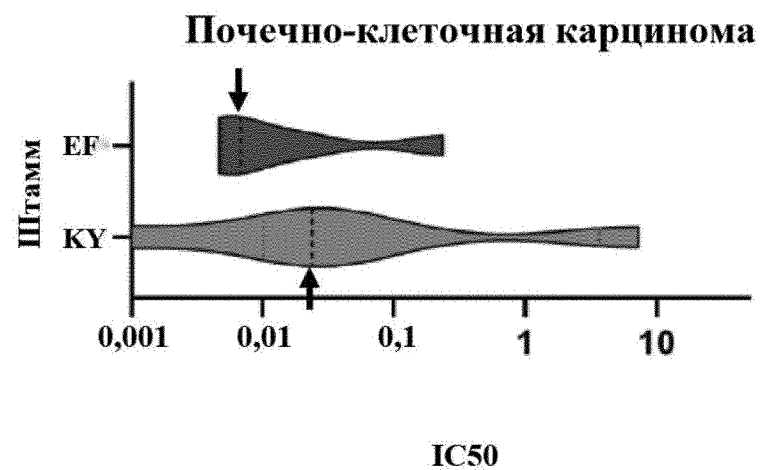
ФИГ. 18В



↑ Медиана IC50



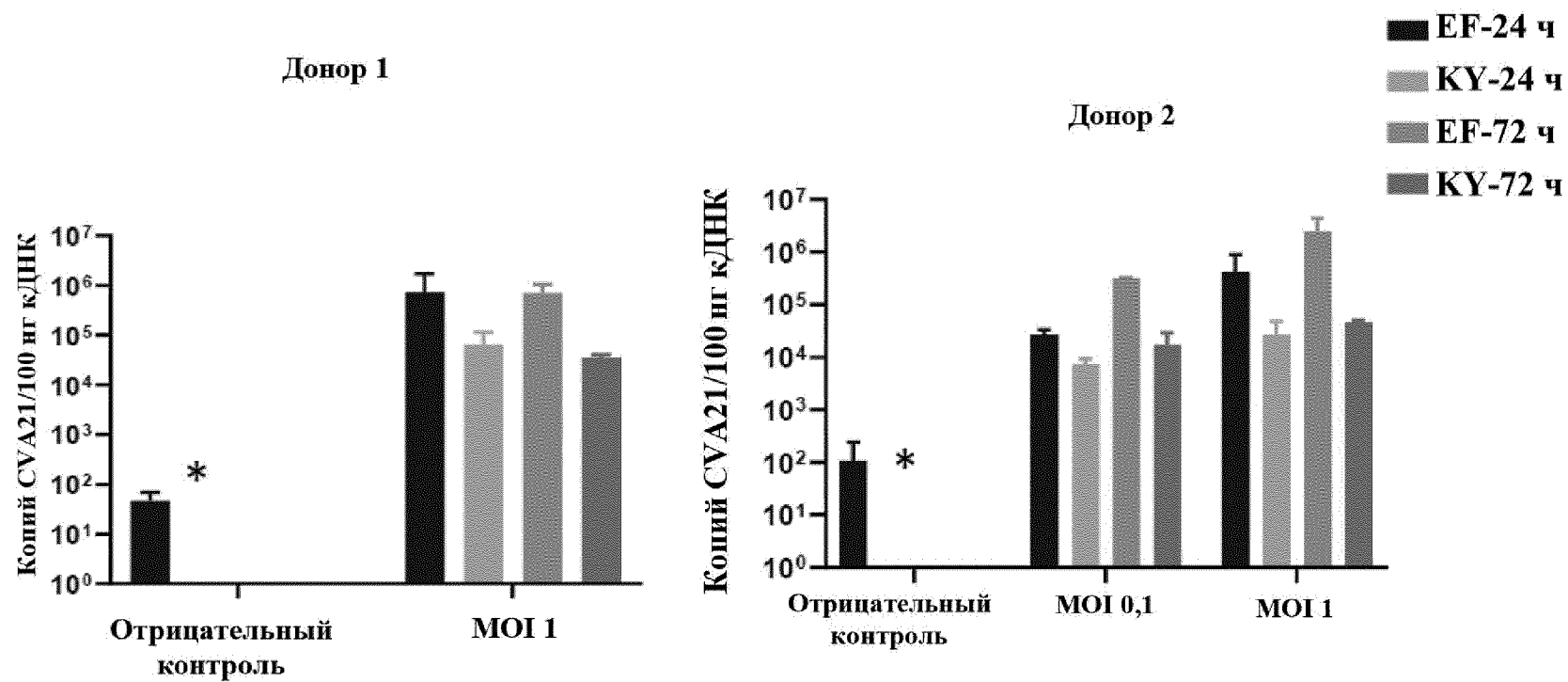
ФИГ. 18С



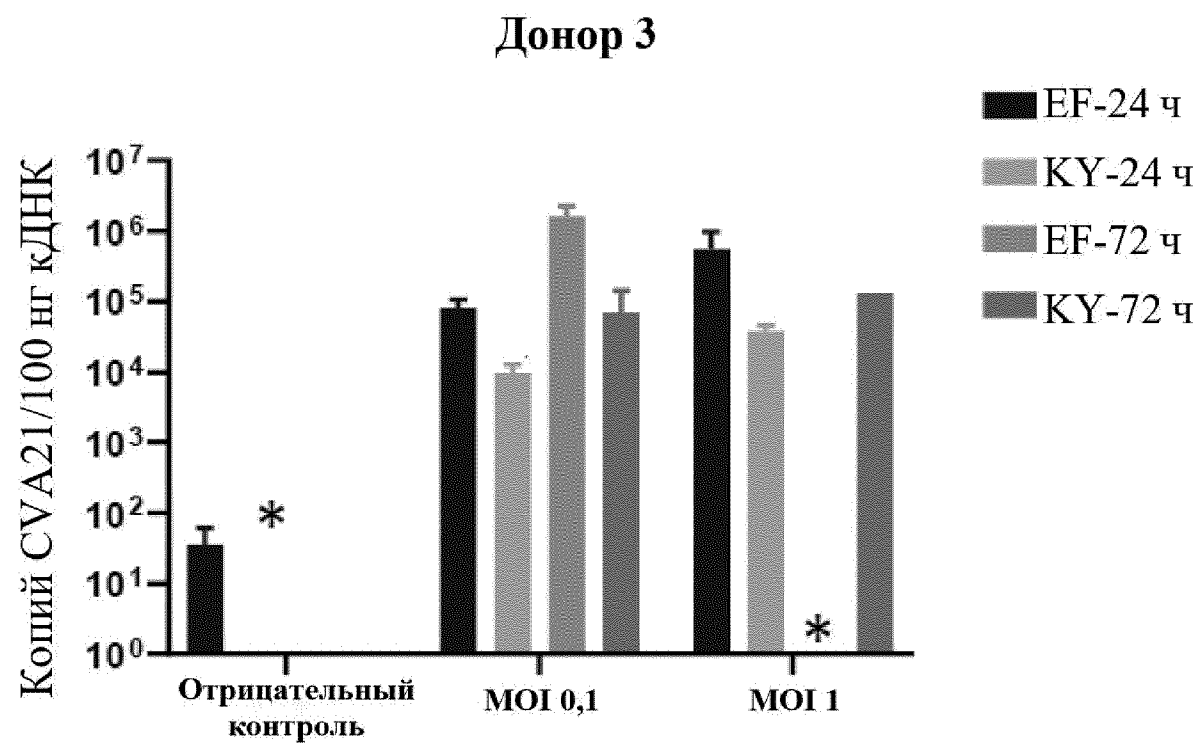
Фиг. 19

Клеточная линия hCAME	TCID ₅₀	
	KY	EF
CT26 ДТ	21,80	6,89
CT26 IFNARKO A-8	15,67	0,34
4T1	17,62	0,09
EMT6	19,66	1,11
B16-F10	0,01	0,01
A20	>30	6,30
CT2A	13,11	5,76
M109	1,27	1,22

ФИГ. 20А



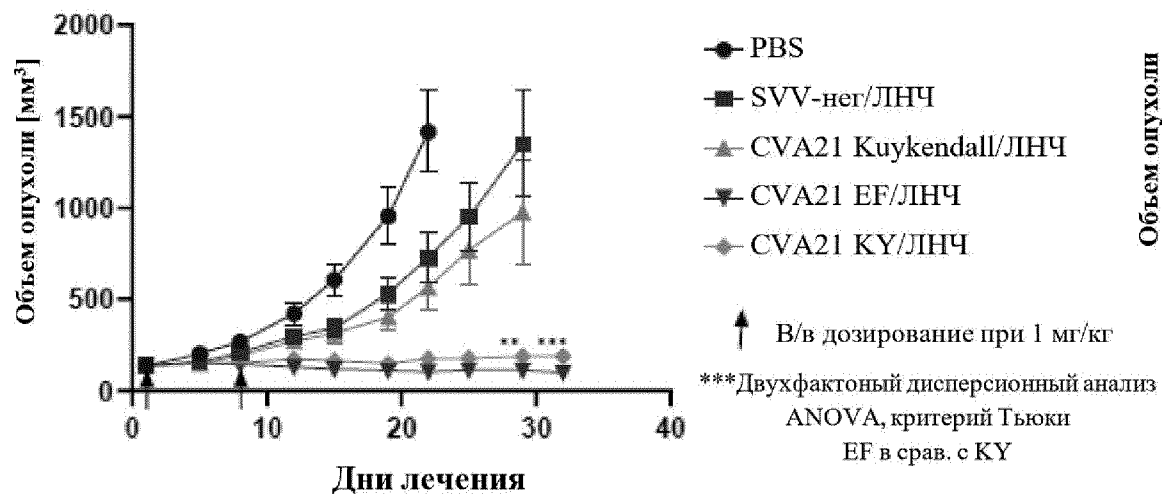
ФИГ. 20В



* РНК не обнаружена

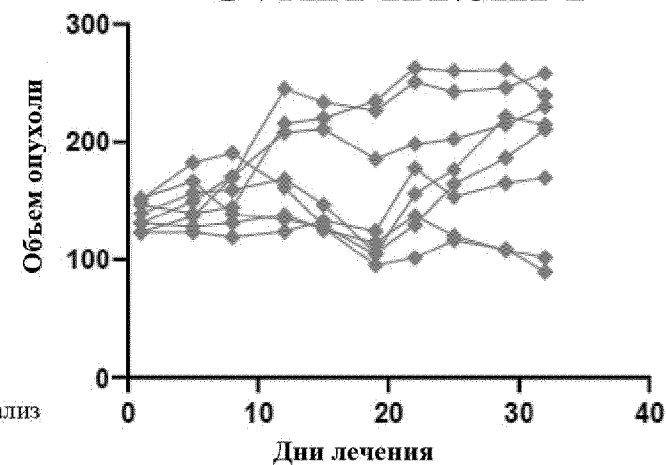
ФИГ. 21

Размер опухоли в H1299-36

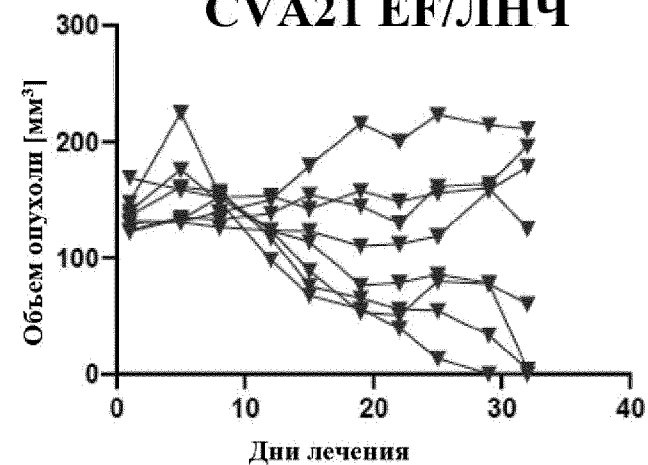


H1299	Kuy	KY	EF
IC50	0,0006	0,0011	0,0004
TGI (%)*	60	87	93
*Рассчитано на 22 день			

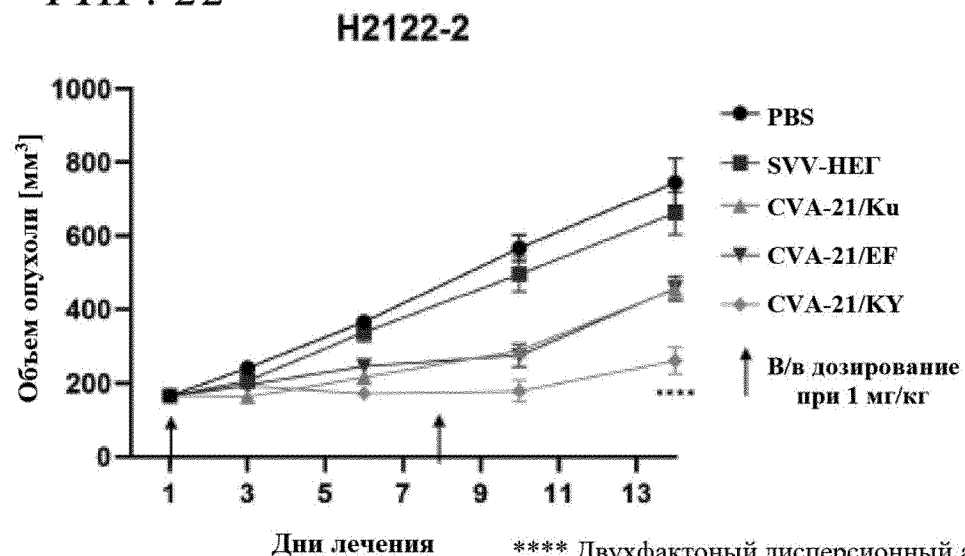
CVA21 KY/ЛНЧ



CVA21 EF/ЛНЧ

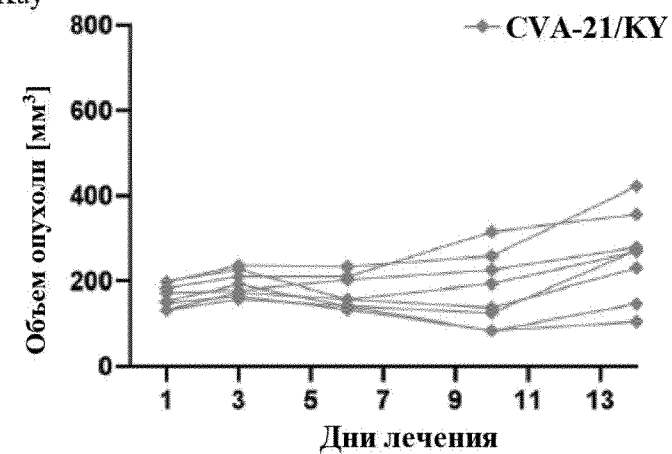
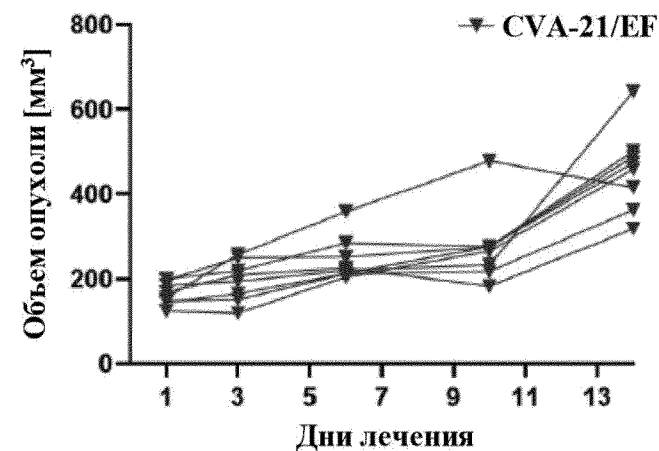


ФИГ. 22

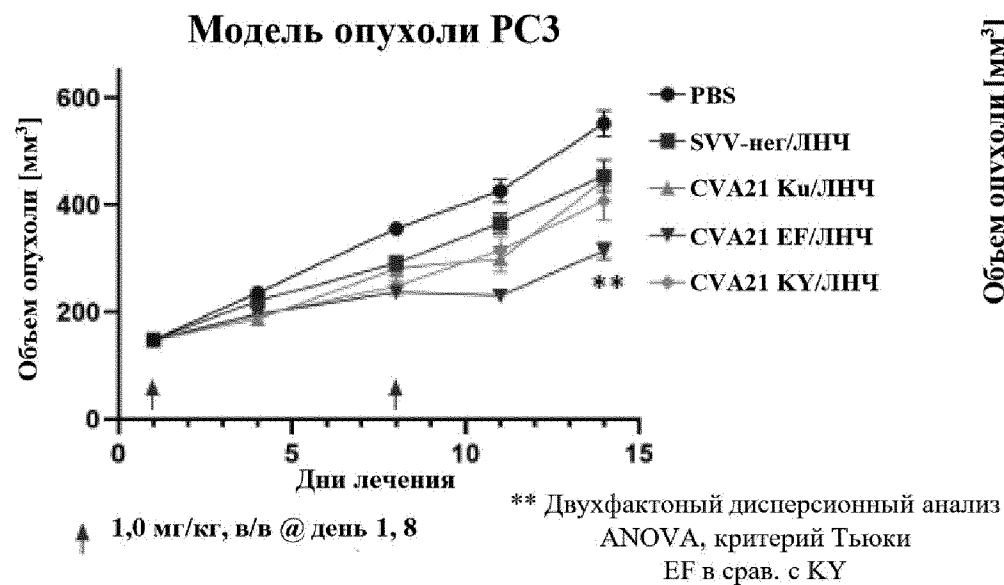


**** Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, критерий Тьюки
KY в сравн. с EF и Ku

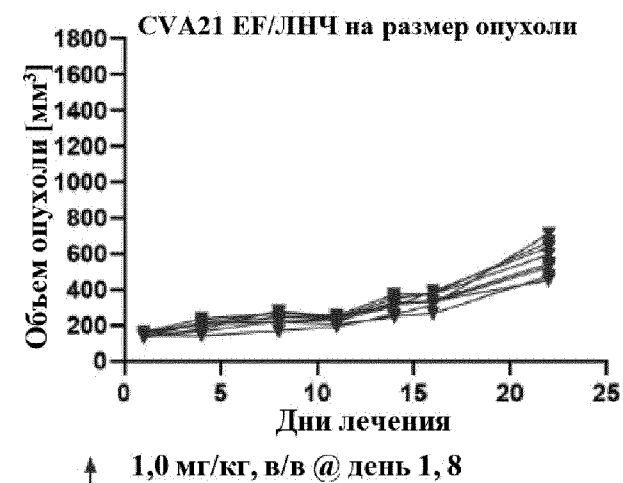
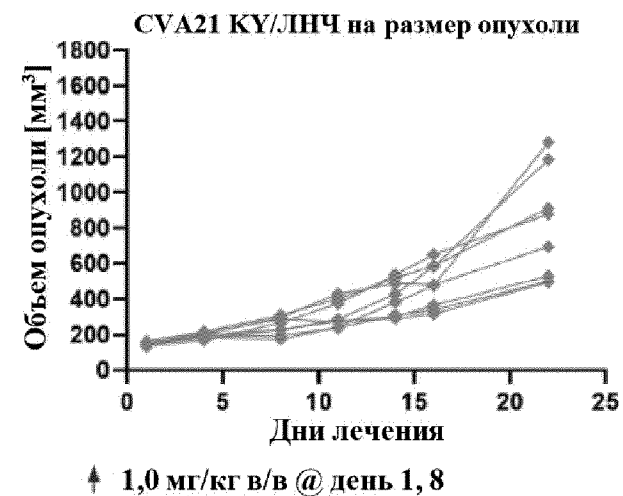
H2122	Ku	KY	EF
IC50	0,249	0,003	0,011
TGI (%)*	39	65	39
*Рассчитано на 14 день			



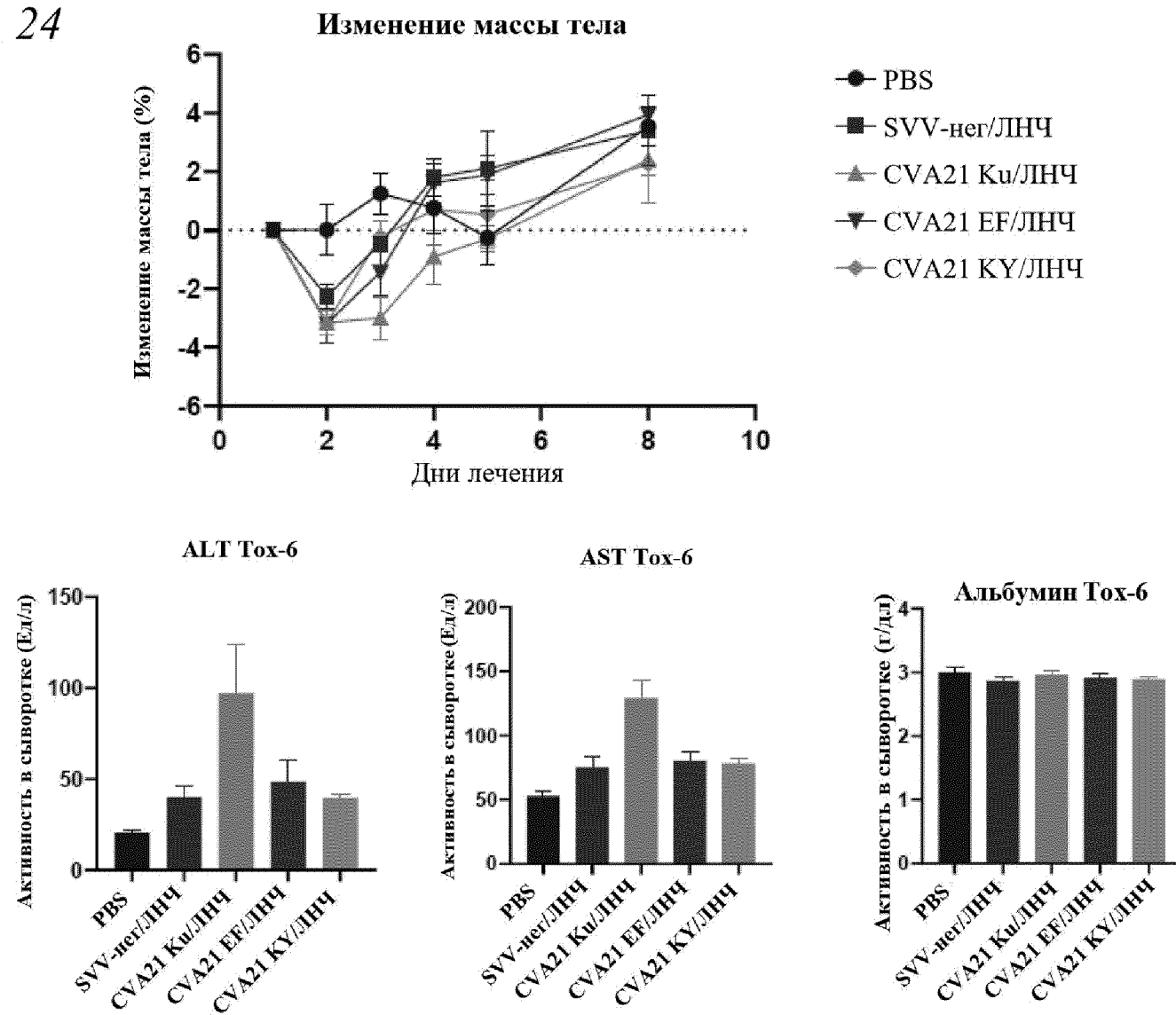
ФИГ. 23



PC3	Ku	KY	EF
IC50	0,011	0,003	0,021
TGI (%)*	19	26	43
*Рассчитано на 14 день			

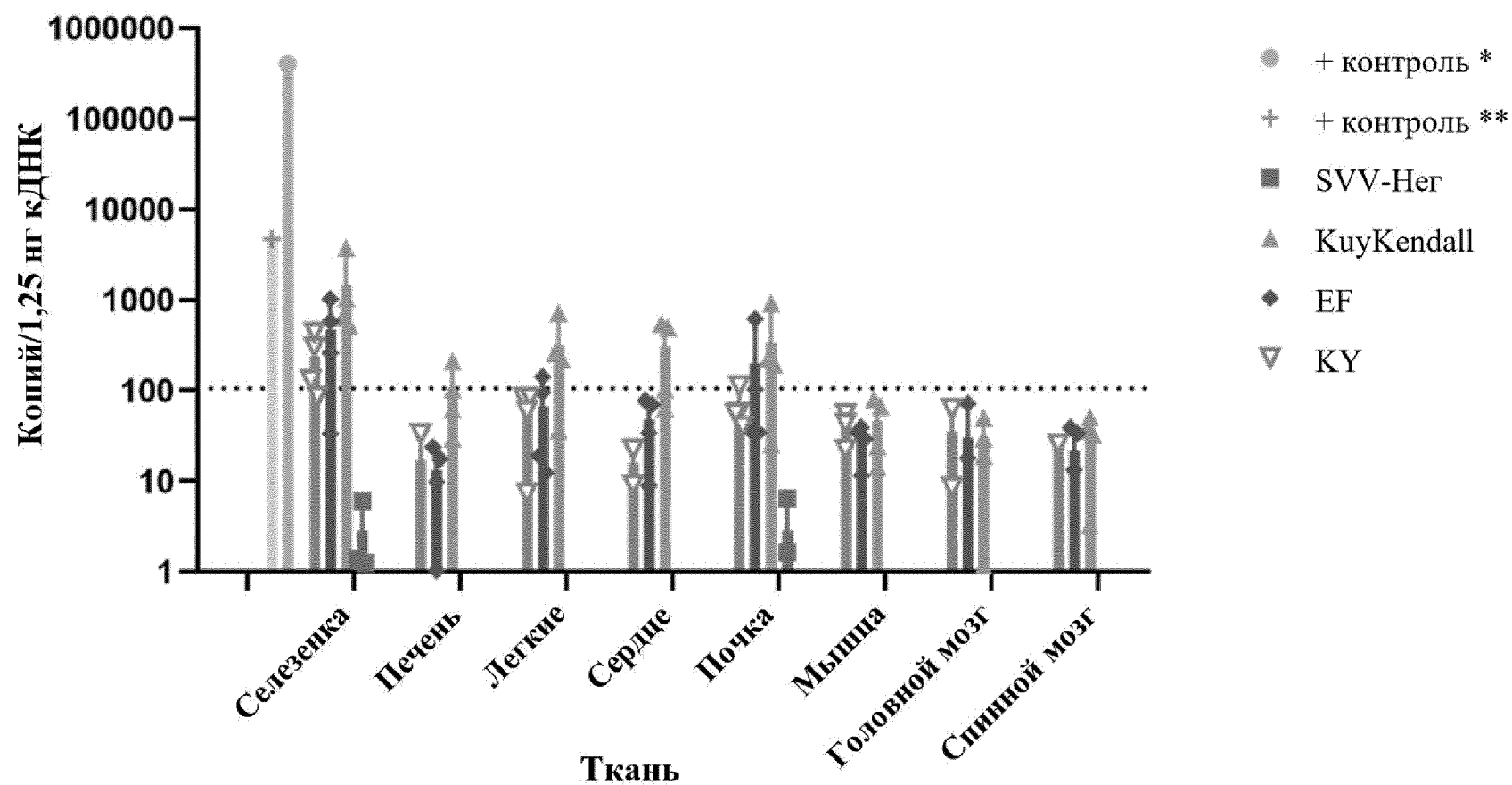


ФИГ. 24



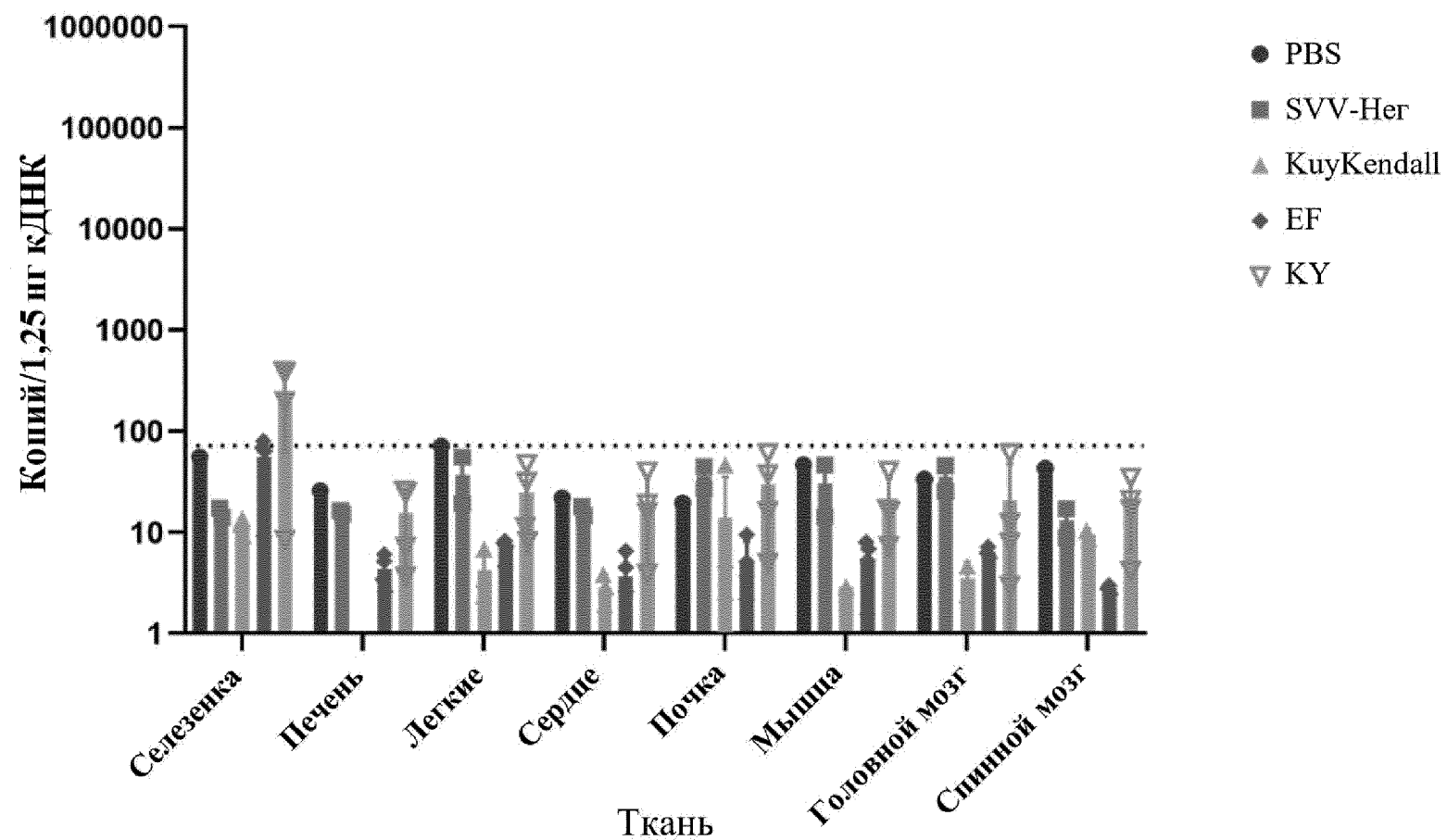
ФИГ. 25А

(-) цепь CVA21 ОТ-кПЦР: 48 ч



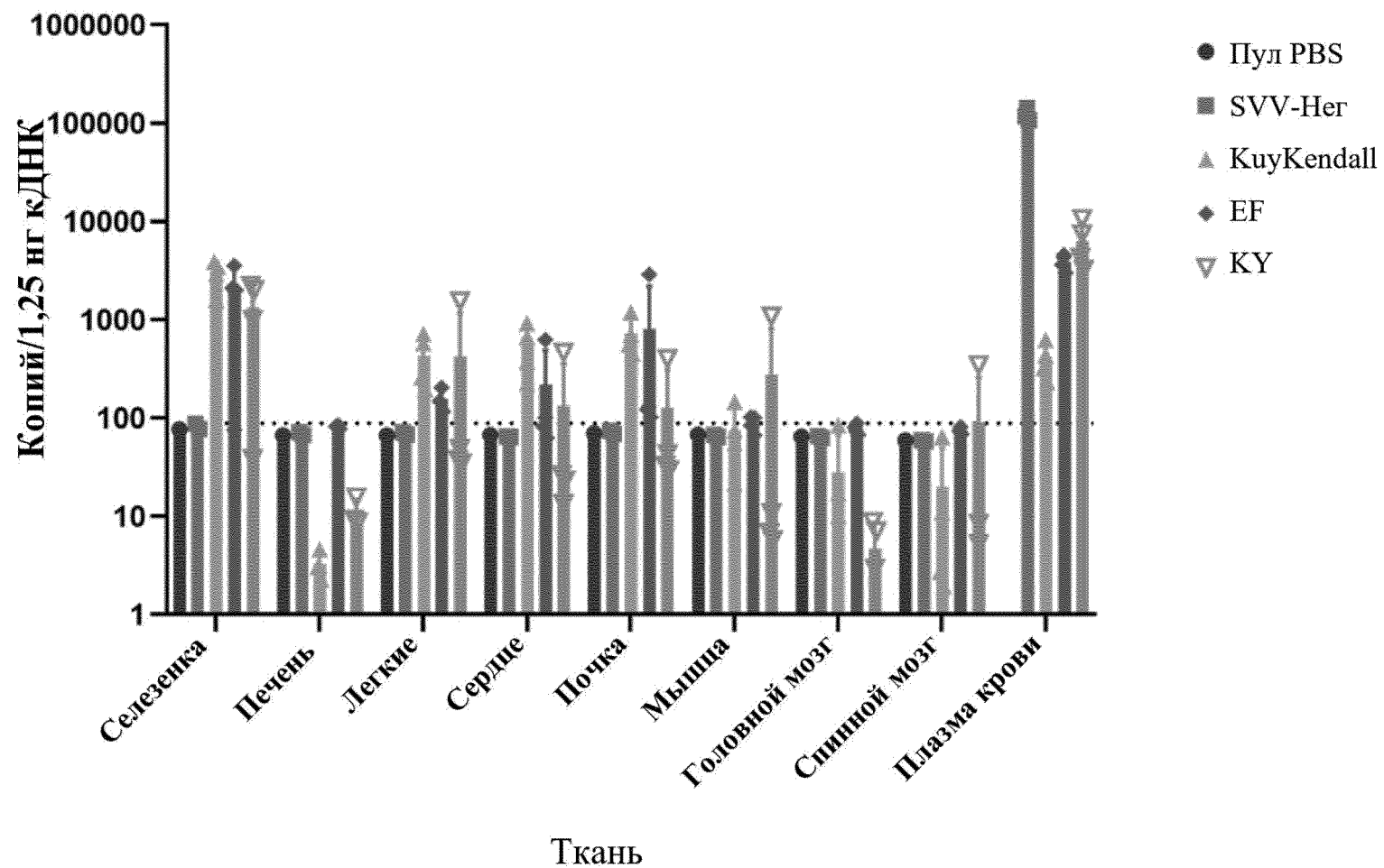
ФИГ. 25В

(-) цепь CVA21 ОТ-кПЦР: 7 дней



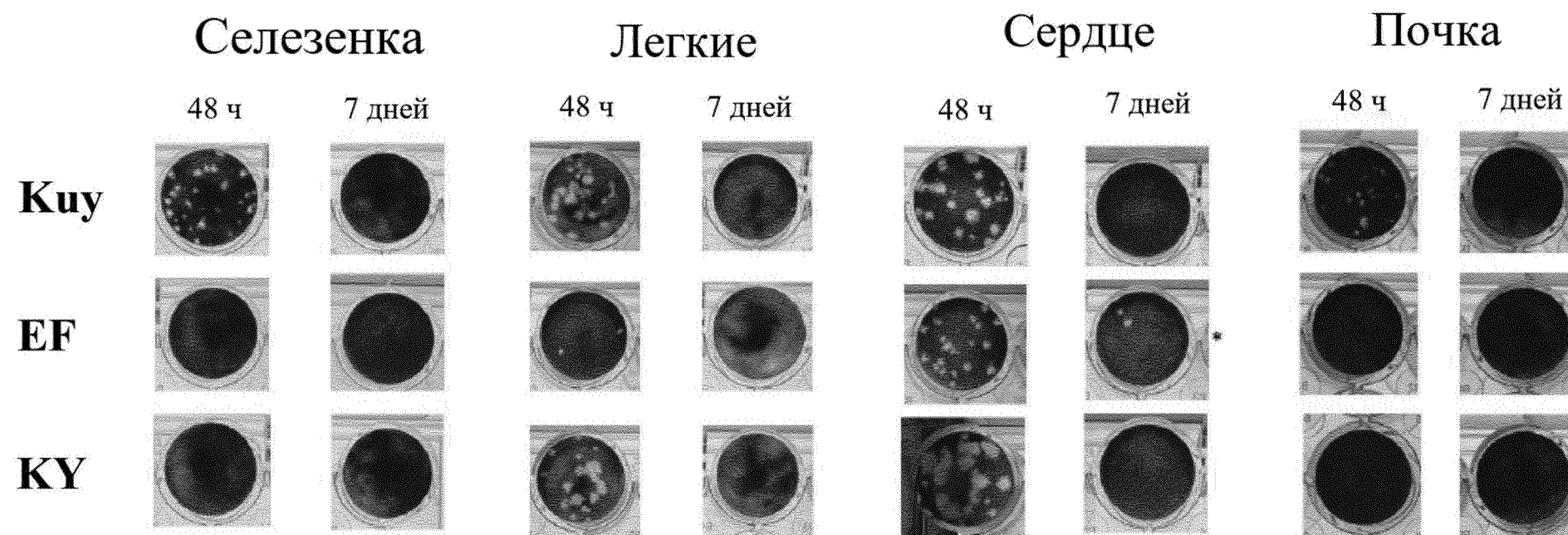
ФИГ. 25С

(+) цепь CVA21 ОТ-кПЦР: 7 дней

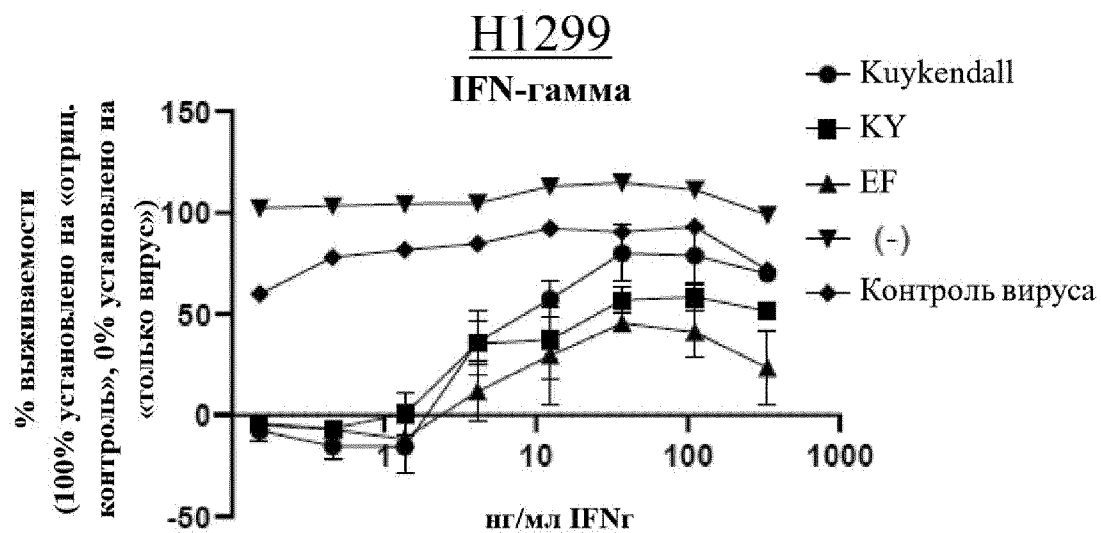
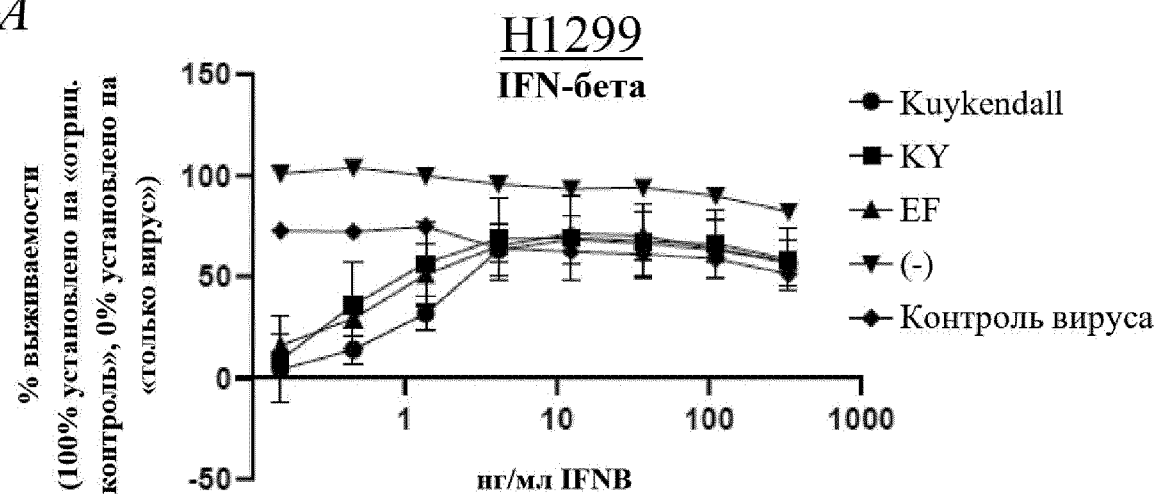


ФИГ. 26

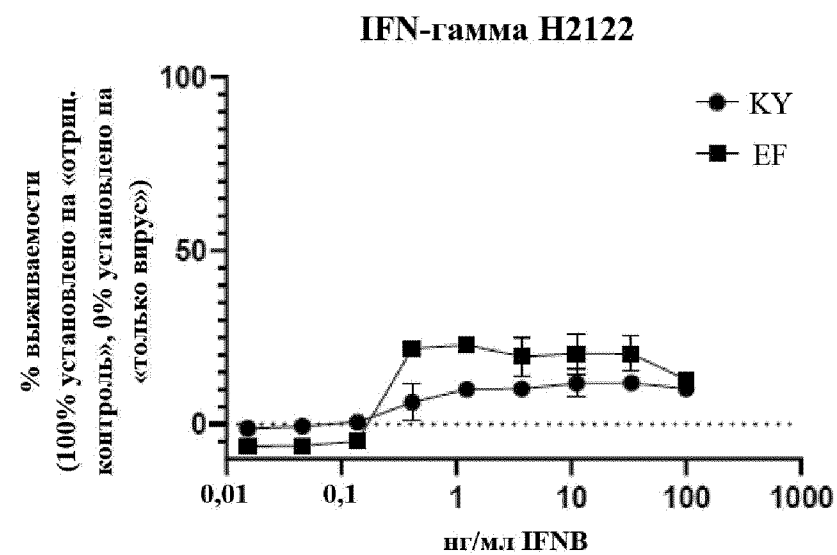
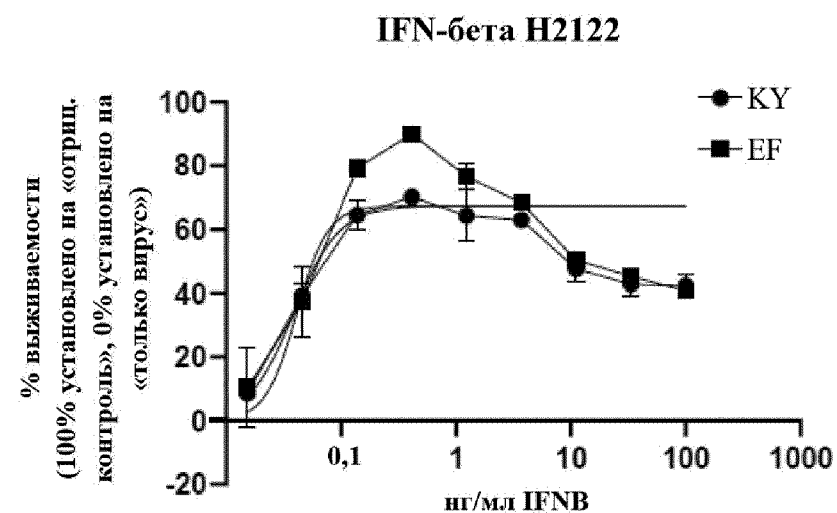
376



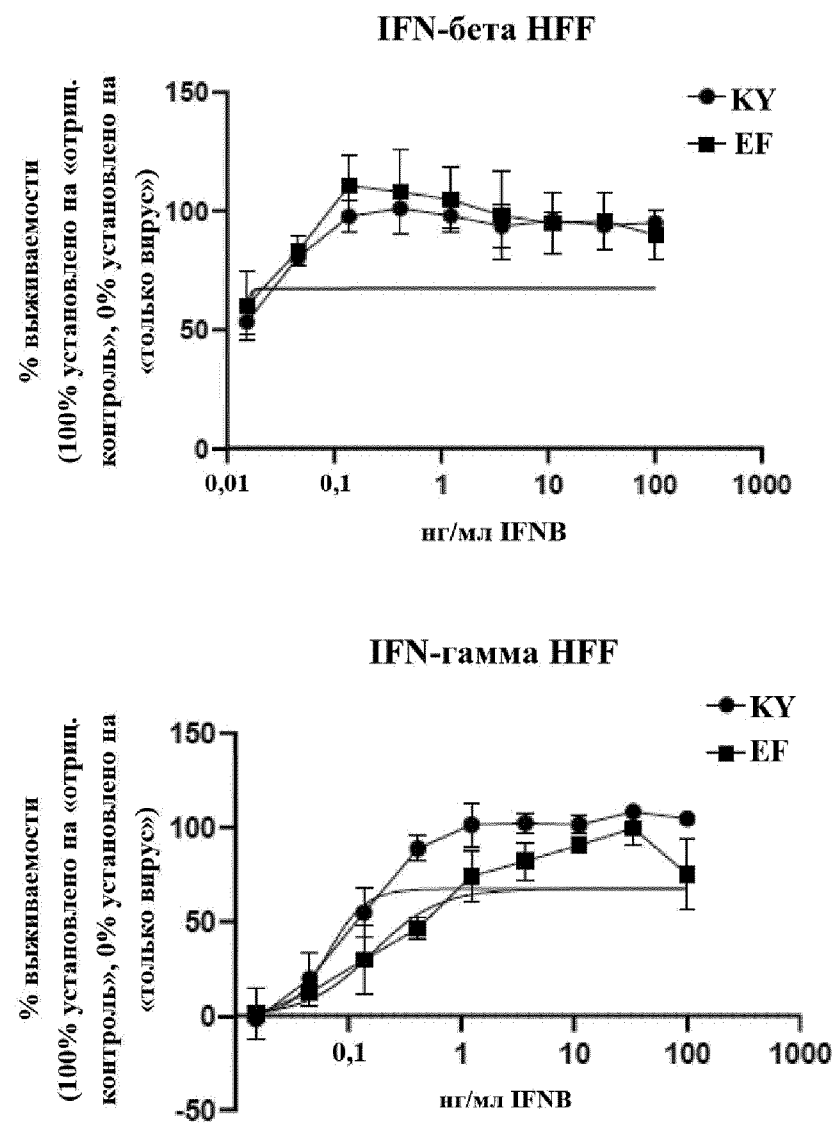
ФИГ. 27А



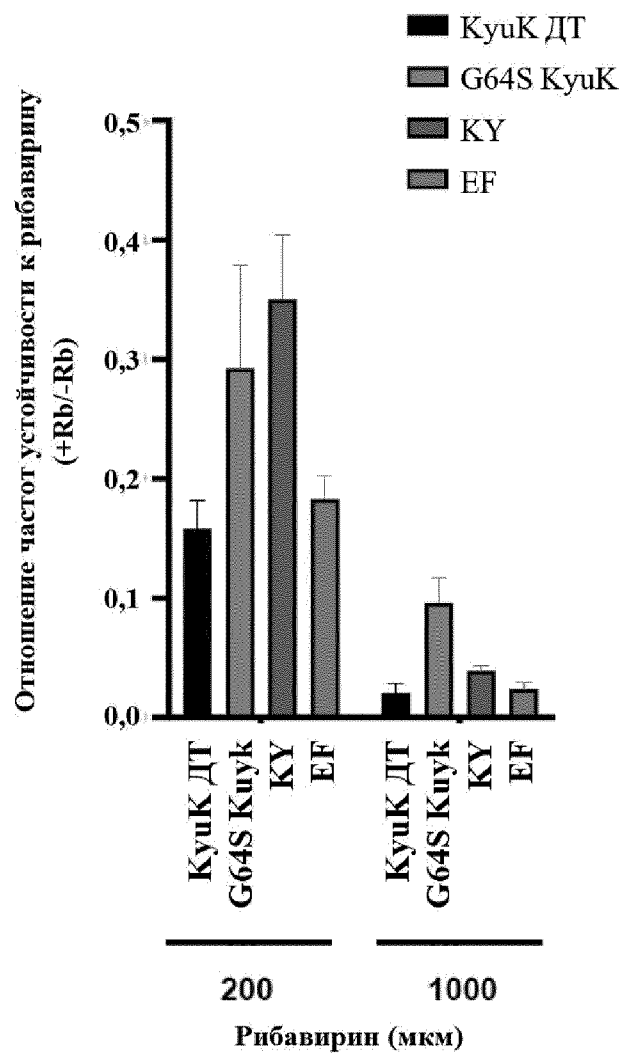
ФИГ. 27В



ФИГ. 27С

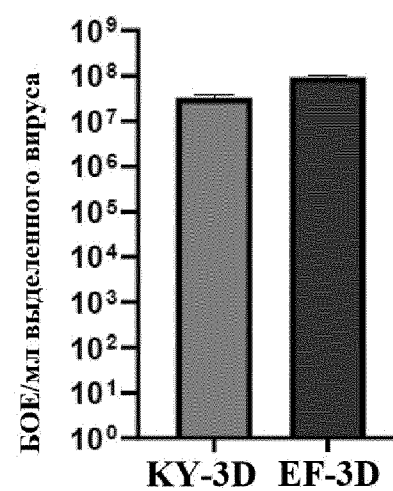


ФИГ. 28А

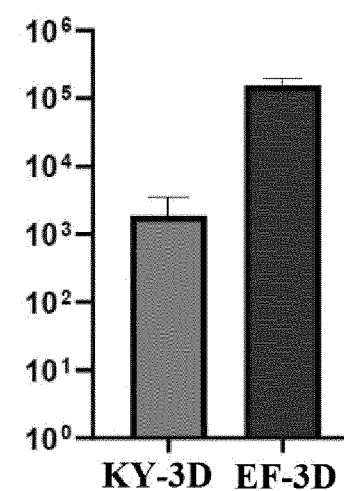


ФИГ. 28В

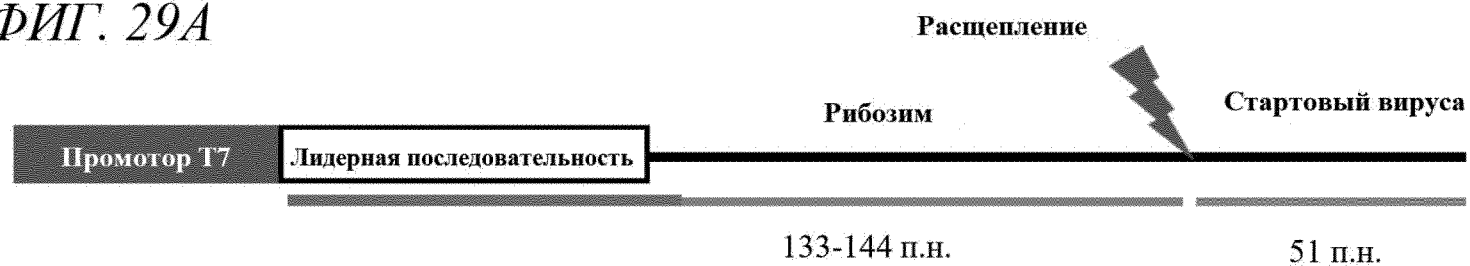
Контроль ДТ, Трансфекция



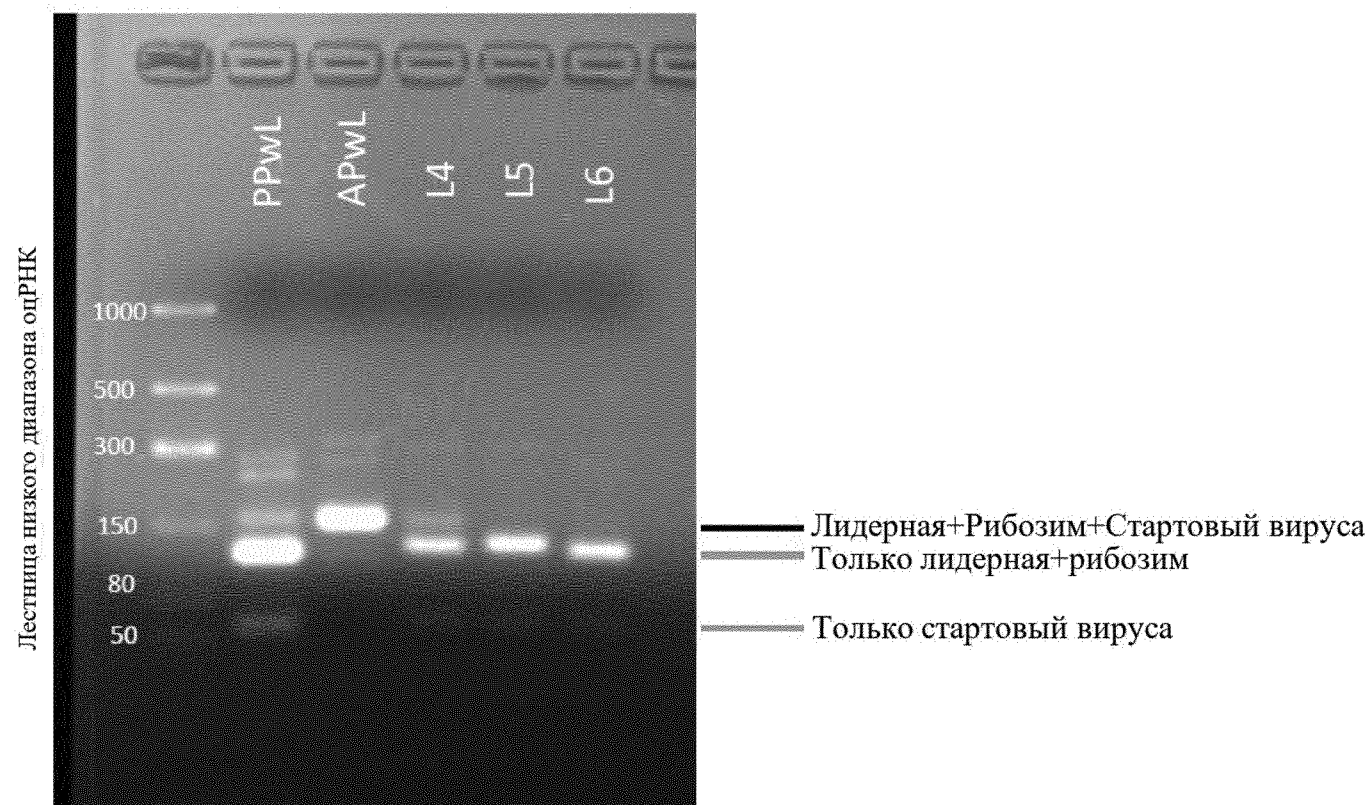
Анализ рекомбинации



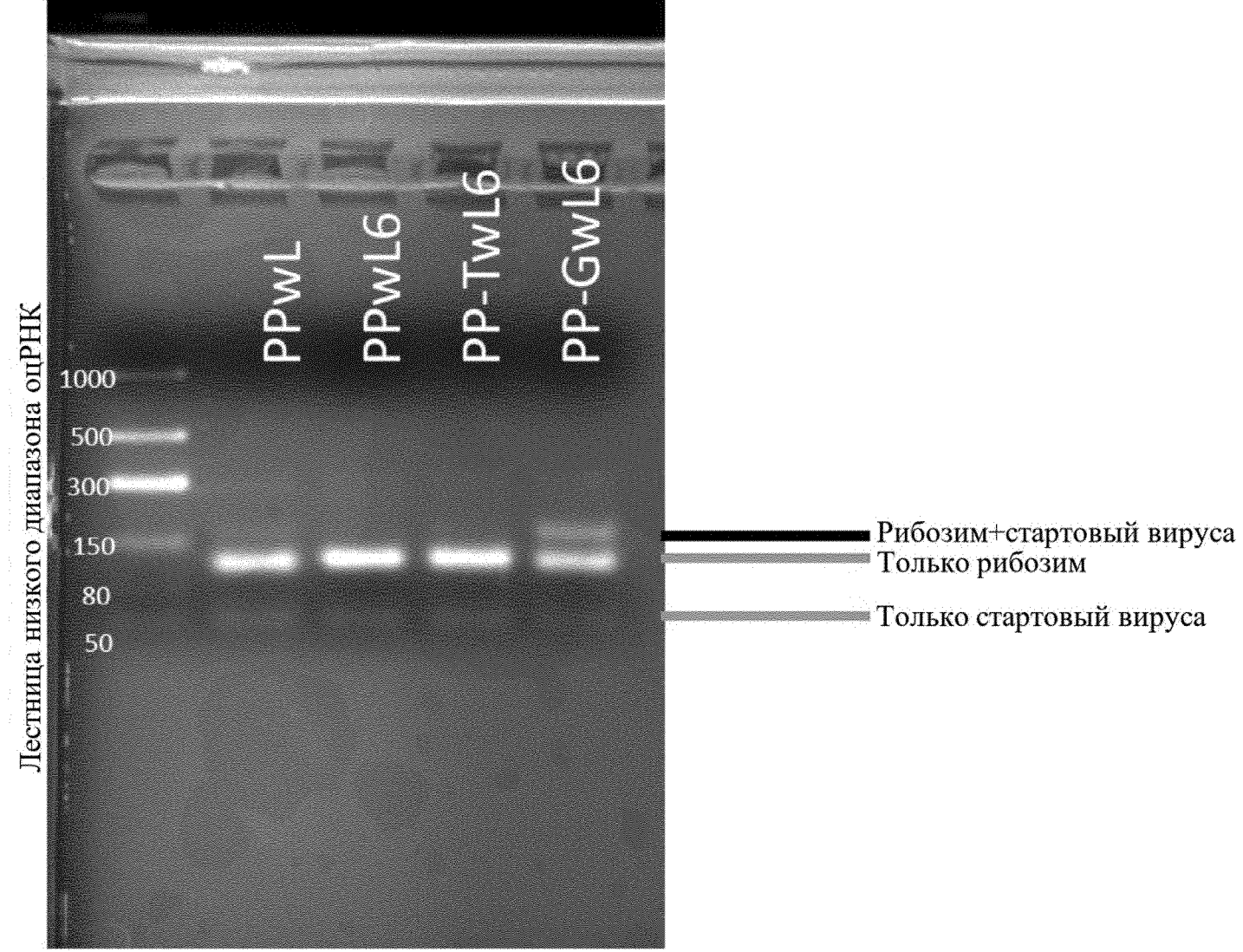
ФИГ. 29А



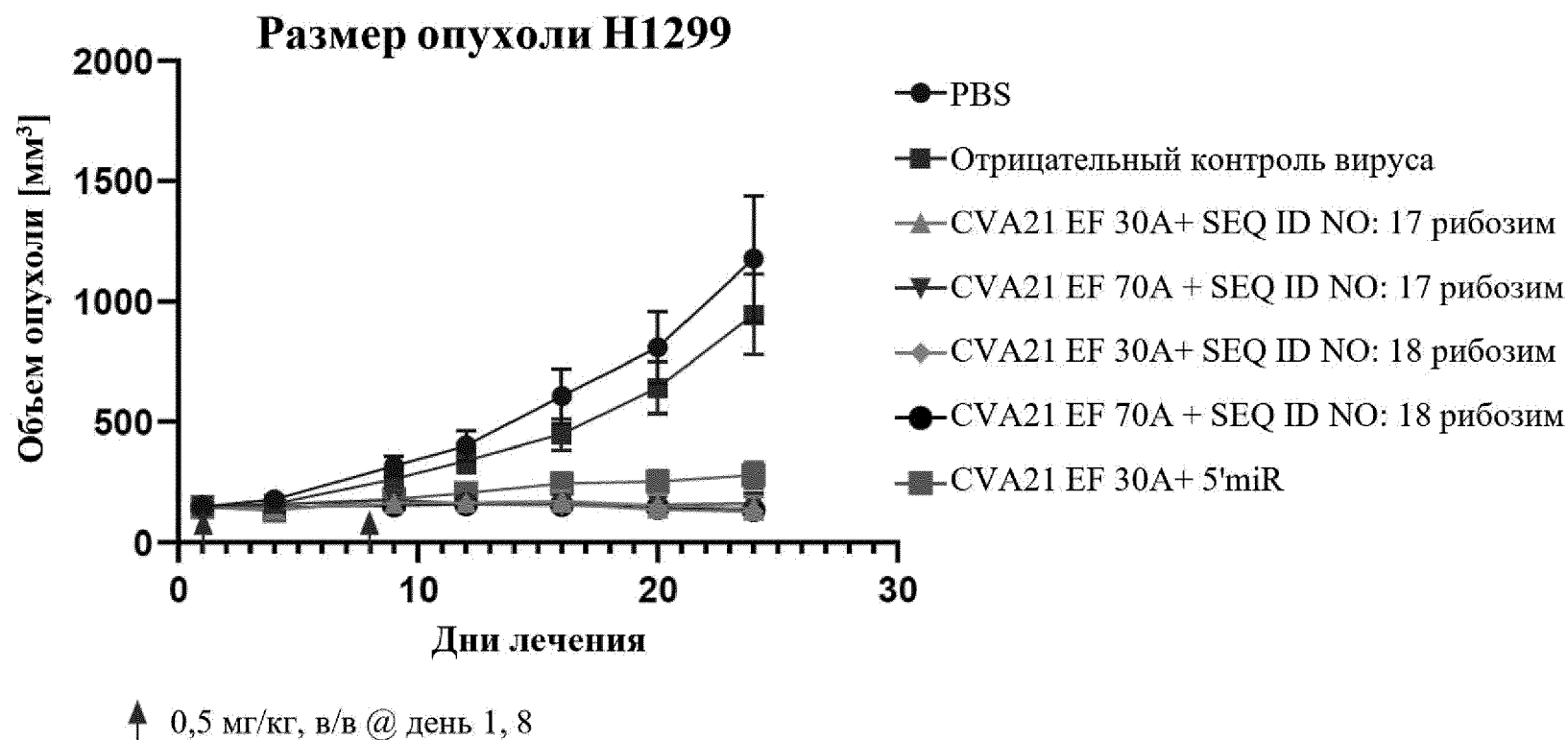
ФИГ. 29В



ФИГ. 30



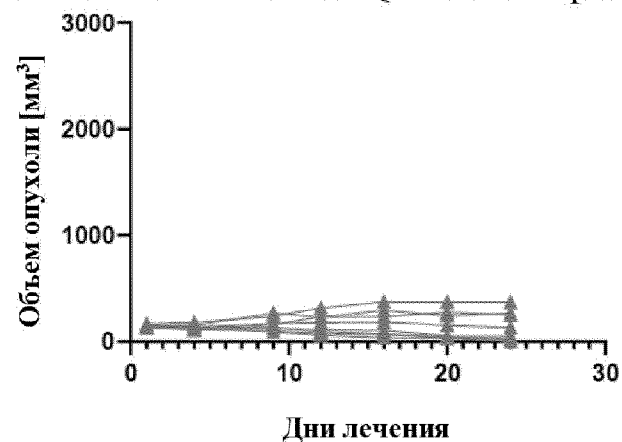
ФИГ. 31А



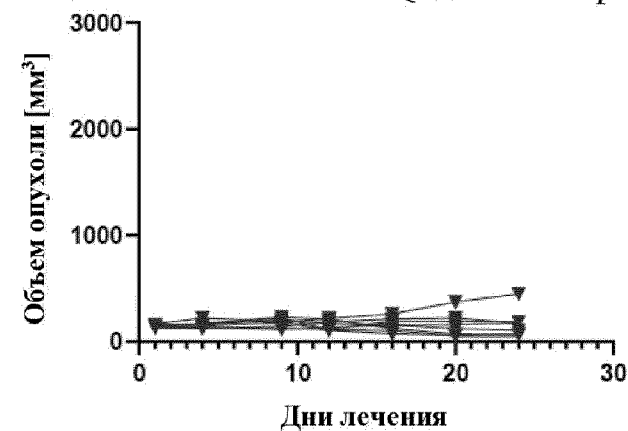
ФИГ. 31В

Размер опухоли H1299

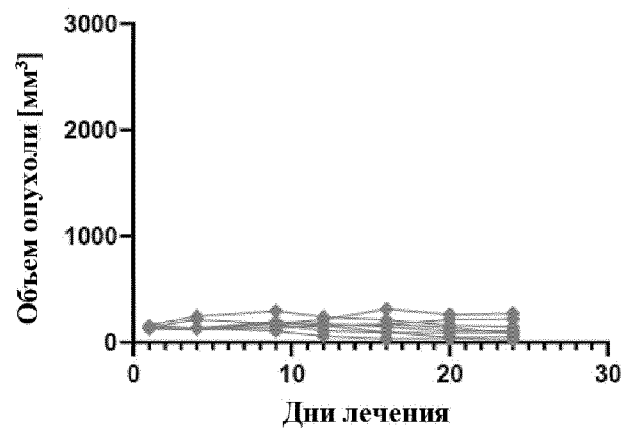
CVA21 EF 30 пА + SEQ ID NO: 17 рибозим



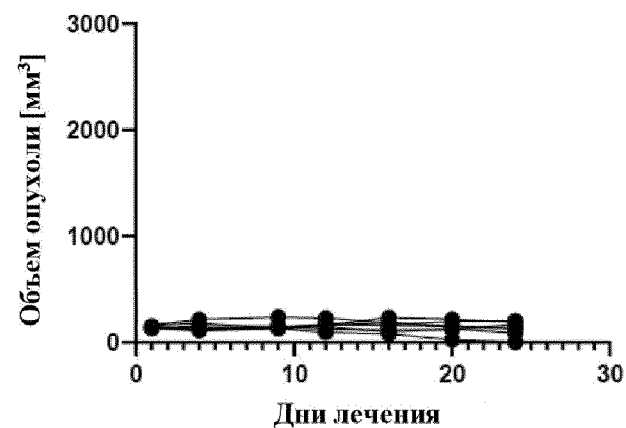
CVA21 EF 70 пА + SEQ ID NO: 17 рибозим



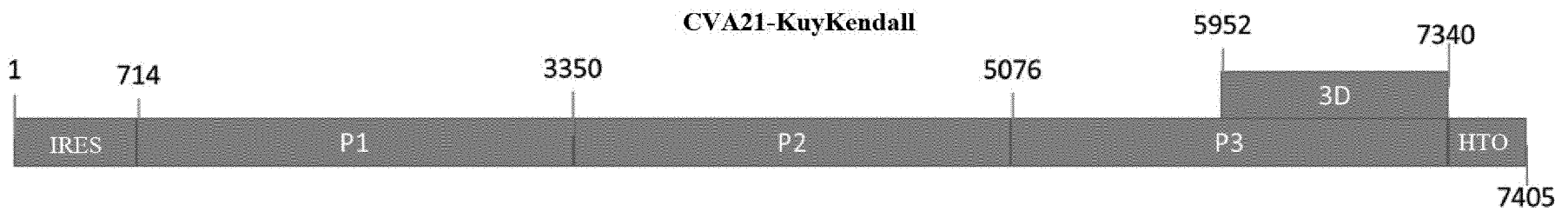
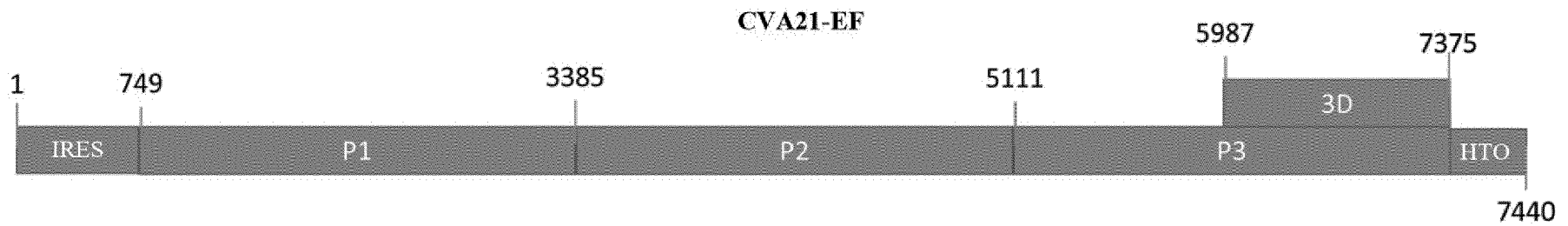
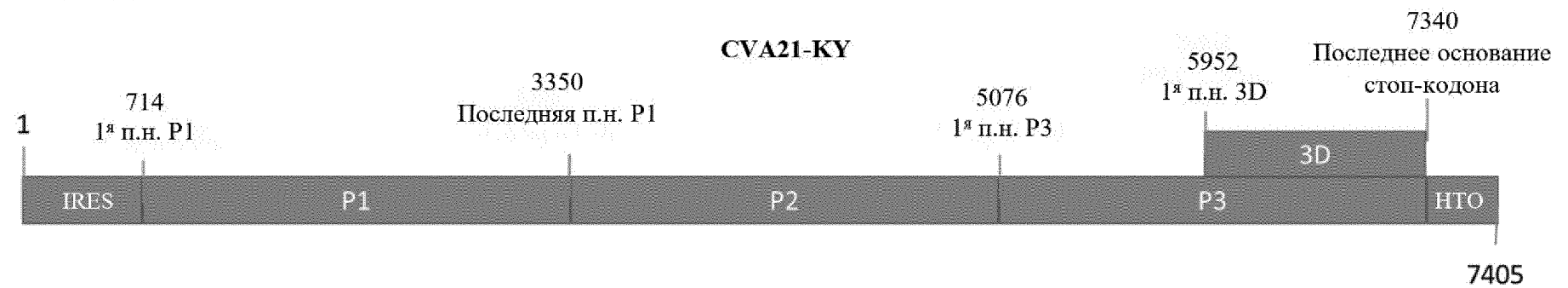
CVA21 EF 30 пА + SEQ ID NO: 18 рибозим



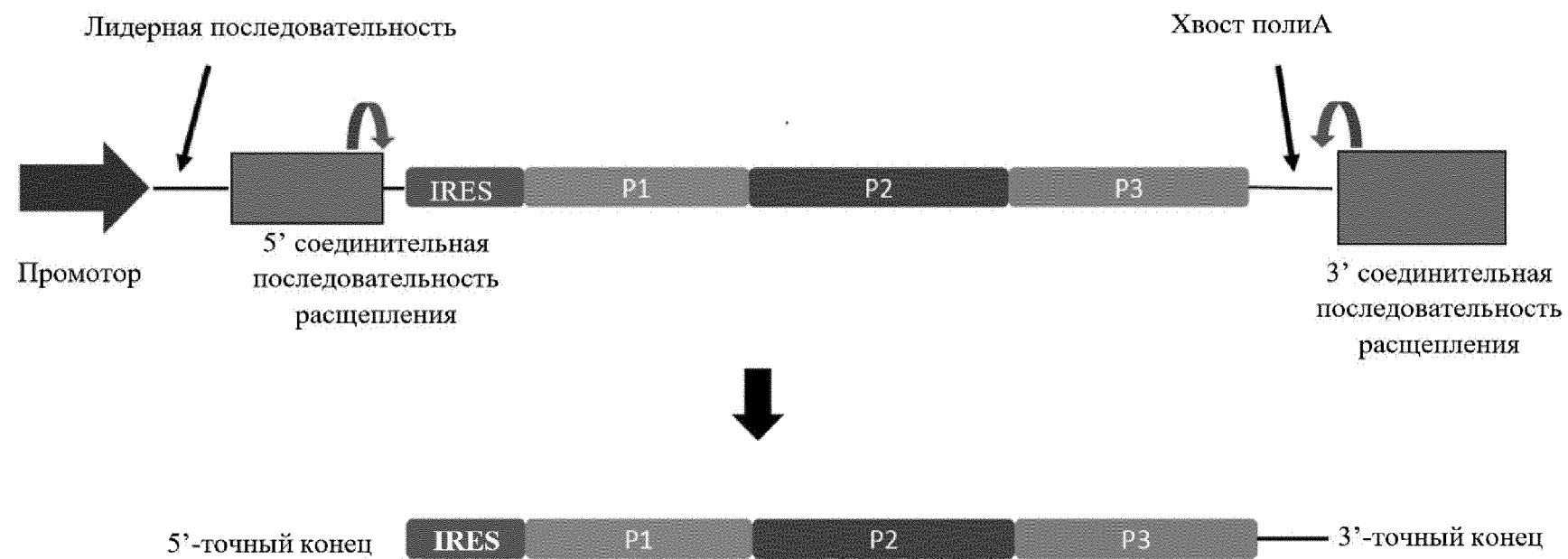
CVA21 EF 70 пА + SEQ ID NO: 18 рибозим



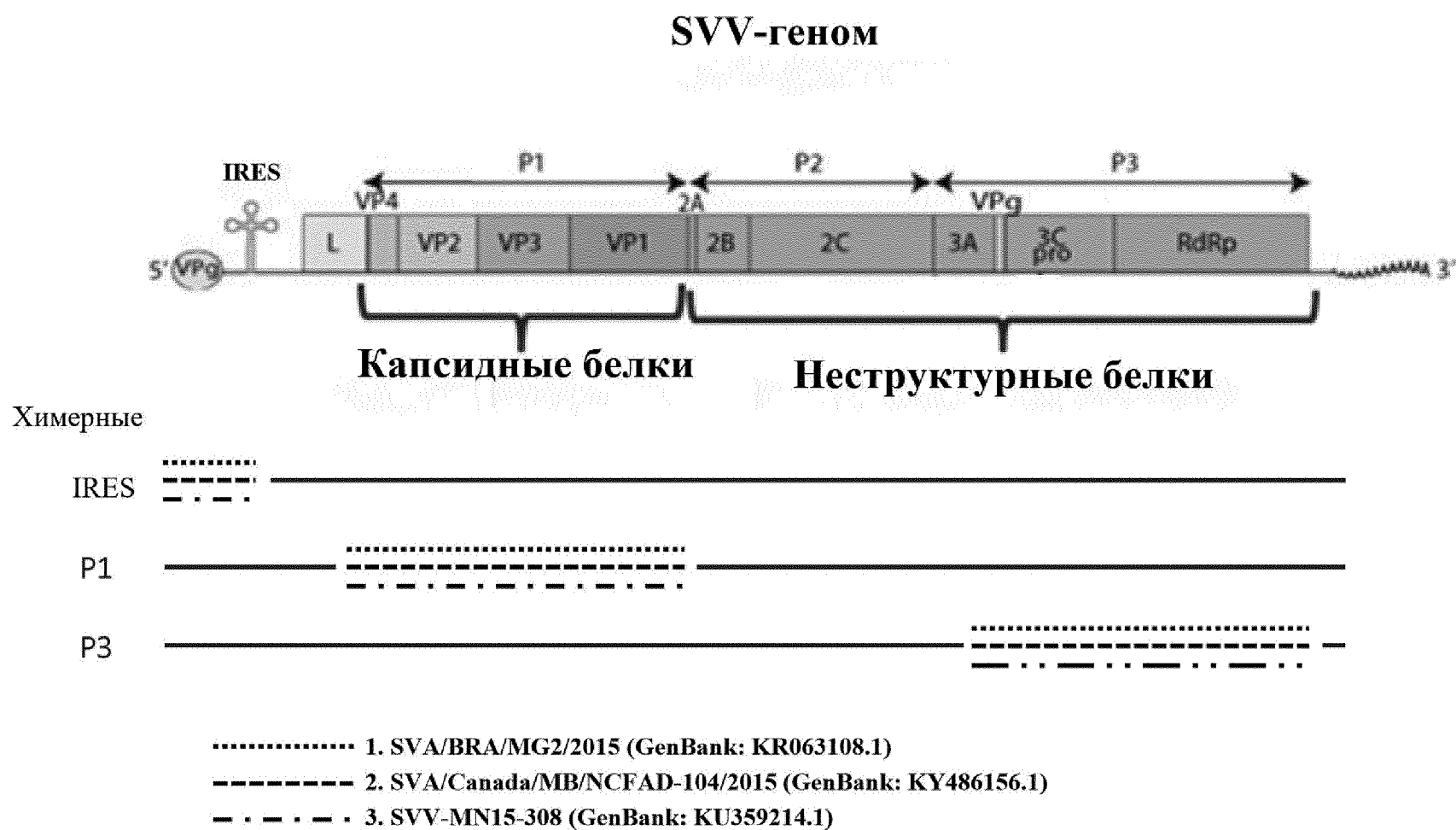
ФИГ. 32



ФИГ. 33

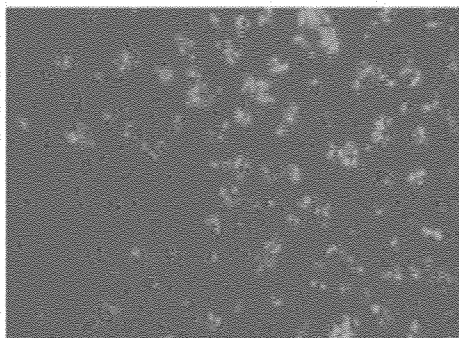


ФИГ. 34

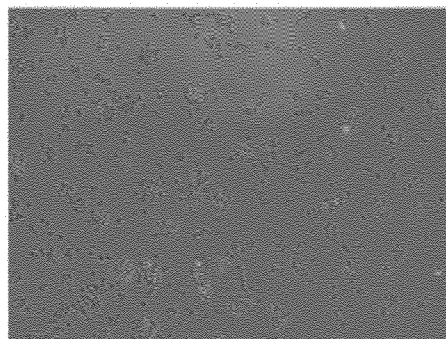


ФИГ. 35

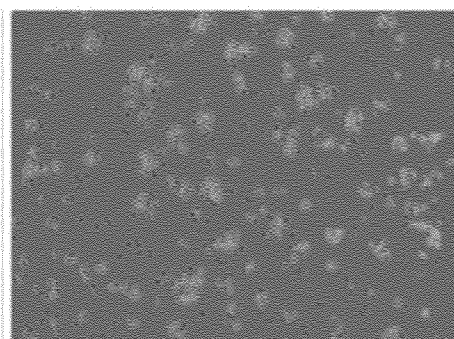
SVV-001 GFP



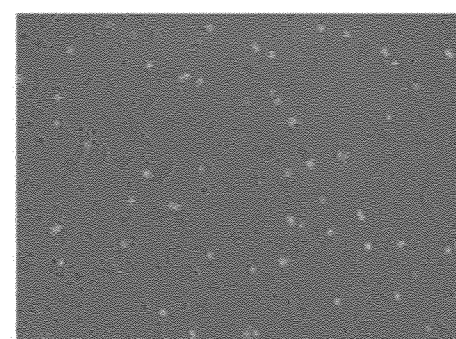
SVV-GFP IRES 1



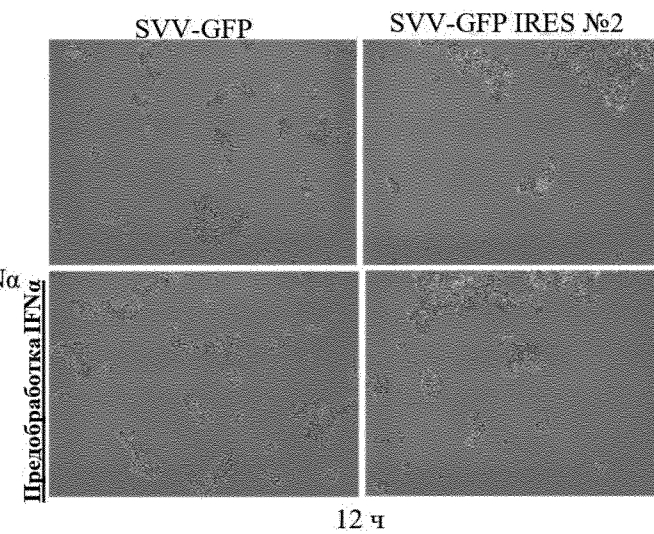
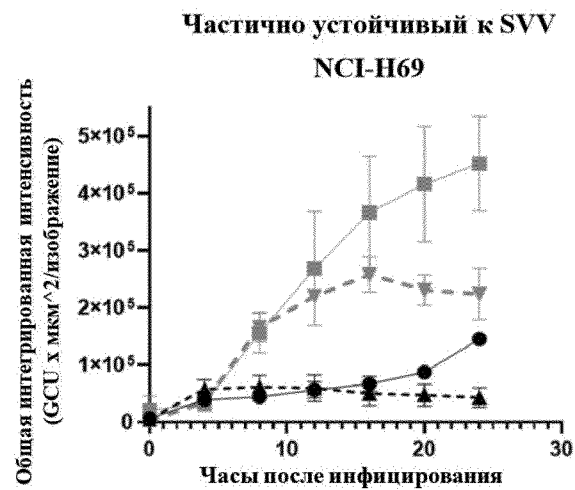
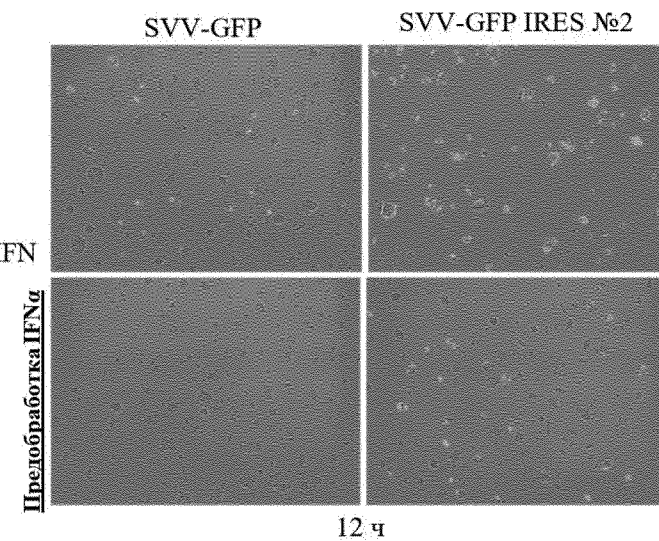
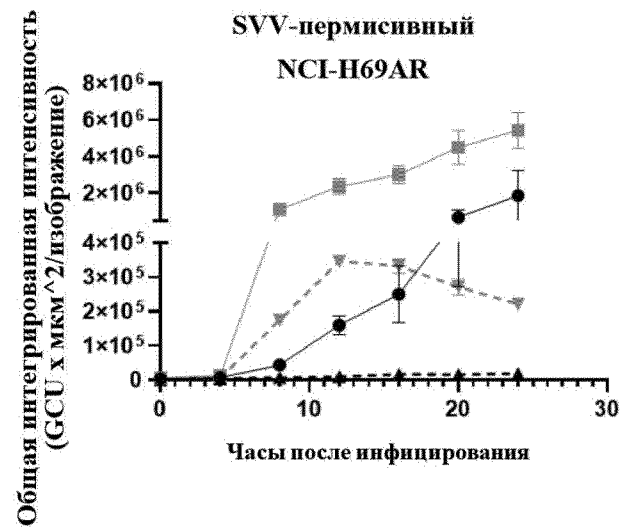
SVV-GFP IRES 2



SVV-GFP IRES 3

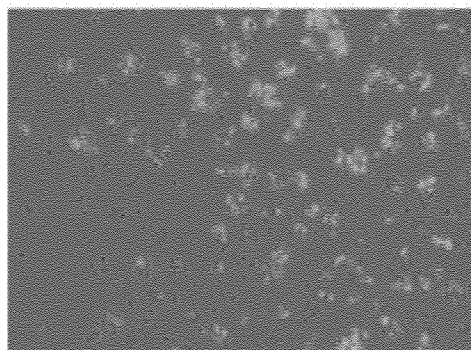


ФИГ. 36

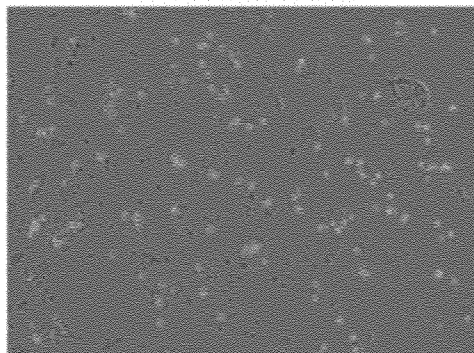


Фиг. 37

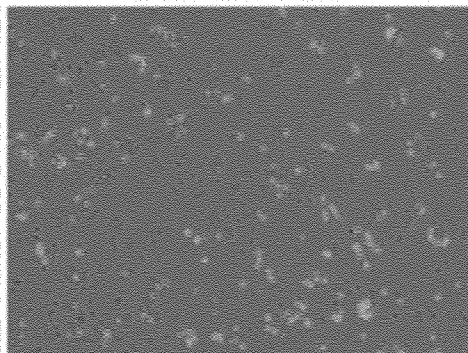
SVV-001 GFP



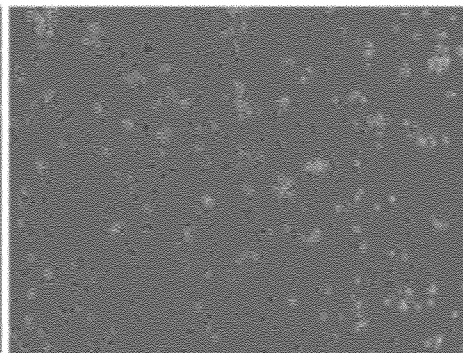
SVV-GFP P1-1



SVV-GFP P1-2

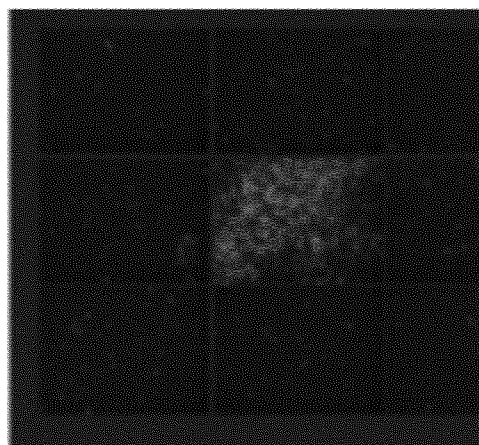


SVV-GFP P1-3

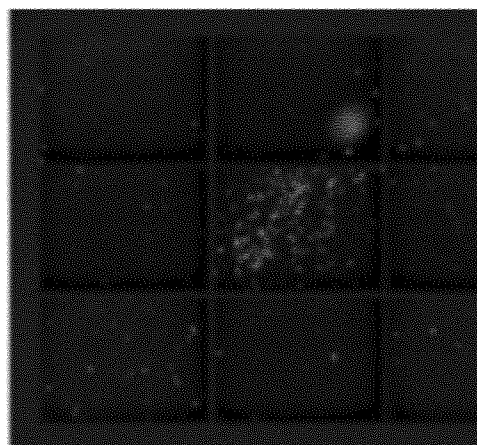


ФИГ. 38А

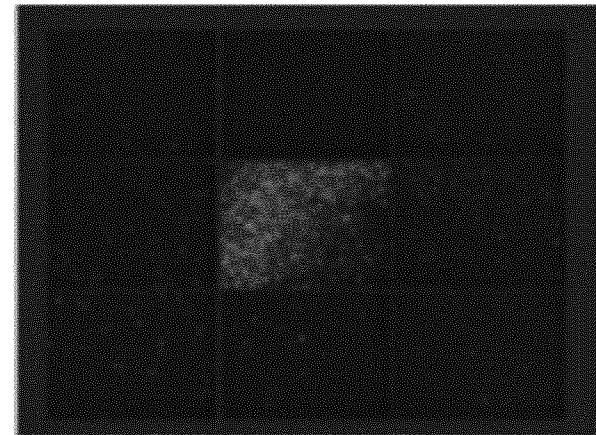
SVV-001-GFP



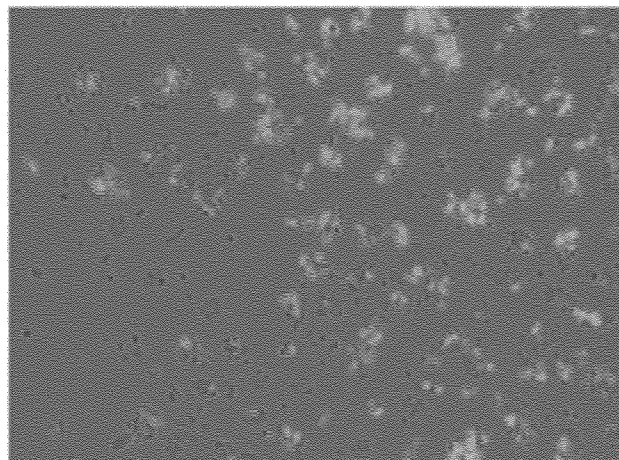
SVV-001-GFP-P3-1



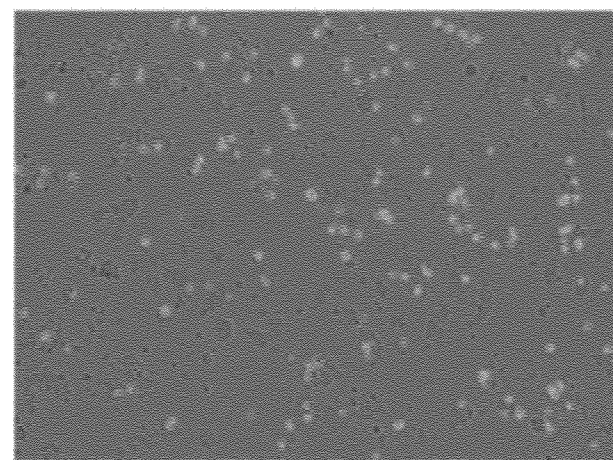
SVV-001-GFP-P3-3

*ФИГ. 38В*

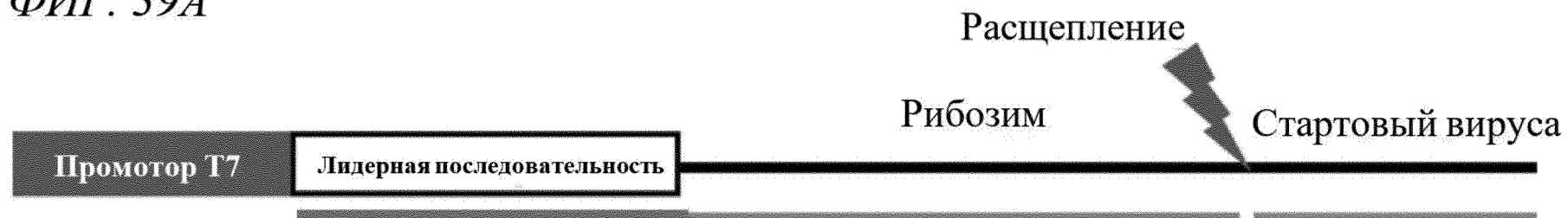
SVV-001 GFP



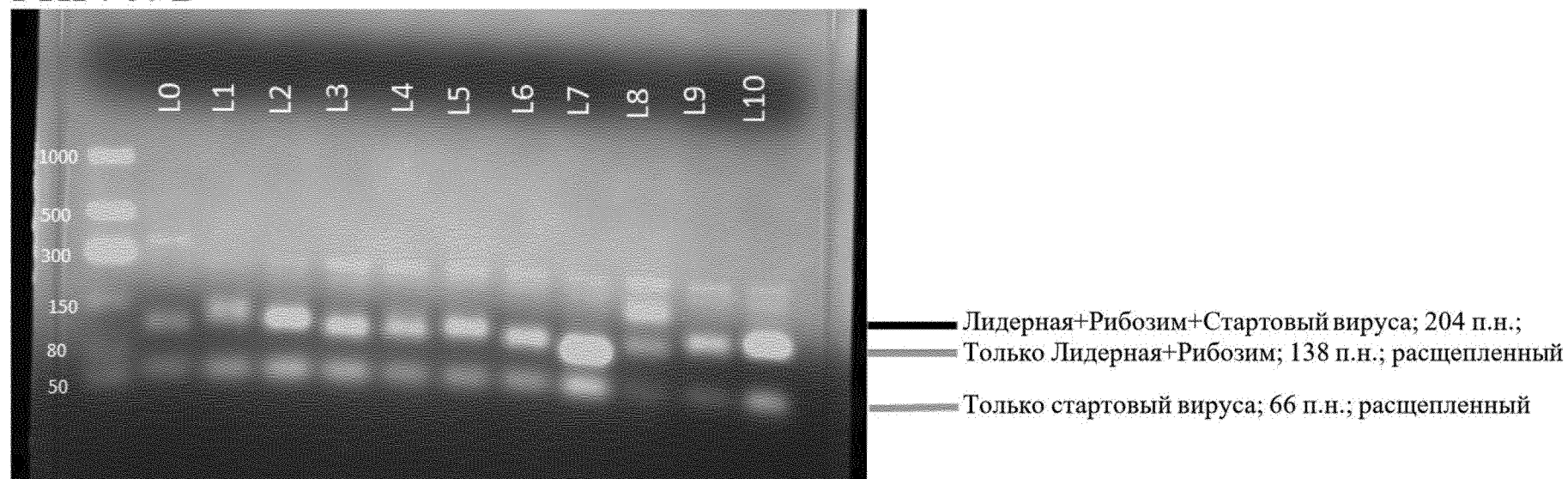
SVV-GFP P3-2



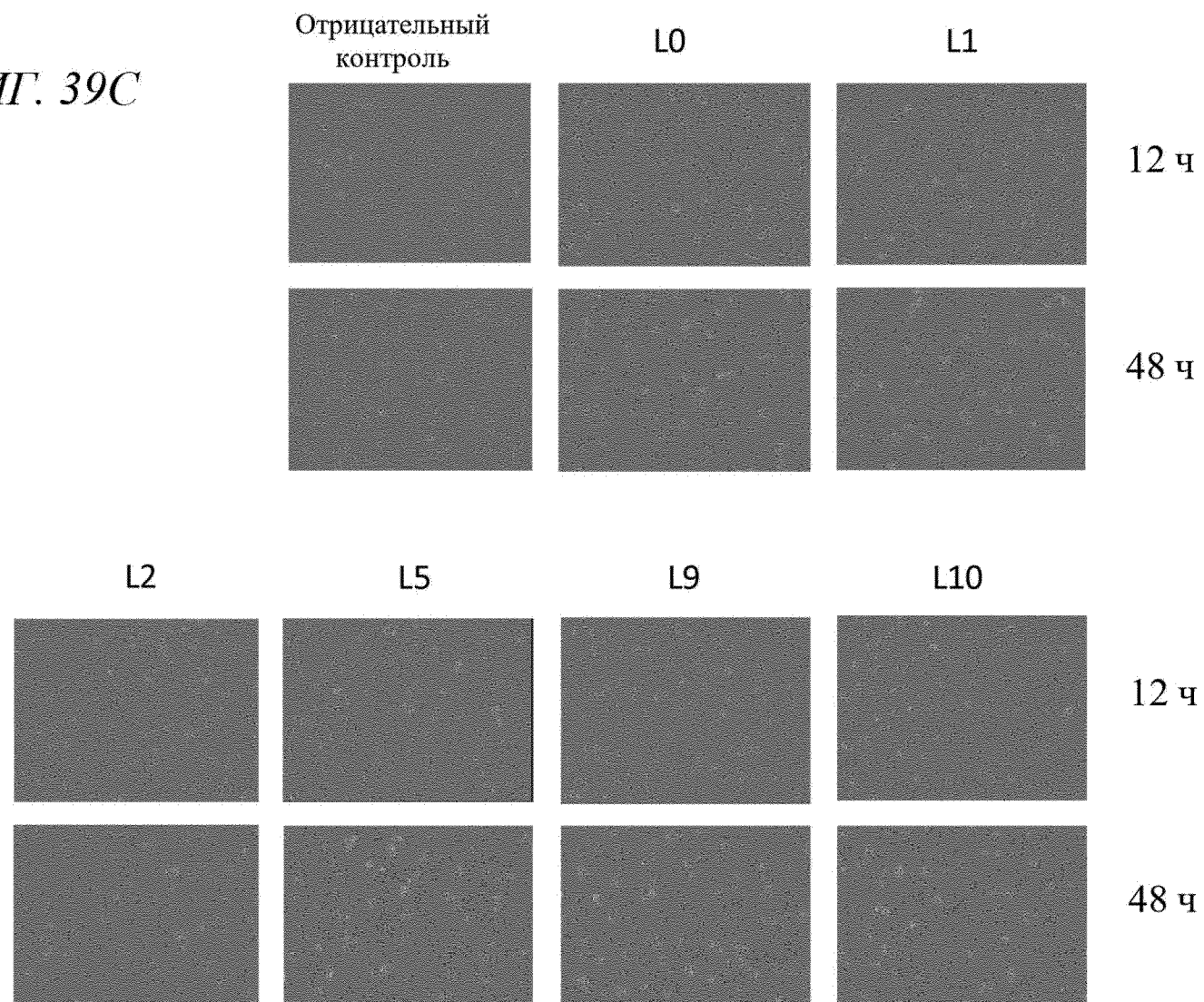
ФИГ. 39А



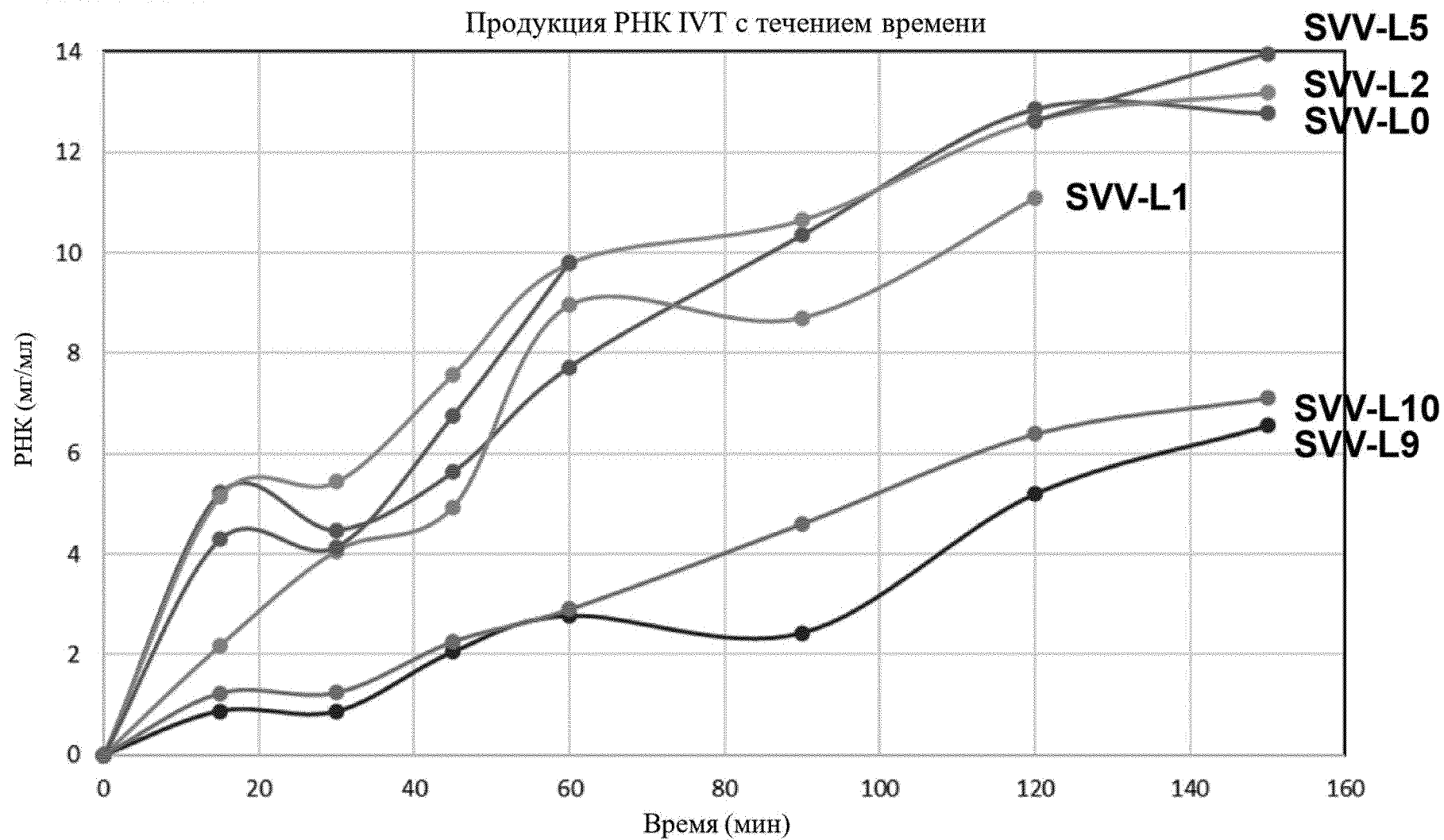
ФИГ. 39В



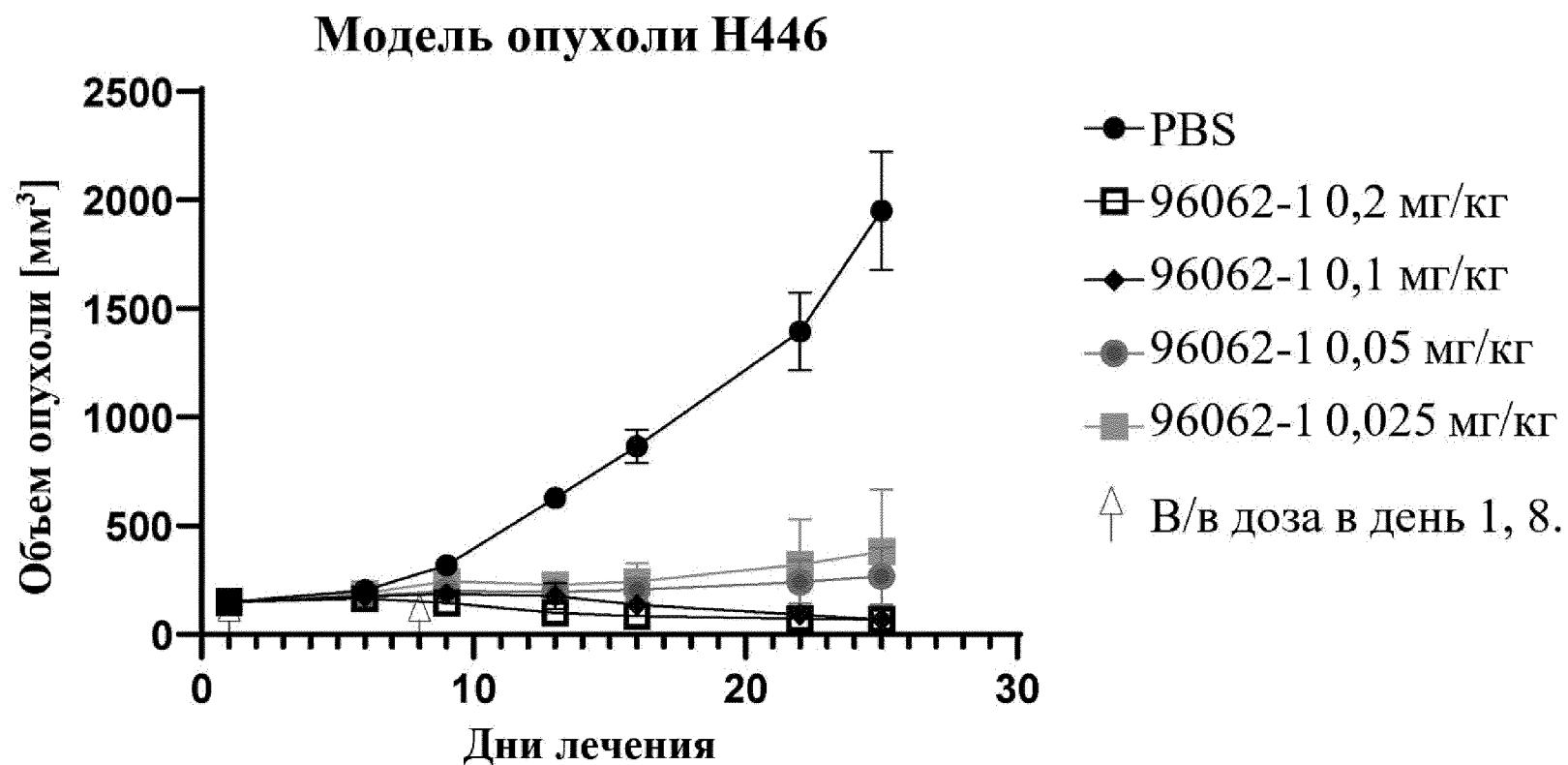
ФИГ. 39С



ФИГ. 39D

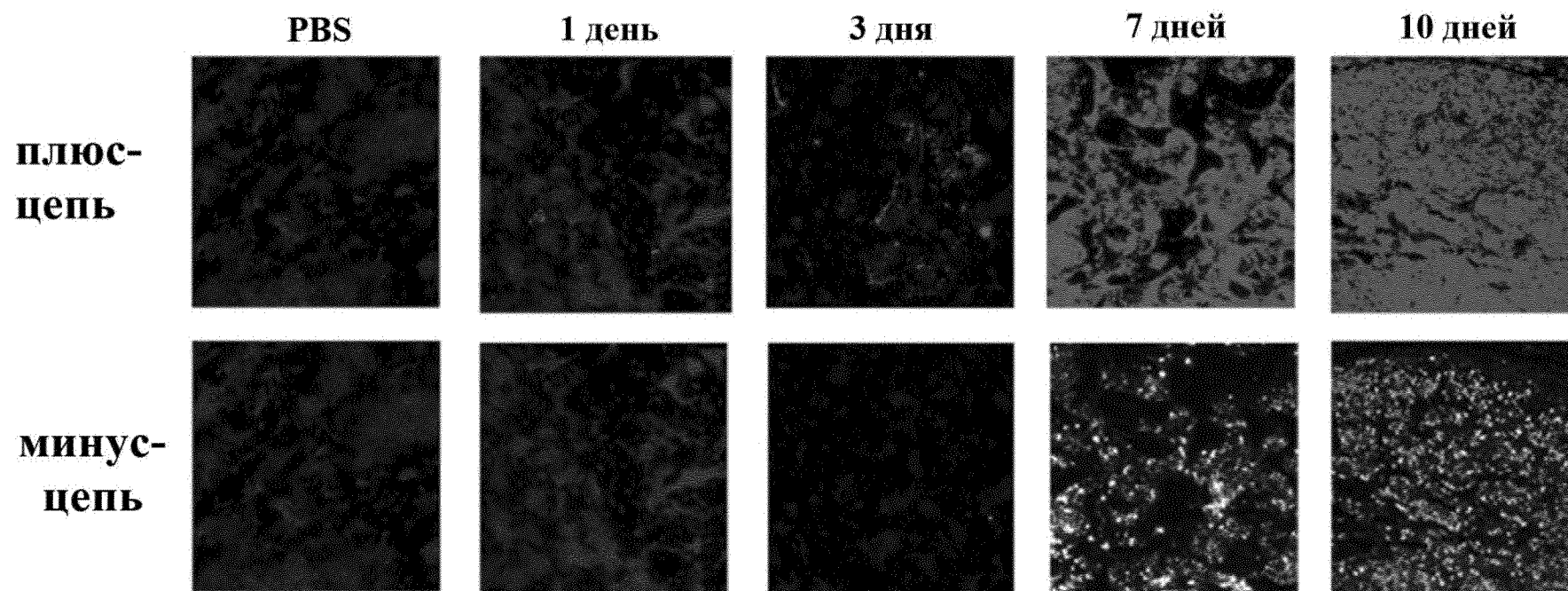


ФИГ. 40А

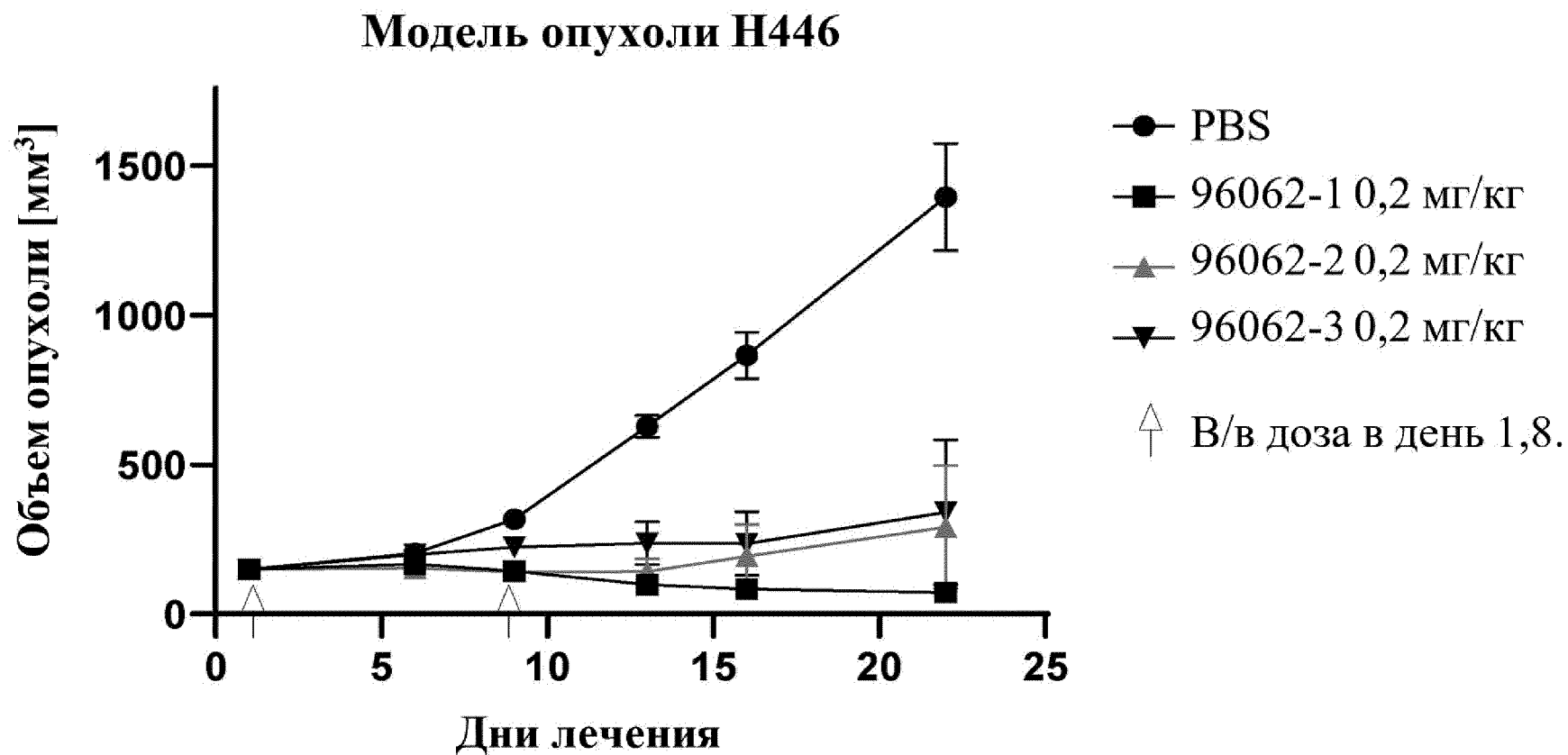


ФИГ. 40В

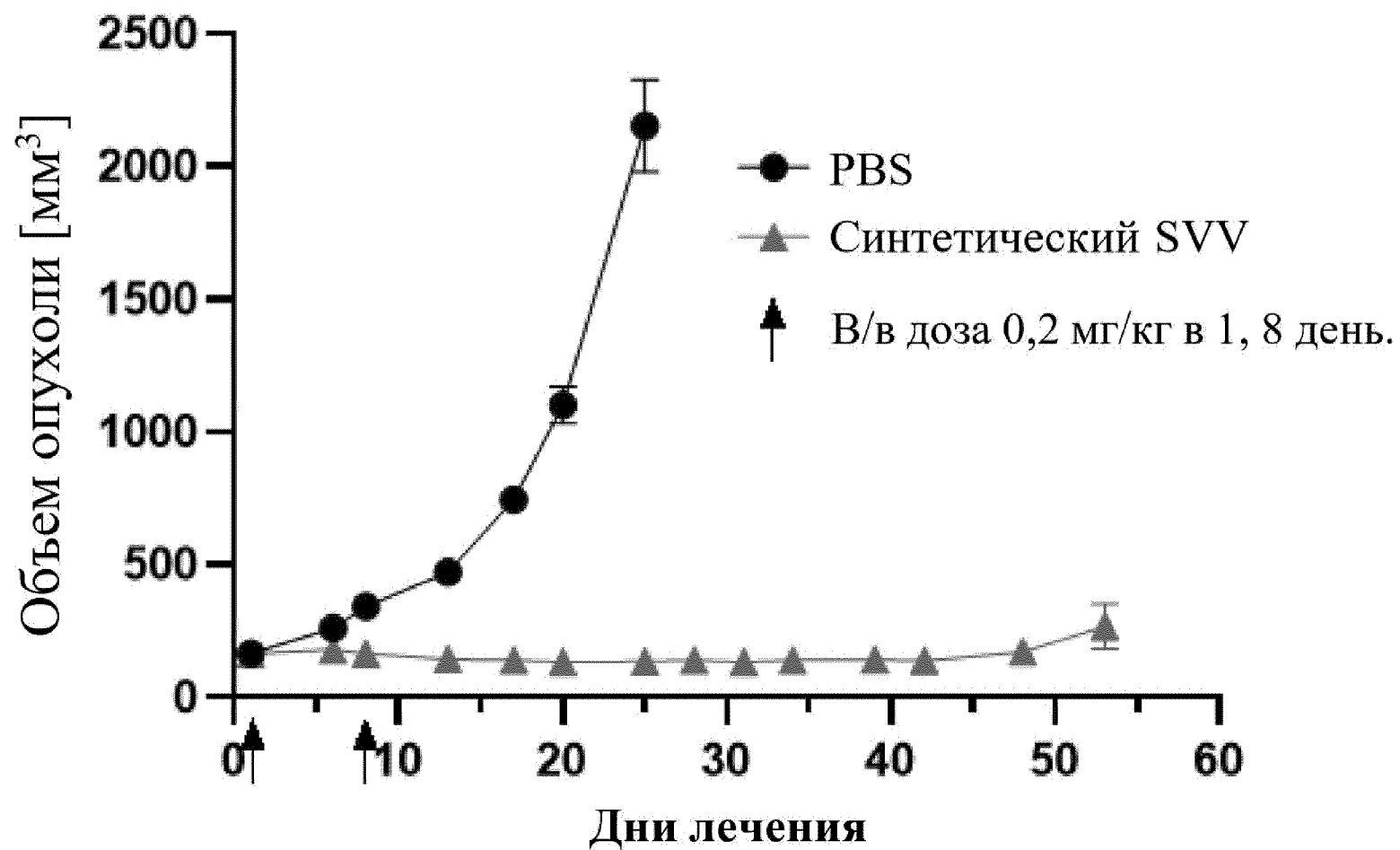
ФИГ. 40С



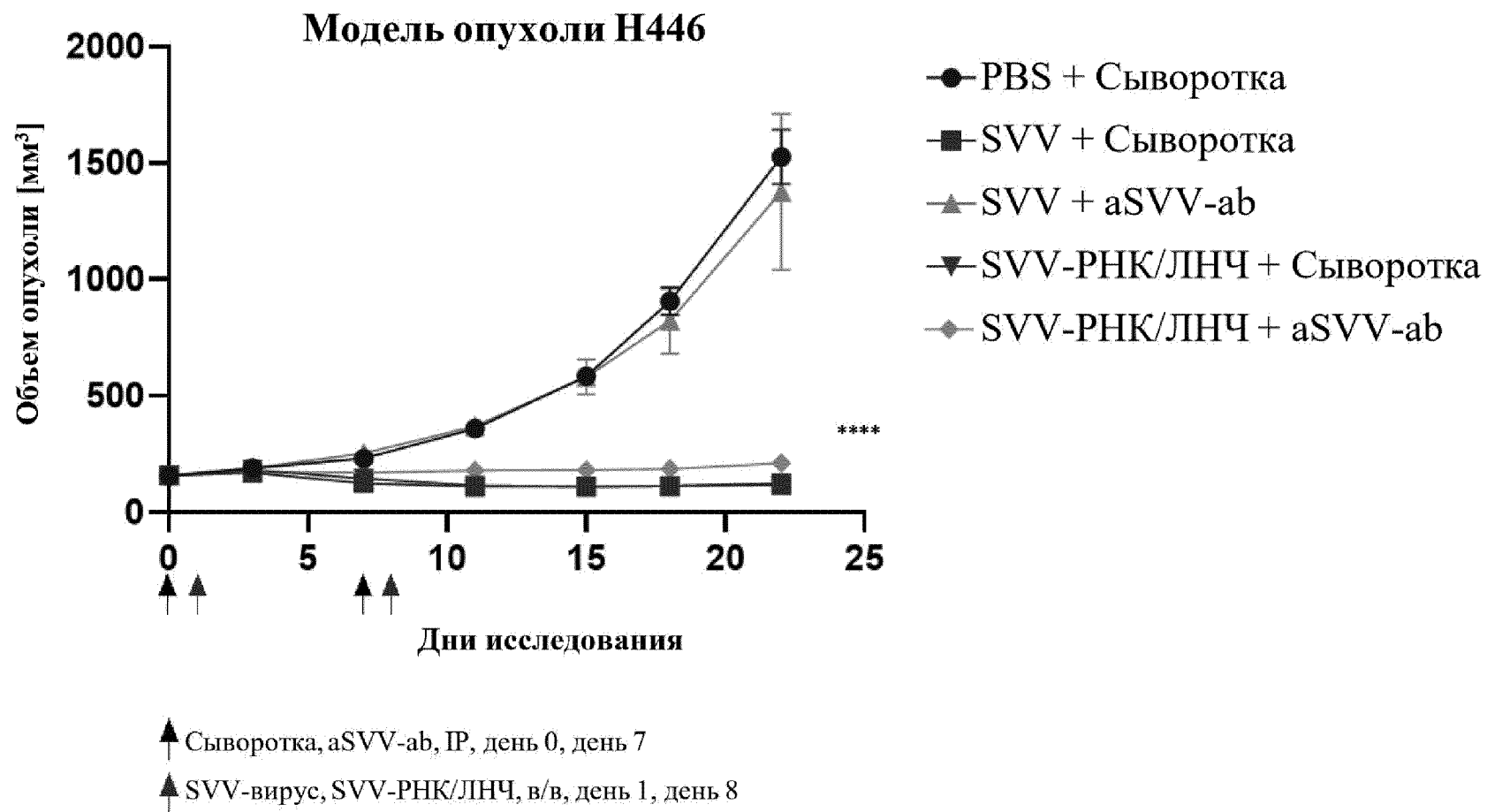
ФИГ. 41



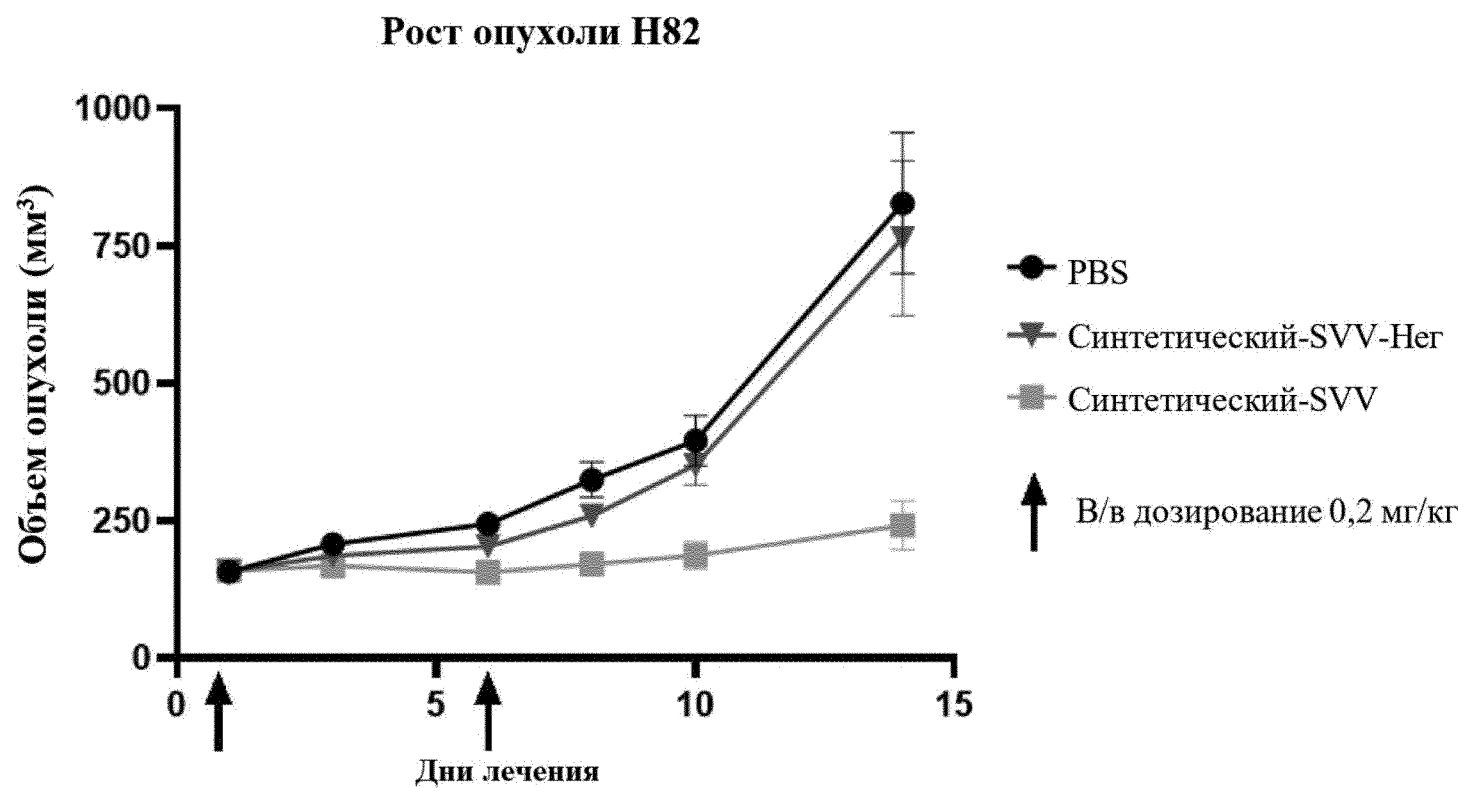
ФИГ. 42



ФИГ. 43

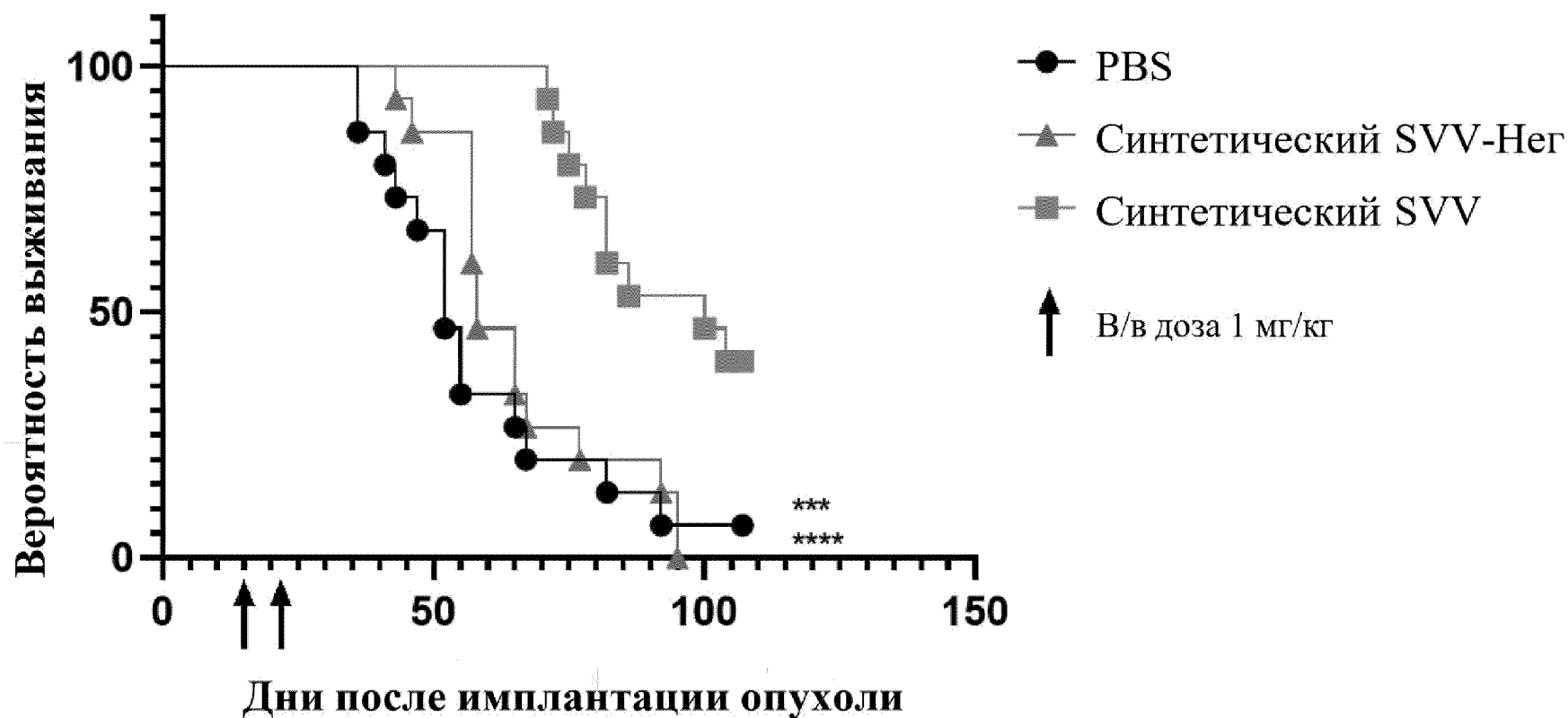


ФИГ. 44



ФИГ. 45

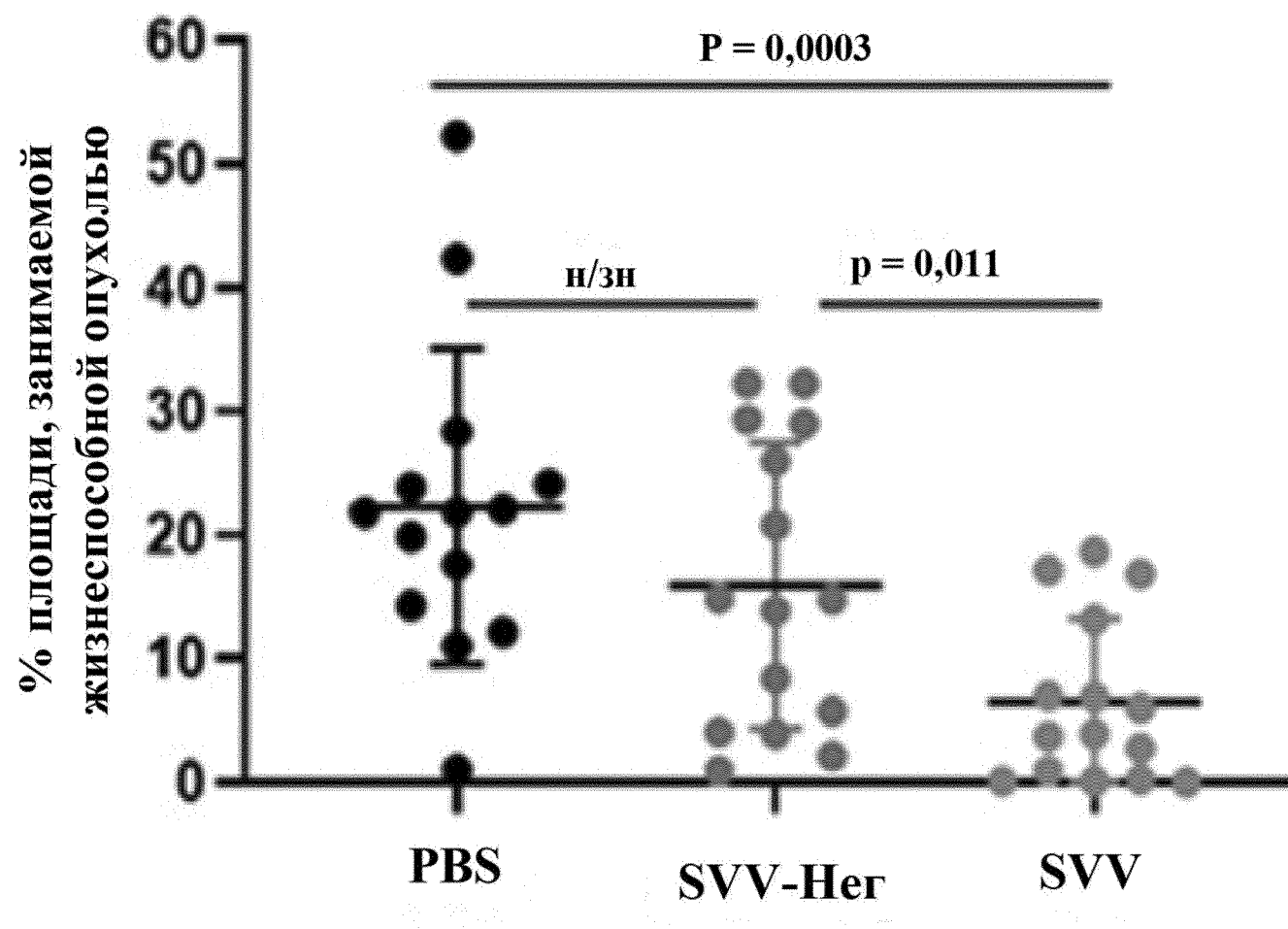
Выживание в модели ортотопической опухоли SCLC



Лог-ранговый критерий (Мантела-Кокса) по срав. с синтетическим SVV

*** $p=0,0003$; **** $p<0,0001$

ФИГ. 46А

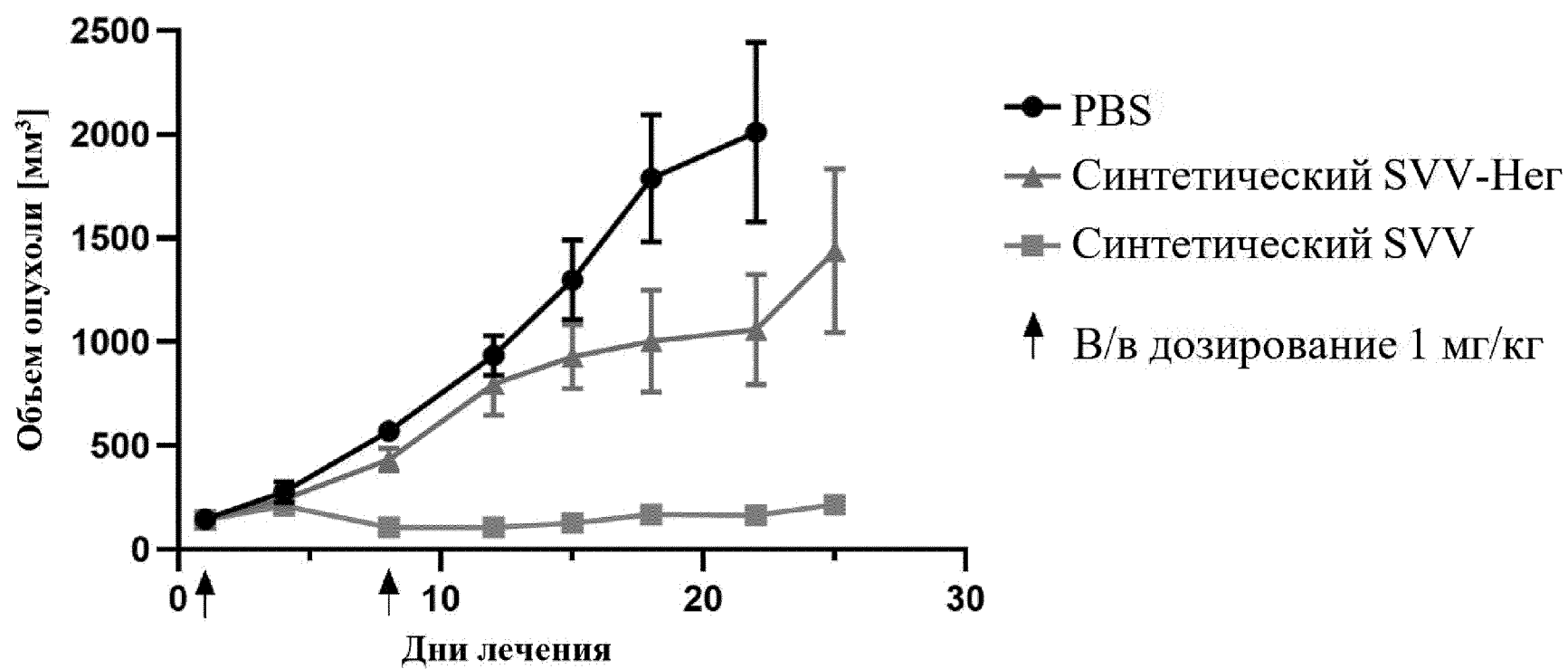


ФИГ. 46В

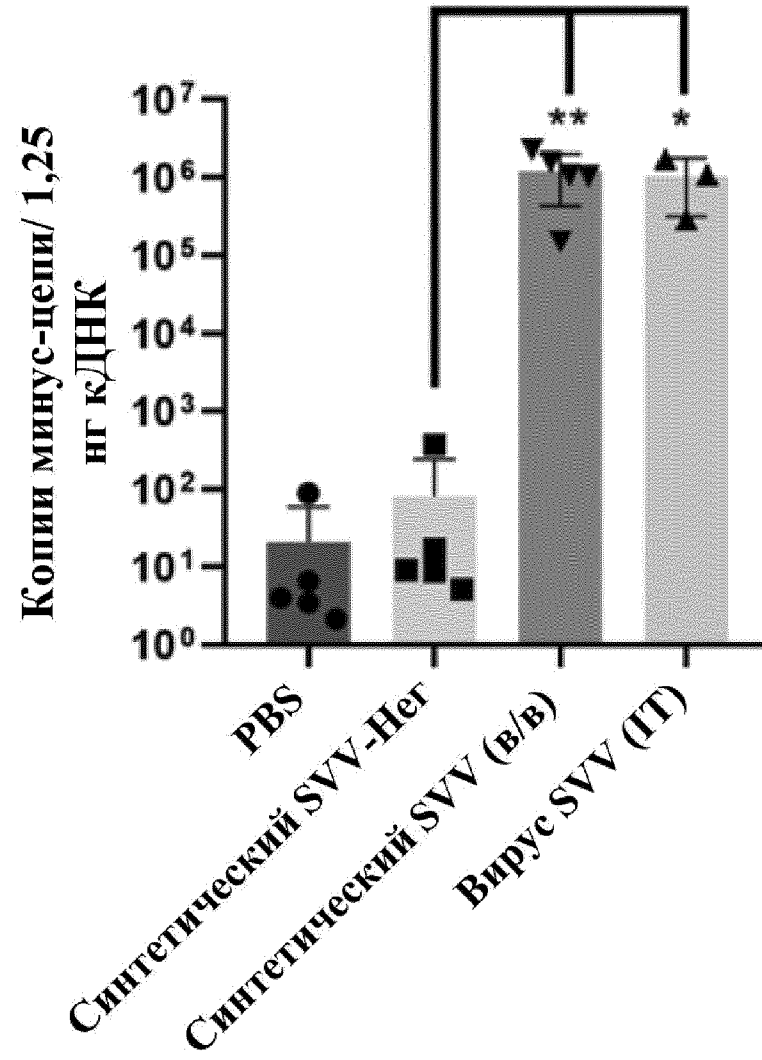


ФИГ. 47А

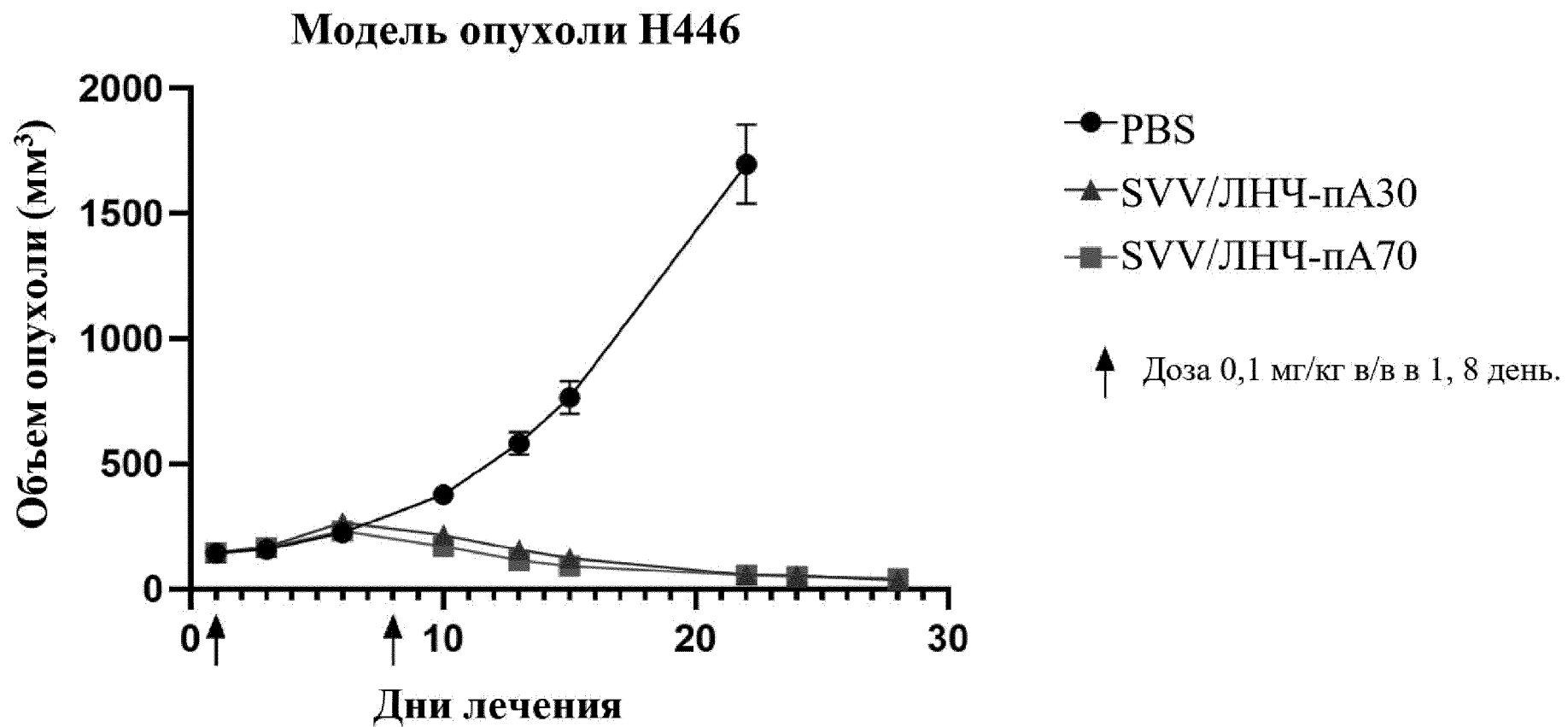
Модель опухоли SCLC PDX



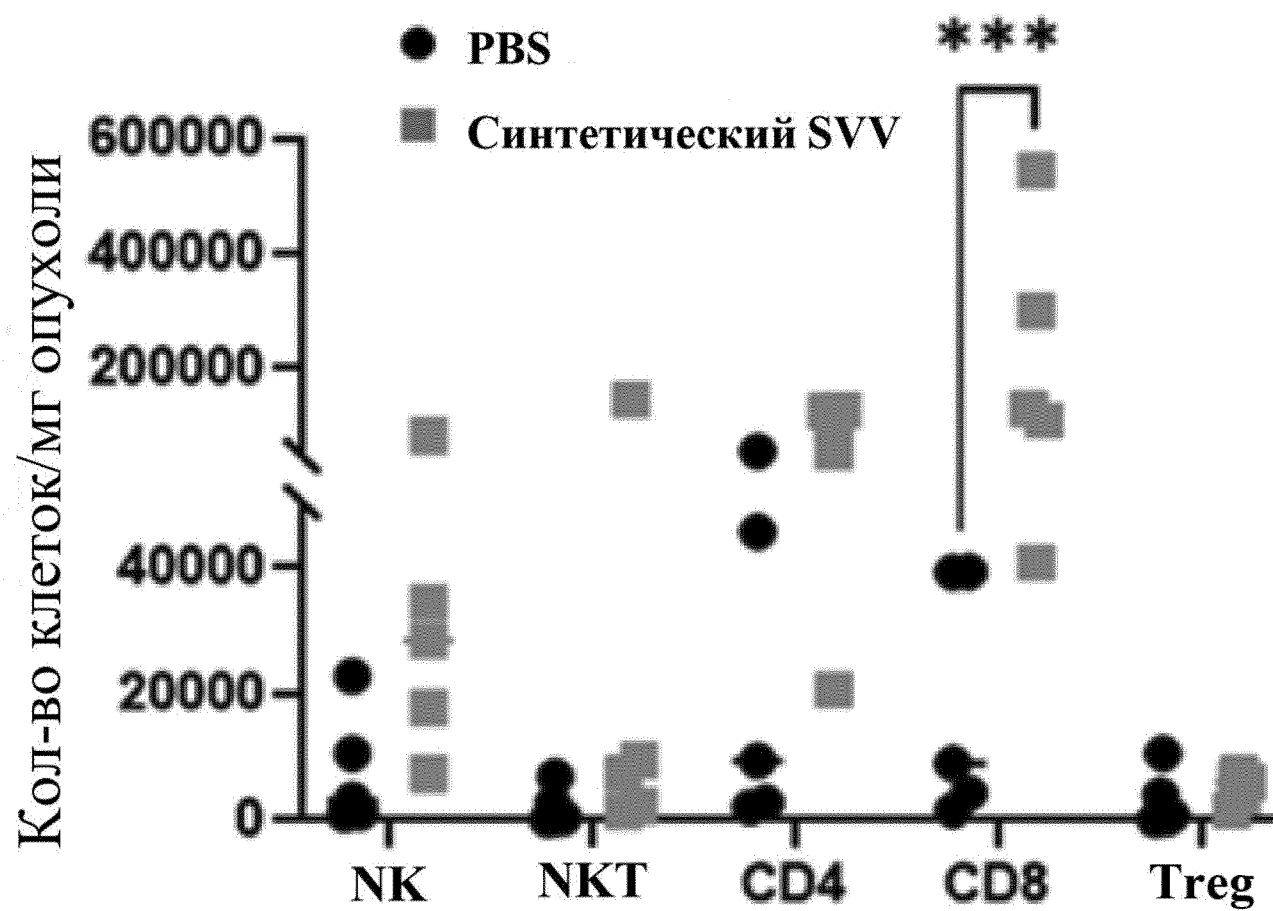
ФИГ. 47В



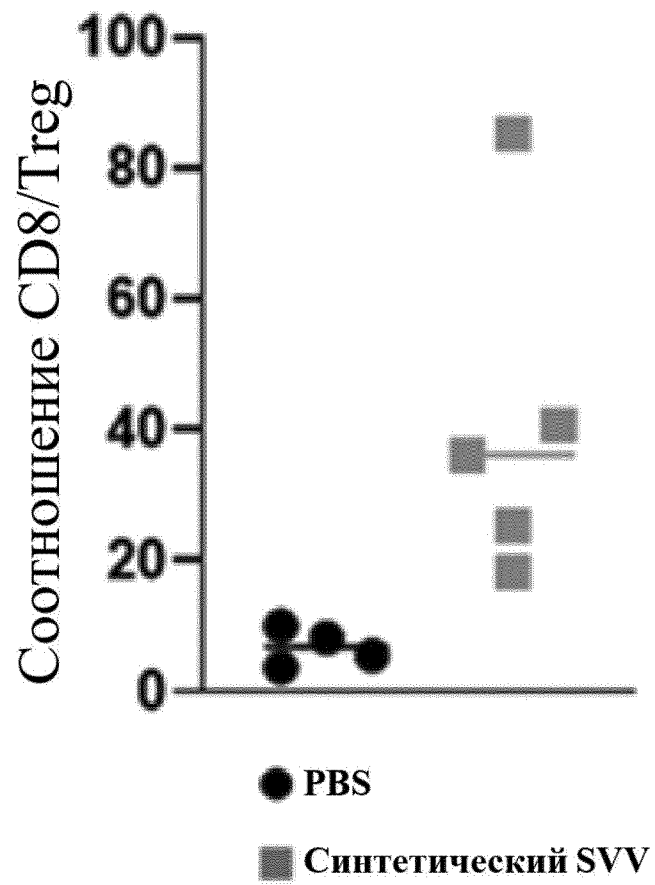
ФИГ. 48



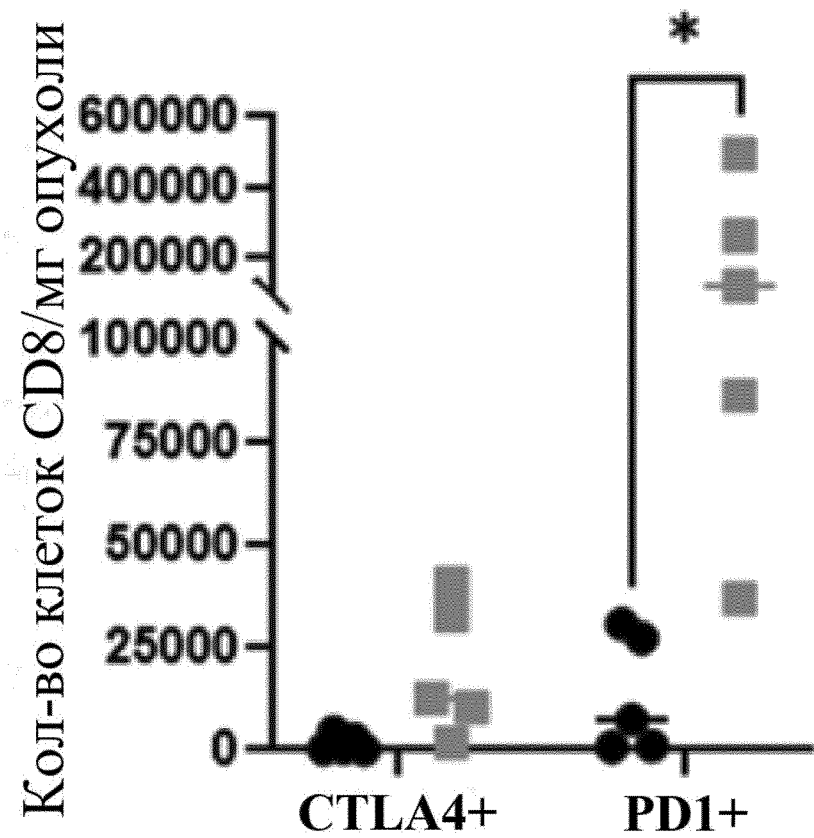
ФИГ. 49А



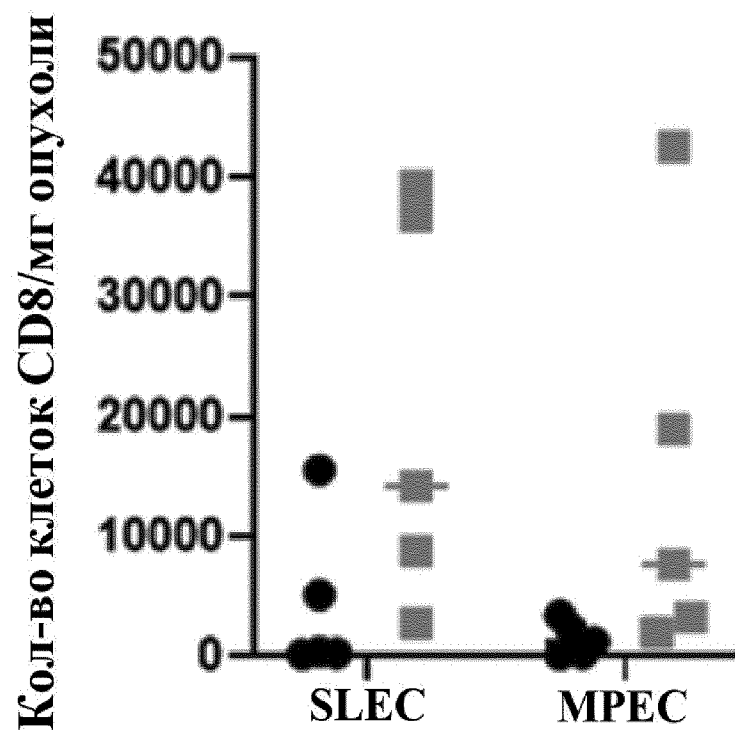
ФИГ. 49В



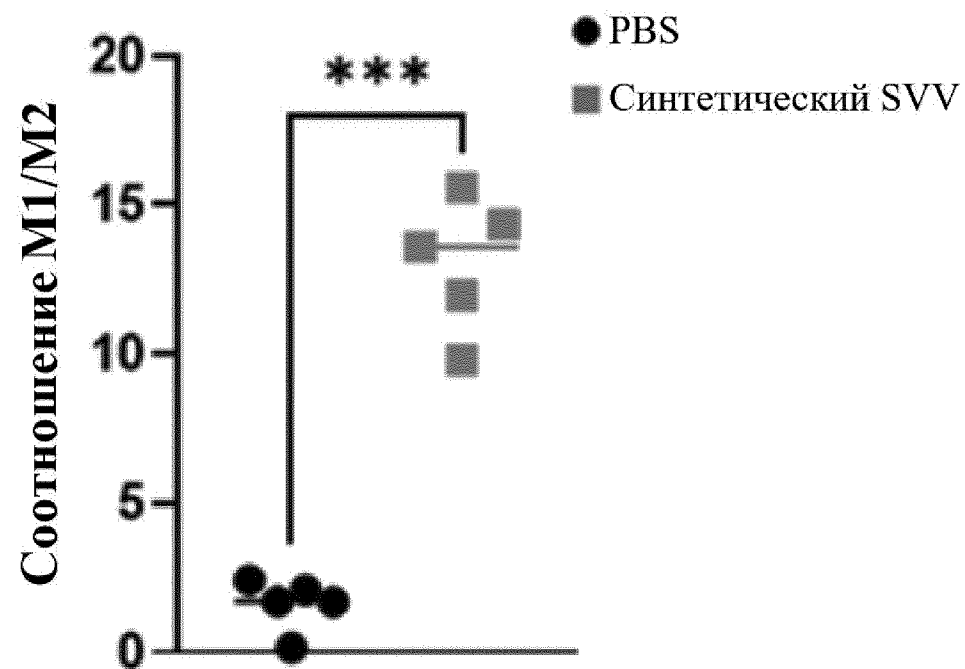
ФИГ. 49С



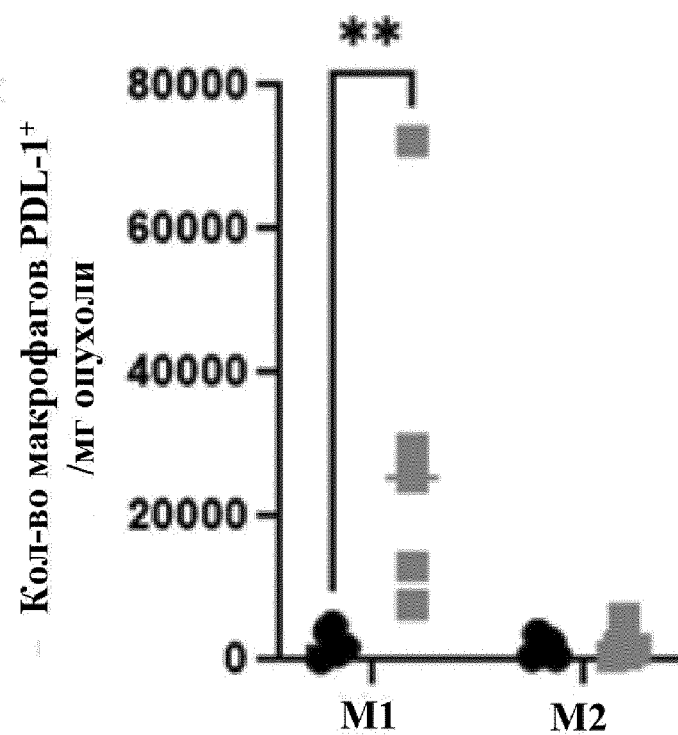
ФИГ. 49D



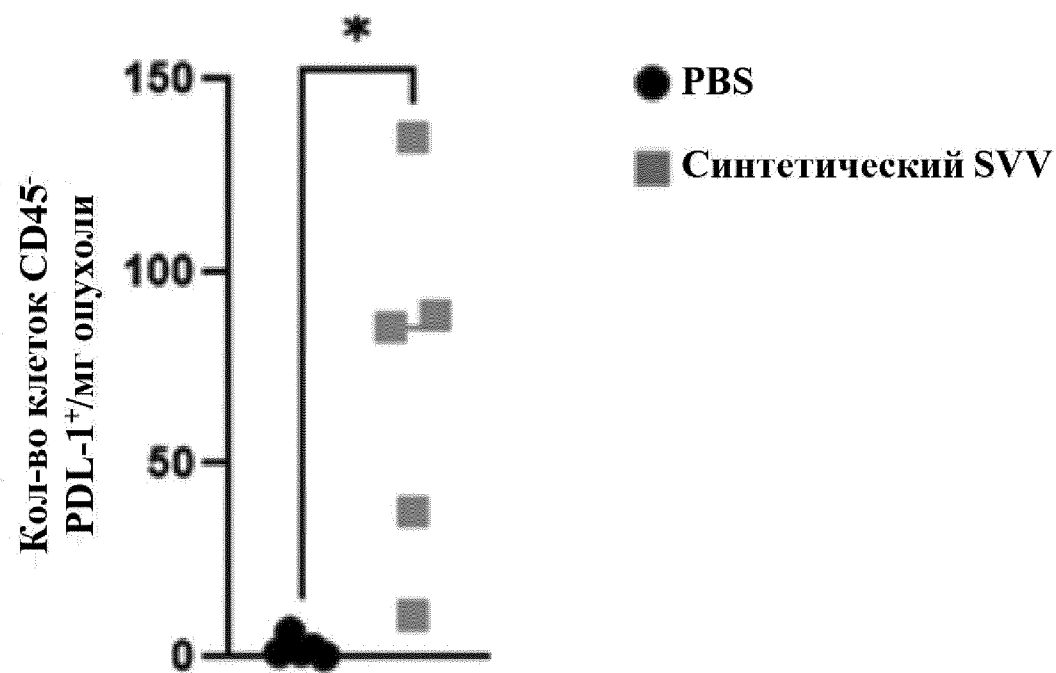
ФИГ. 49E



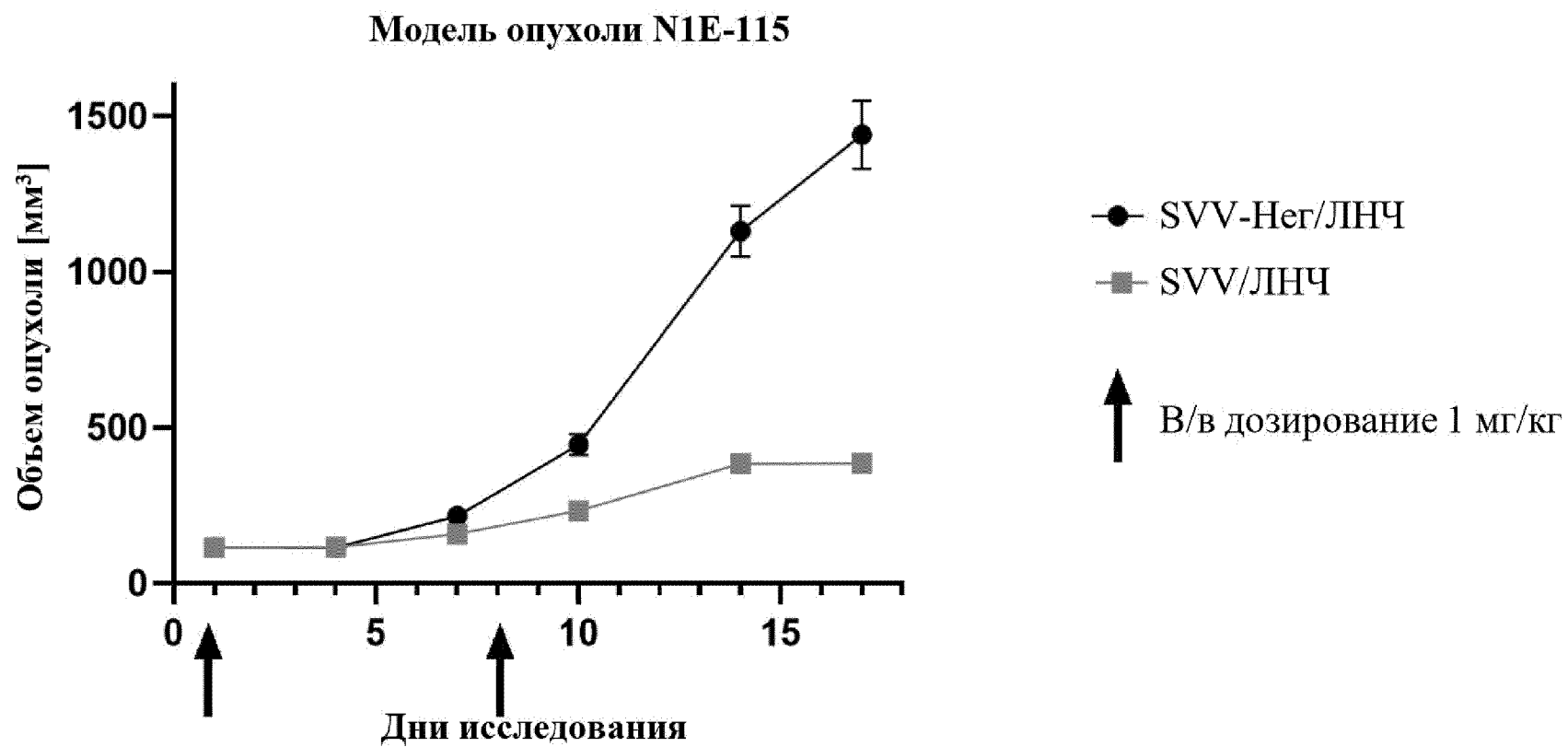
ФИГ. 49F



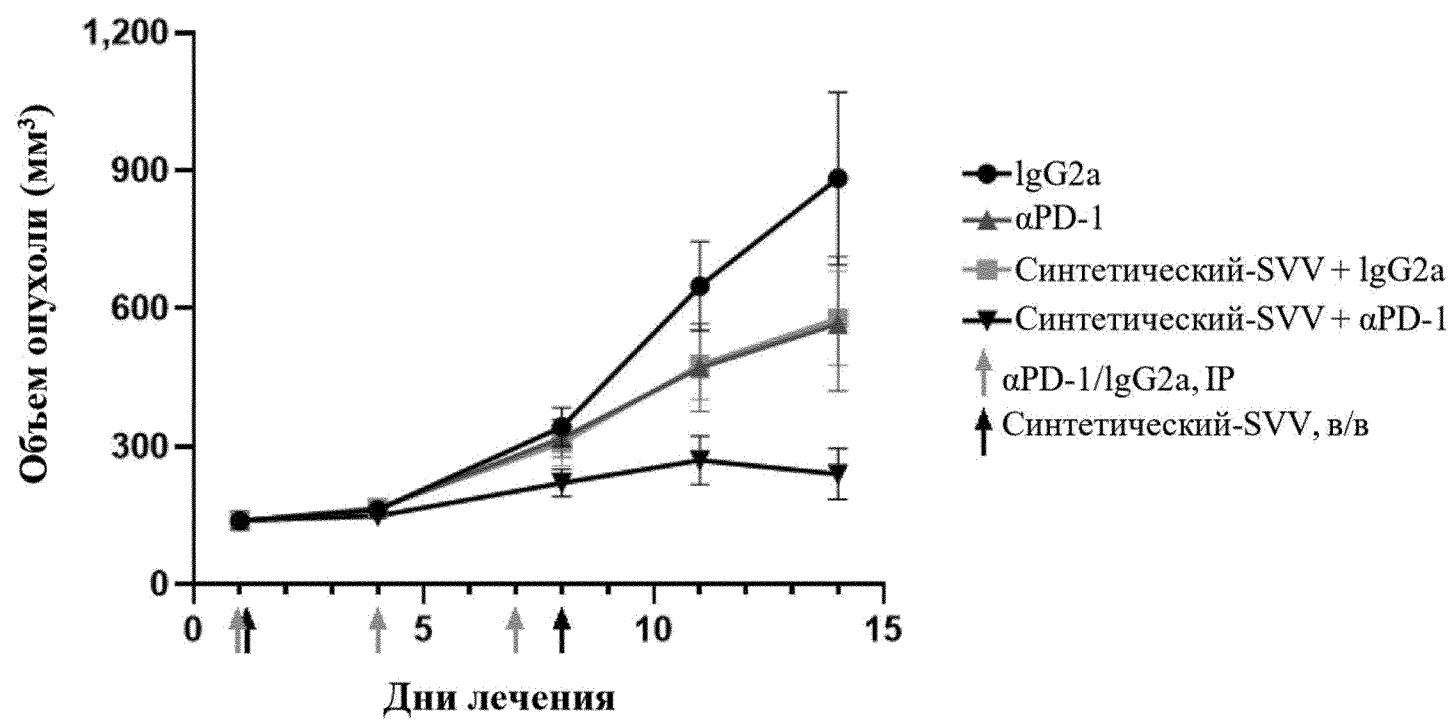
ФИГ. 49G



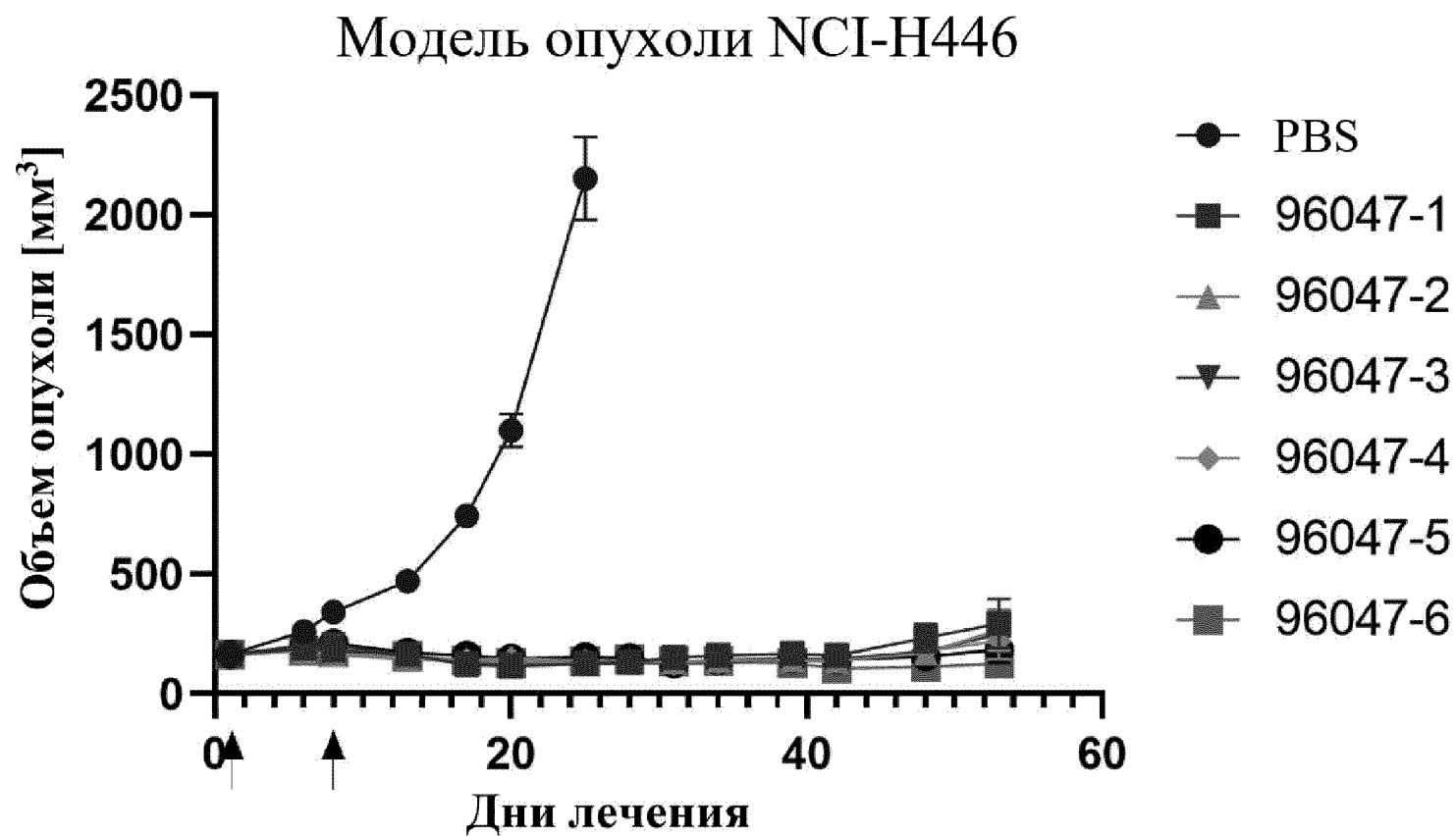
ФИГ. 50



ФИГ. 51

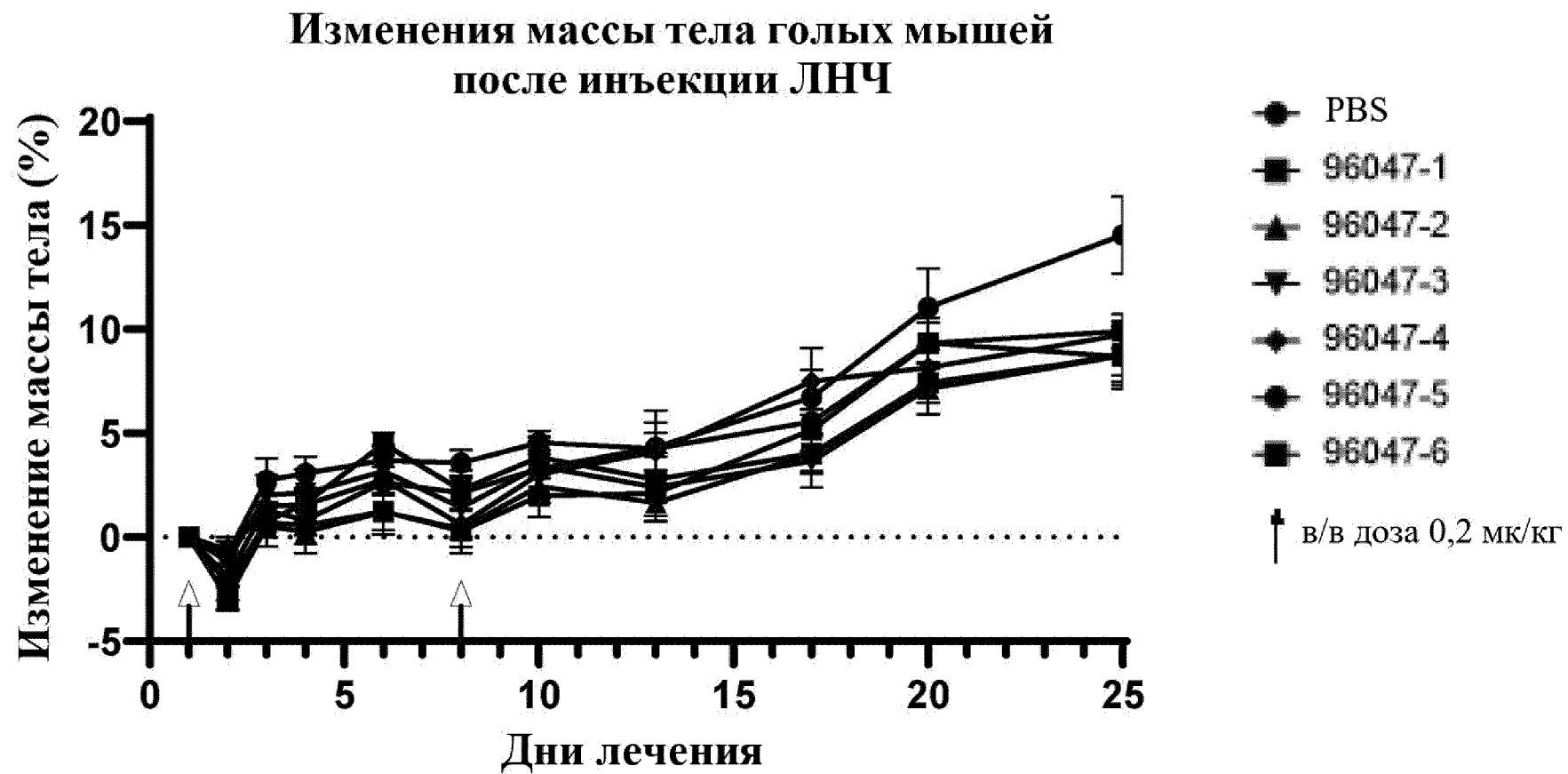


ФИГ. 52А

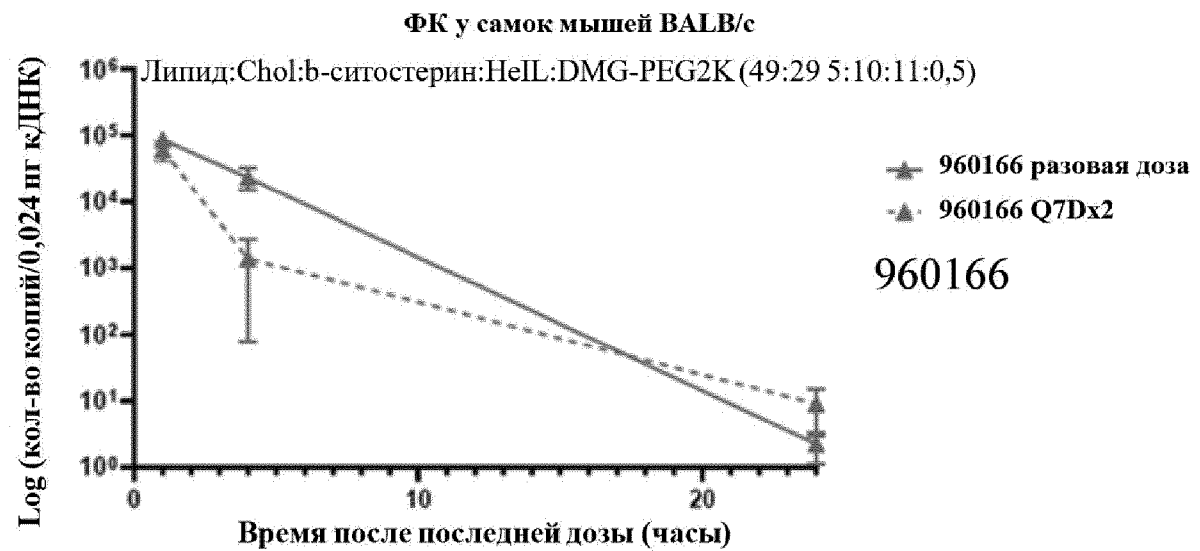
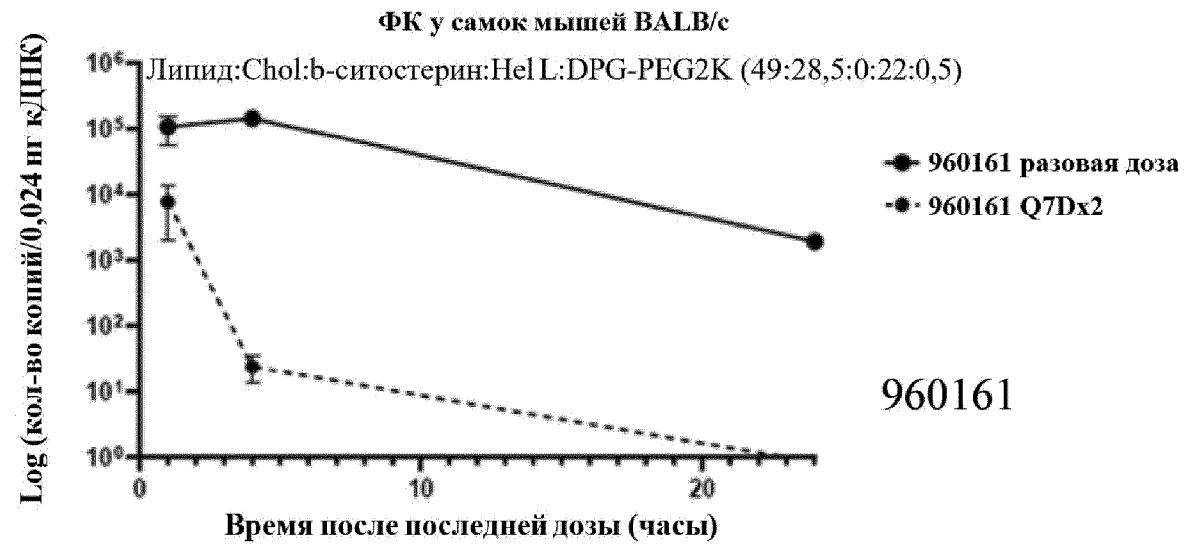


↑ В/в доза 0,2 мк/кг в 1, 8 день.

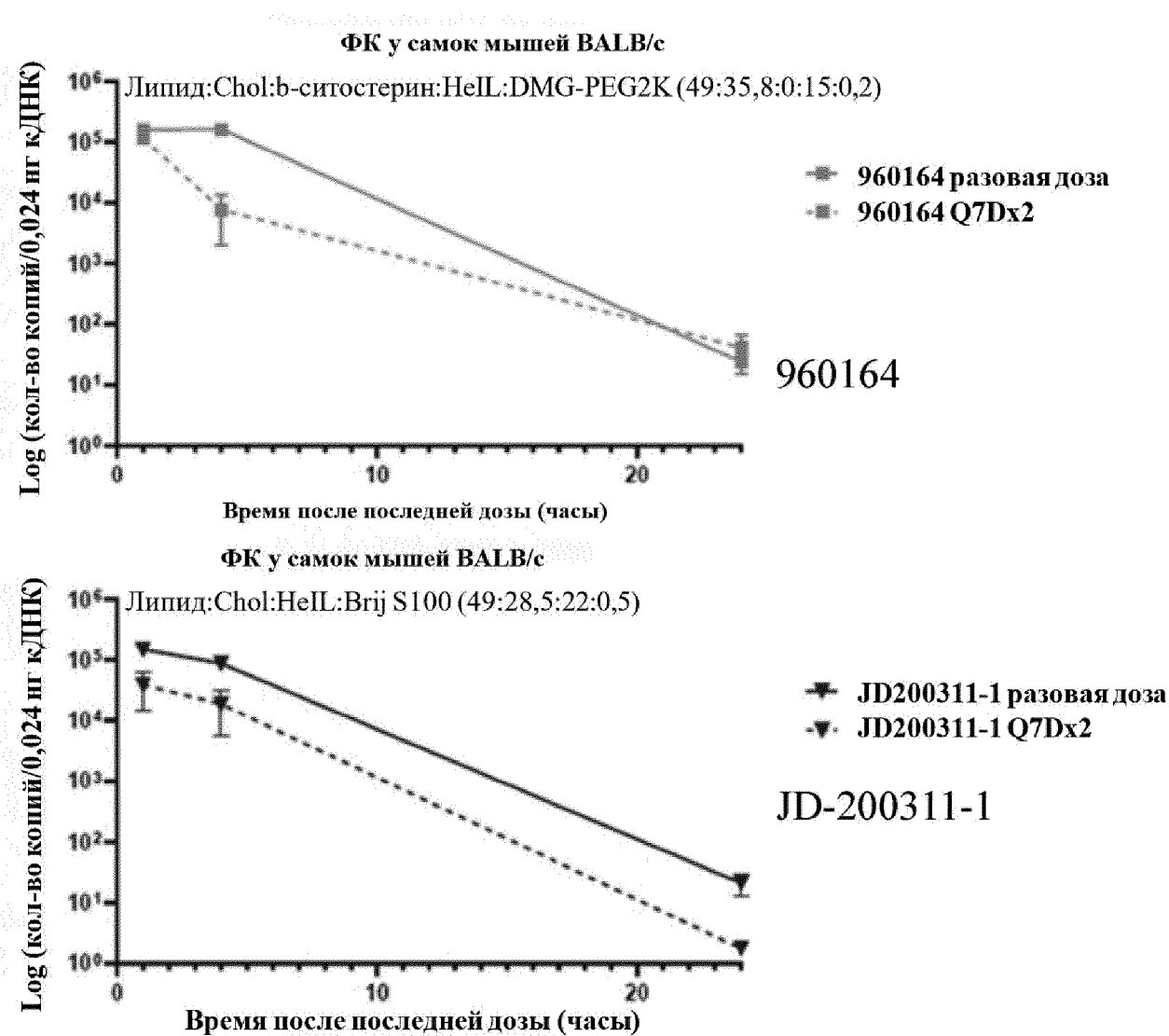
ФИГ. 52В



ФИГ. 53А

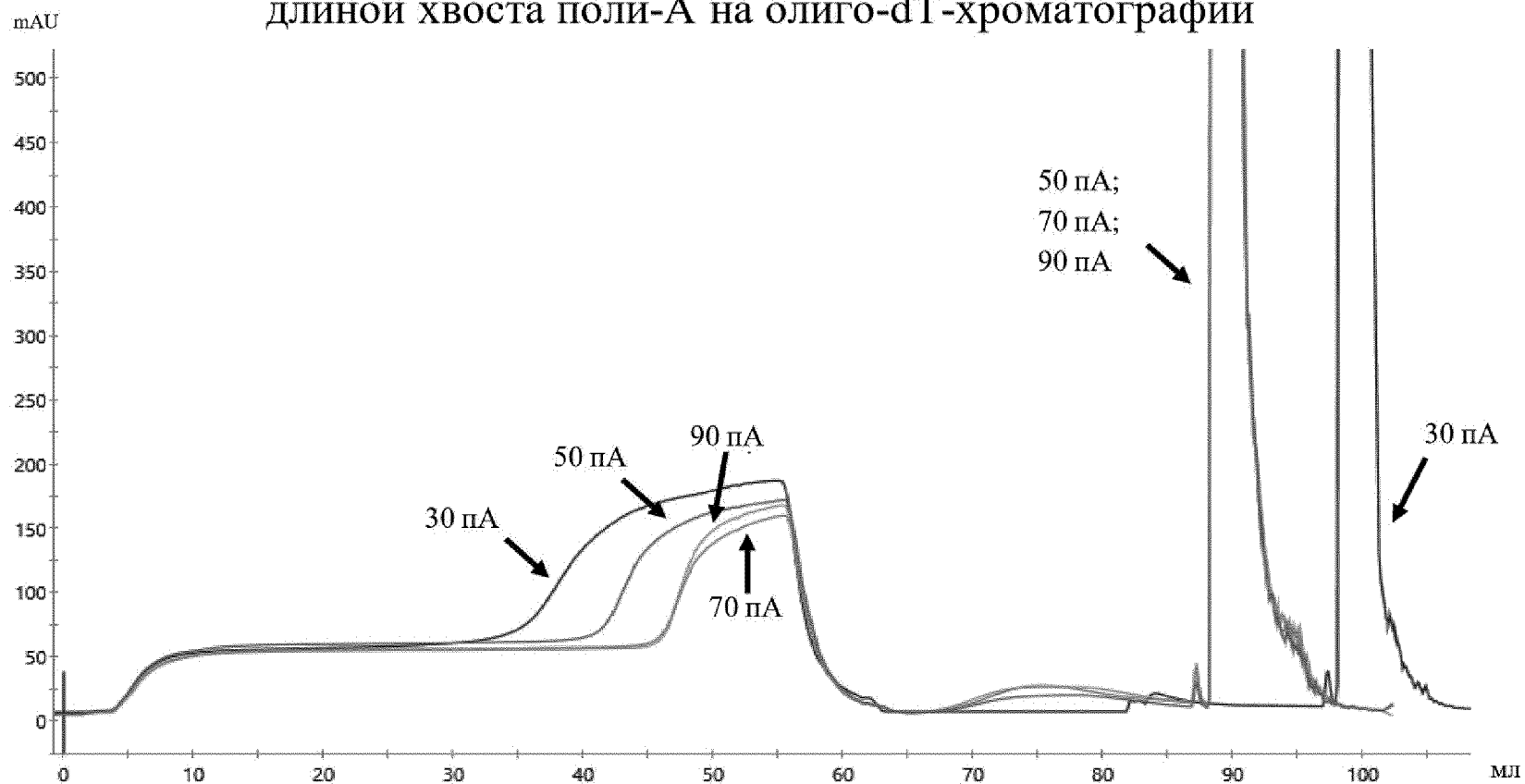


ФИГ. 53В



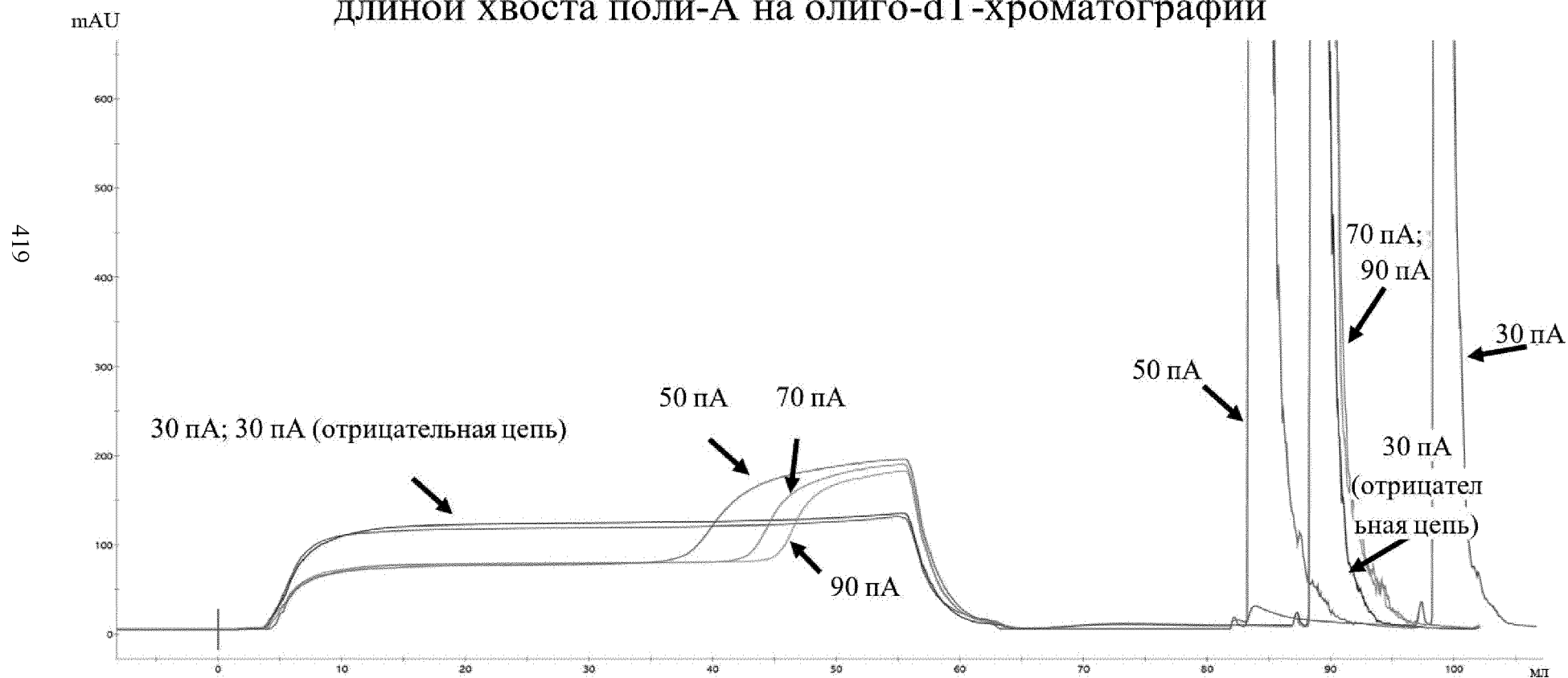
ФИГ. 54А

Поглощение УФ А280 вирусного генома CVA21 с различной
длиной хвоста поли-А на олиго-dT-хроматографии

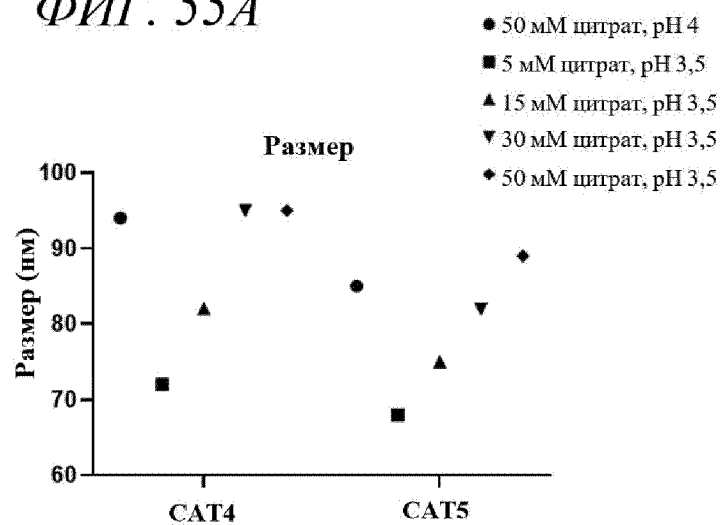


ФИГ. 54В

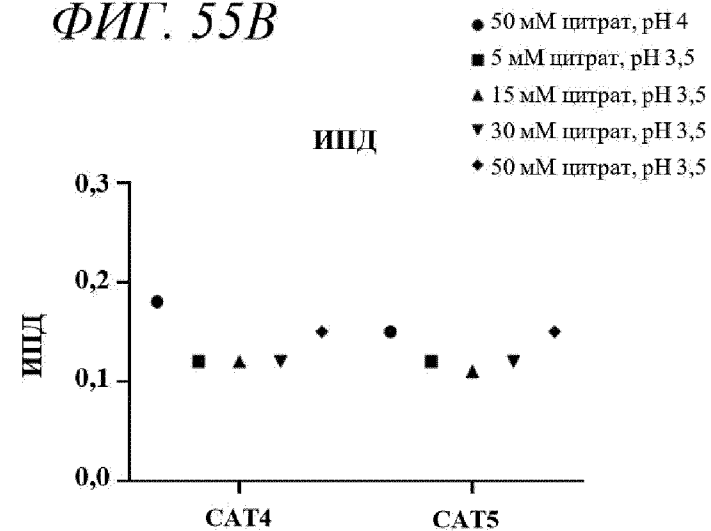
Поглощение УФ А280 вирусного генома SVV с различной
длиной хвоста поли-А на олиго-dT-хроматографии



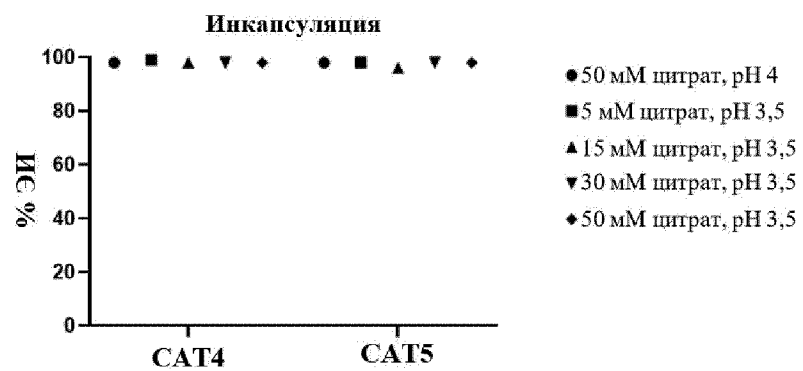
ФИГ. 55А



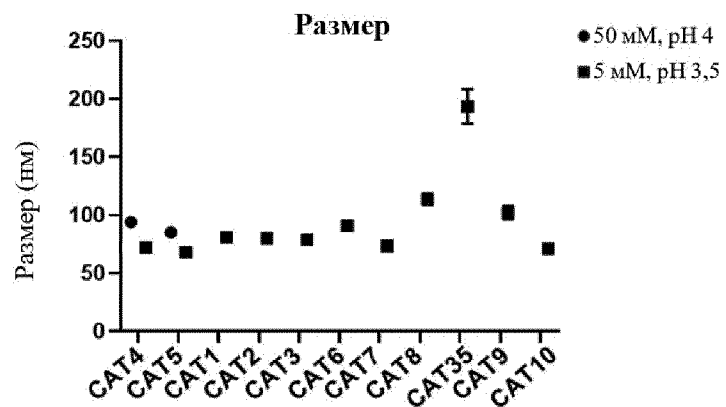
ФИГ. 55В



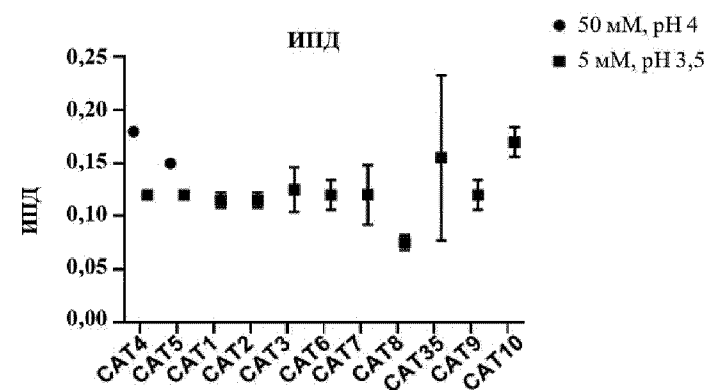
ФИГ. 55С



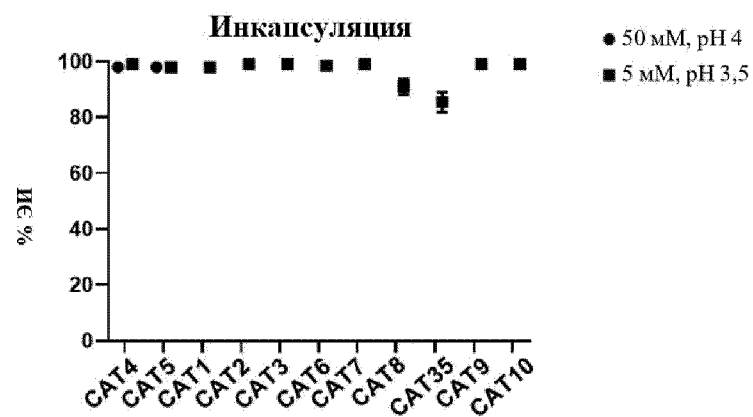
ФИГ. 56А



ФИГ. 56В

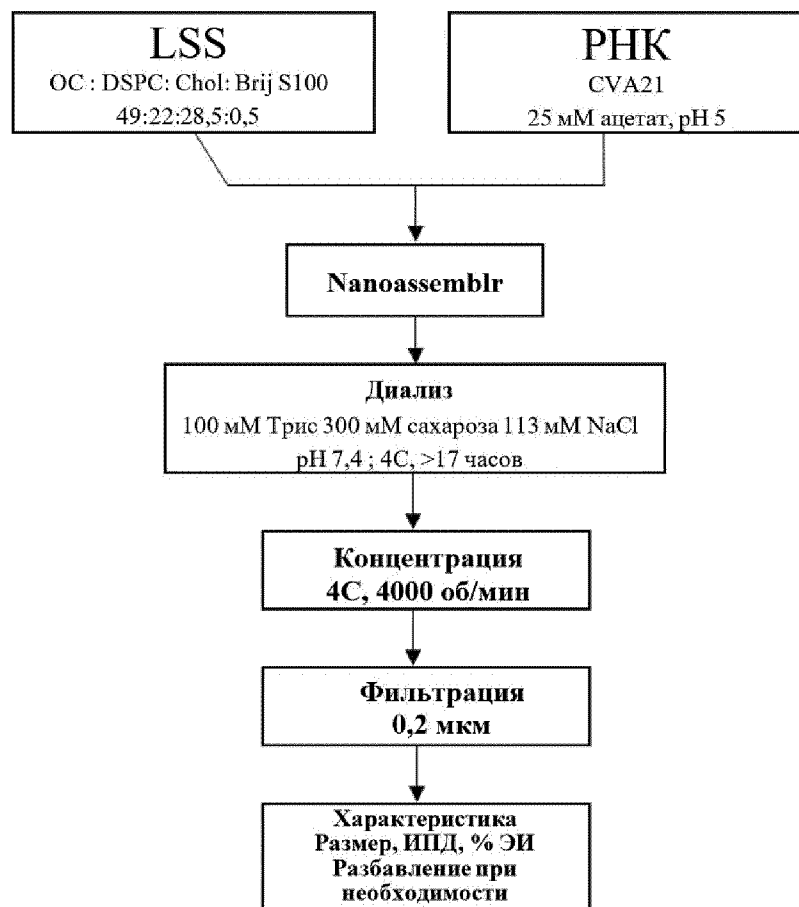


ФИГ. 56С

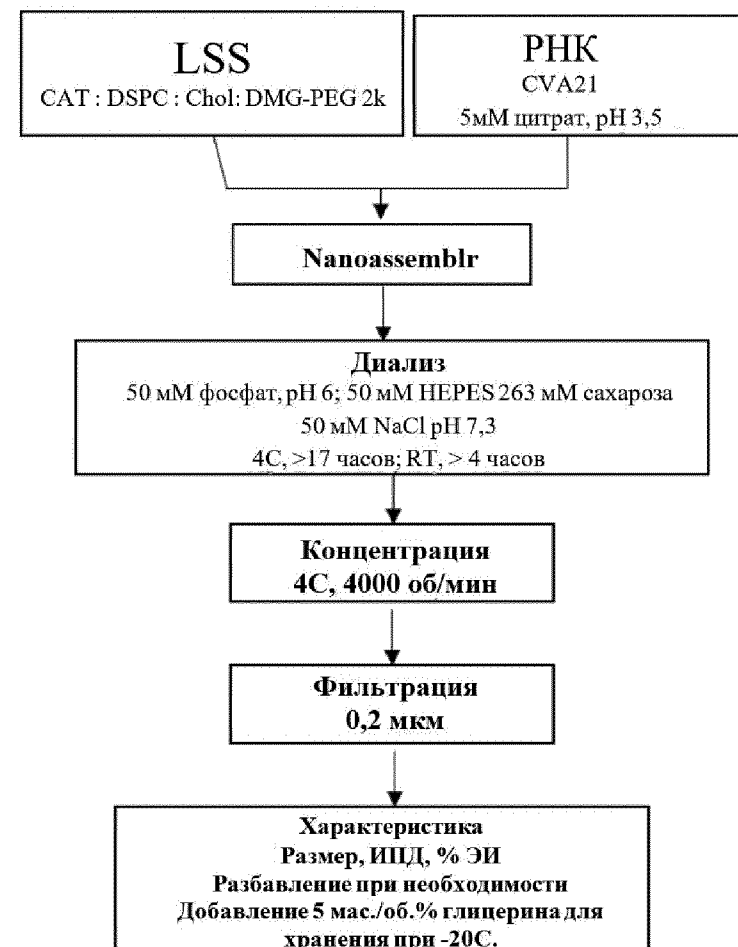


ФИГ. 57

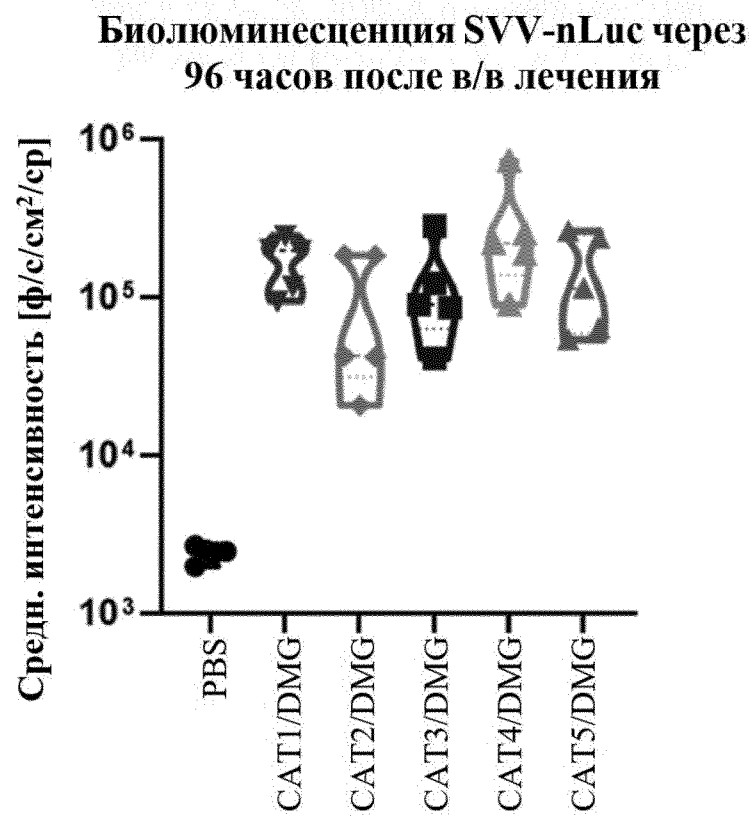
OC/Brij



CAT



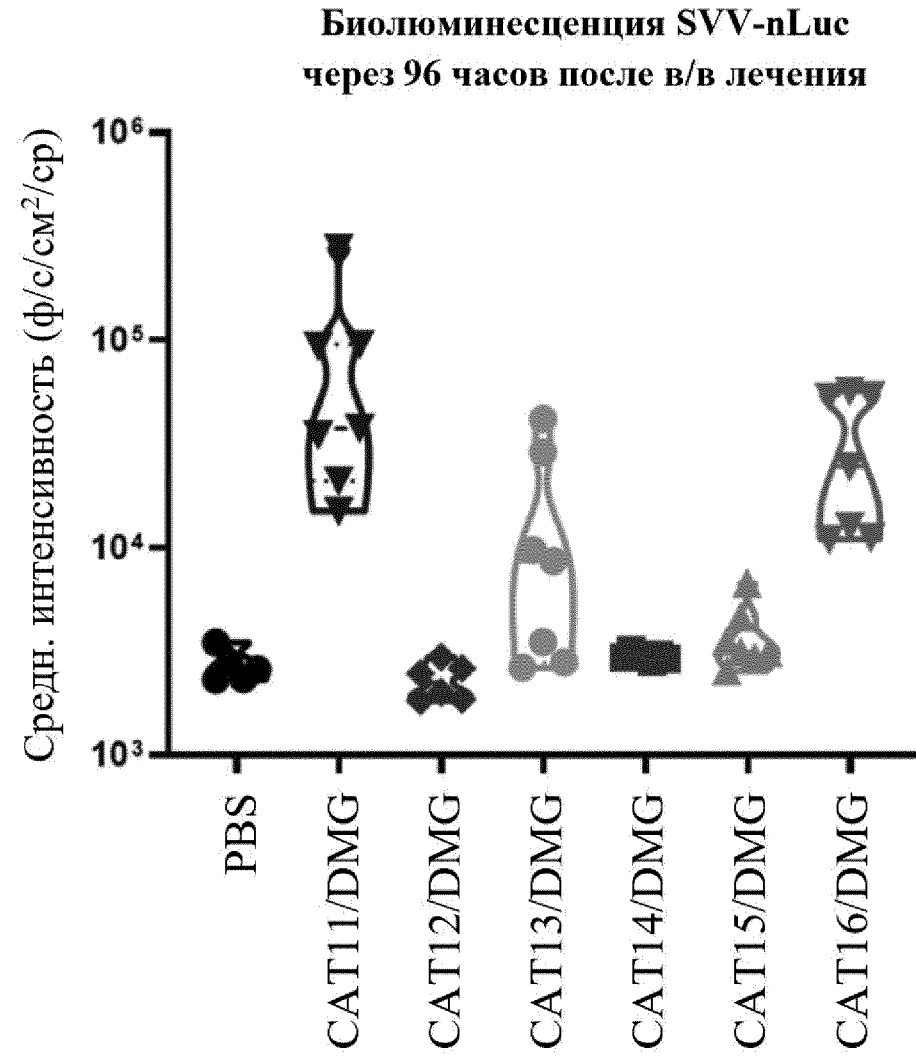
ФИГ. 58А



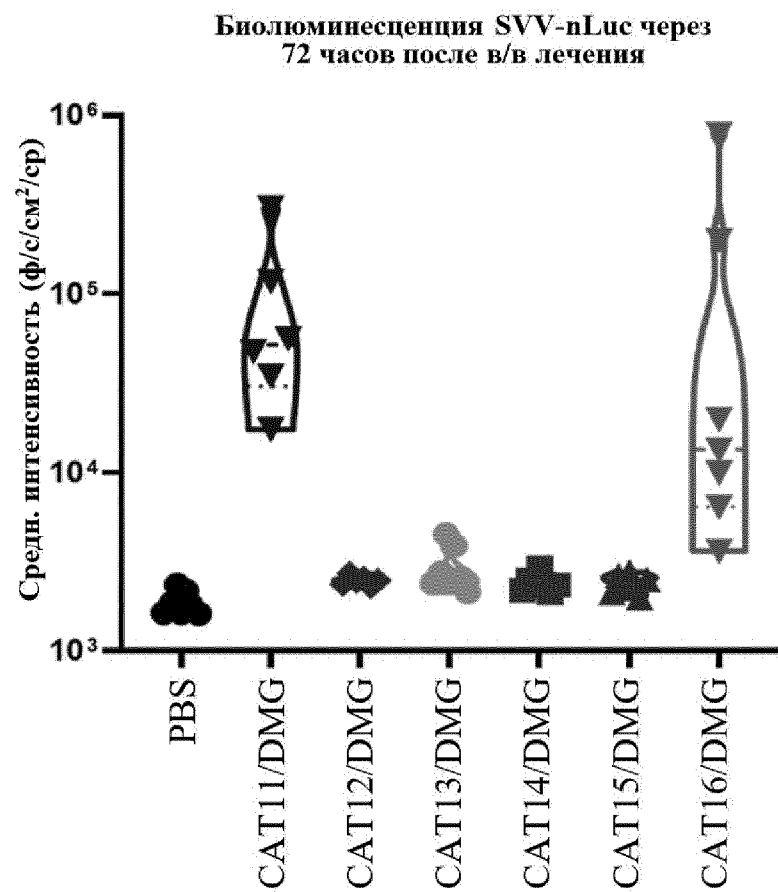
ФИГ. 58В



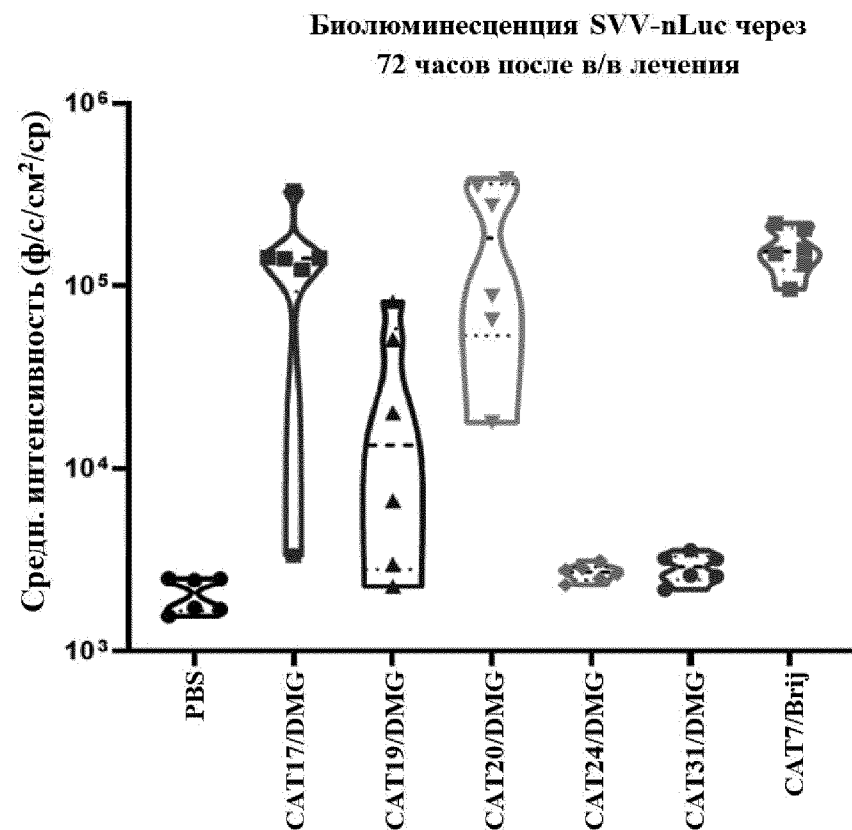
ФИГ. 58С



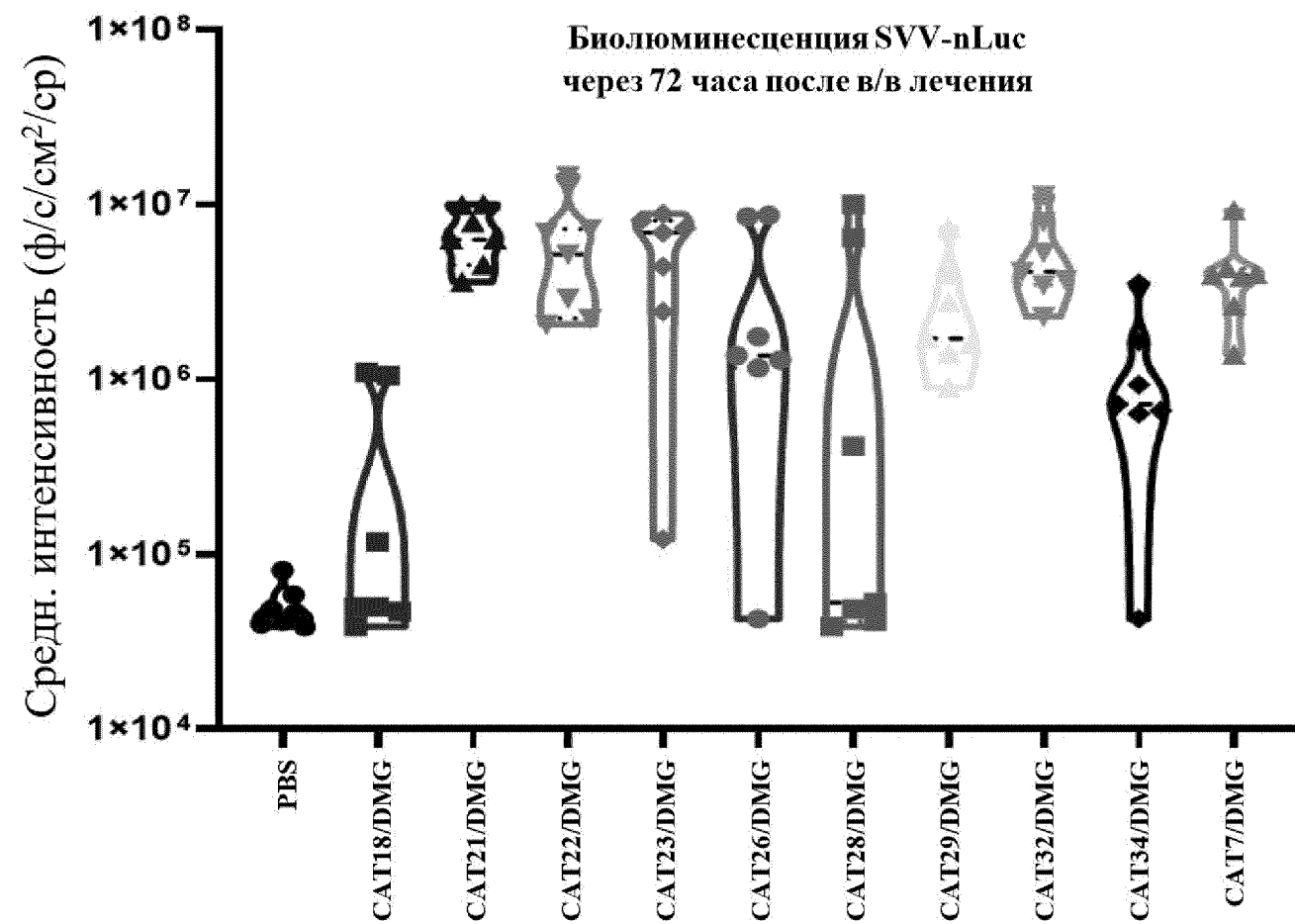
ФИГ. 58D



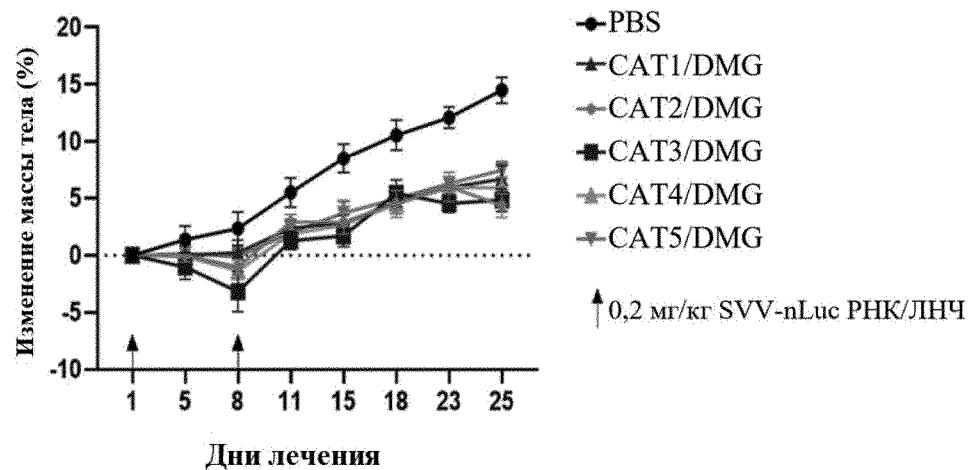
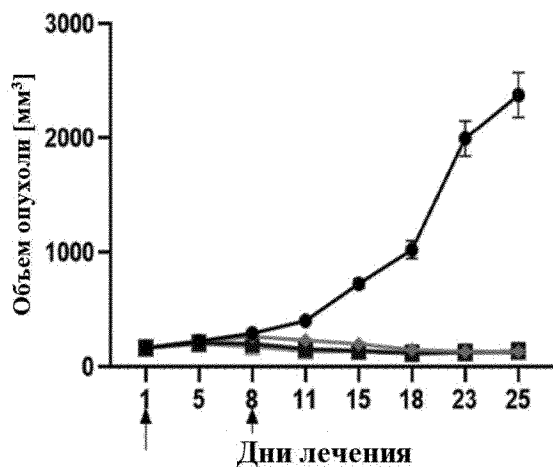
ФИГ. 58E



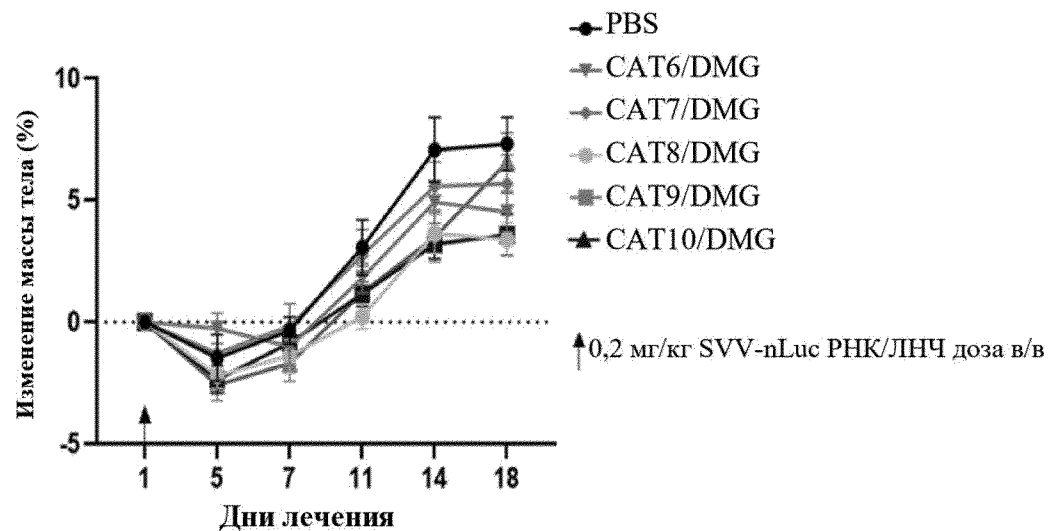
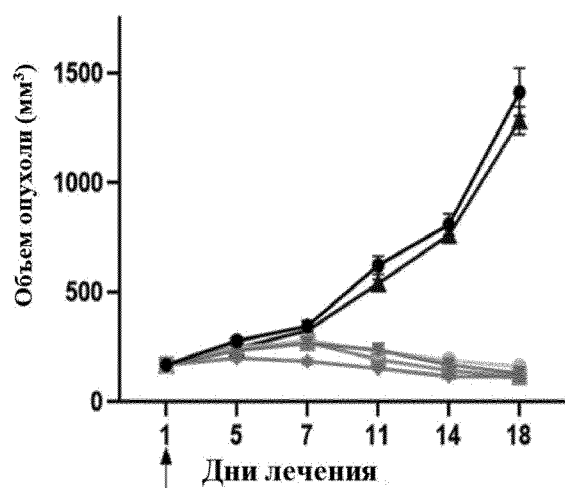
ФИГ. 58F



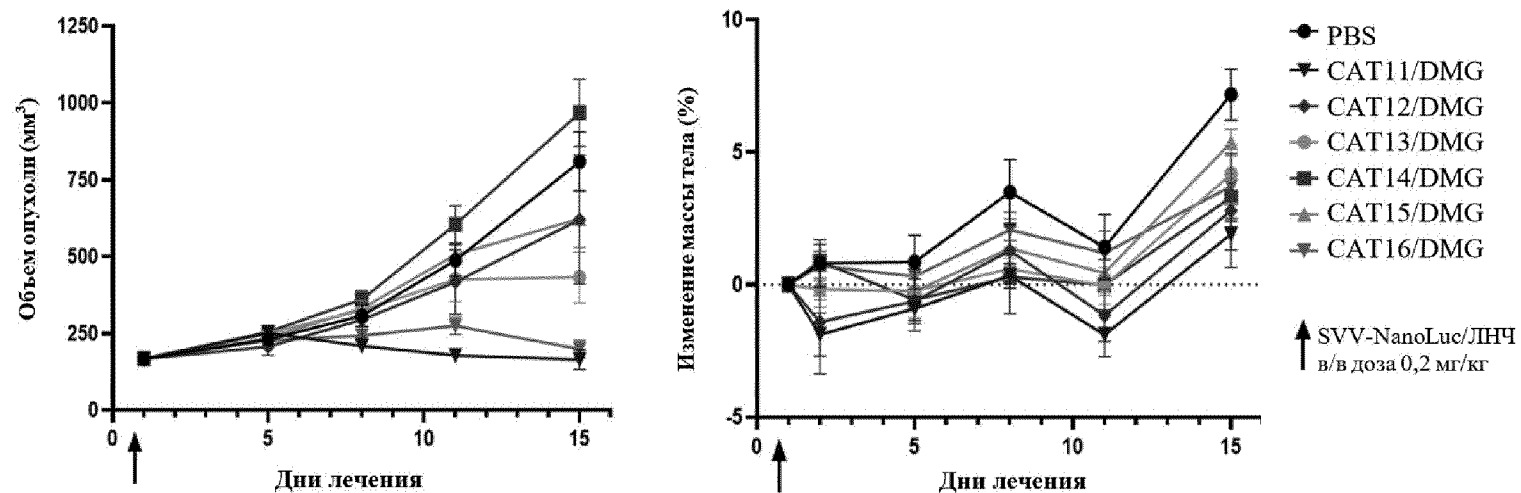
ФИГ. 59А



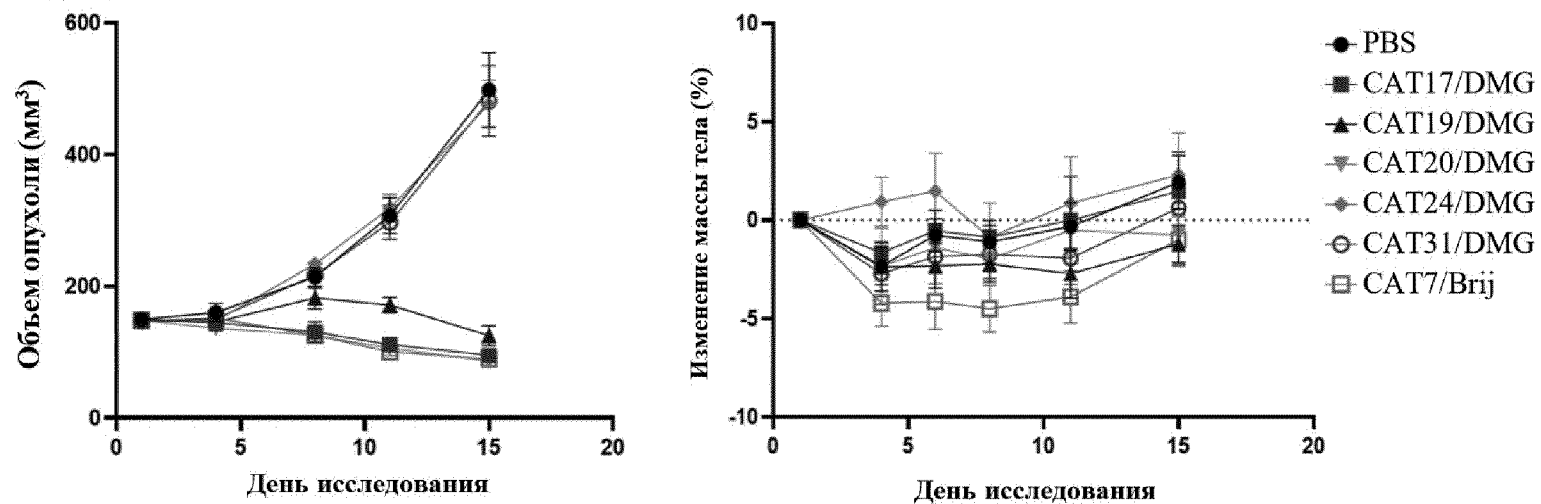
ФИГ. 59В



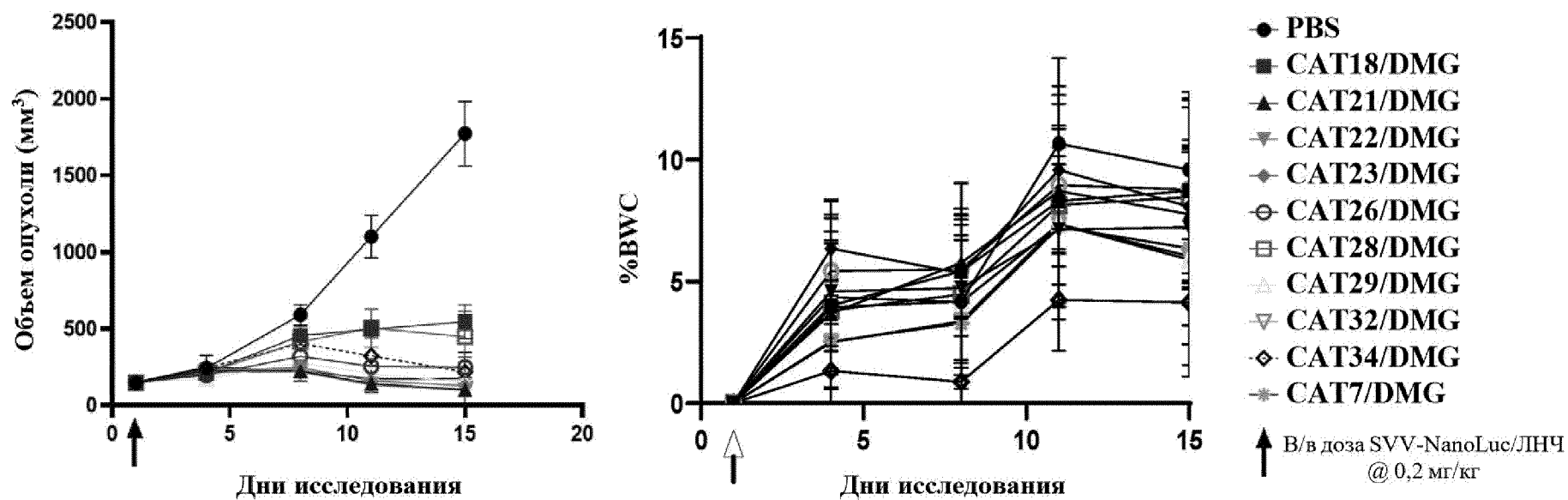
ФИГ. 59С



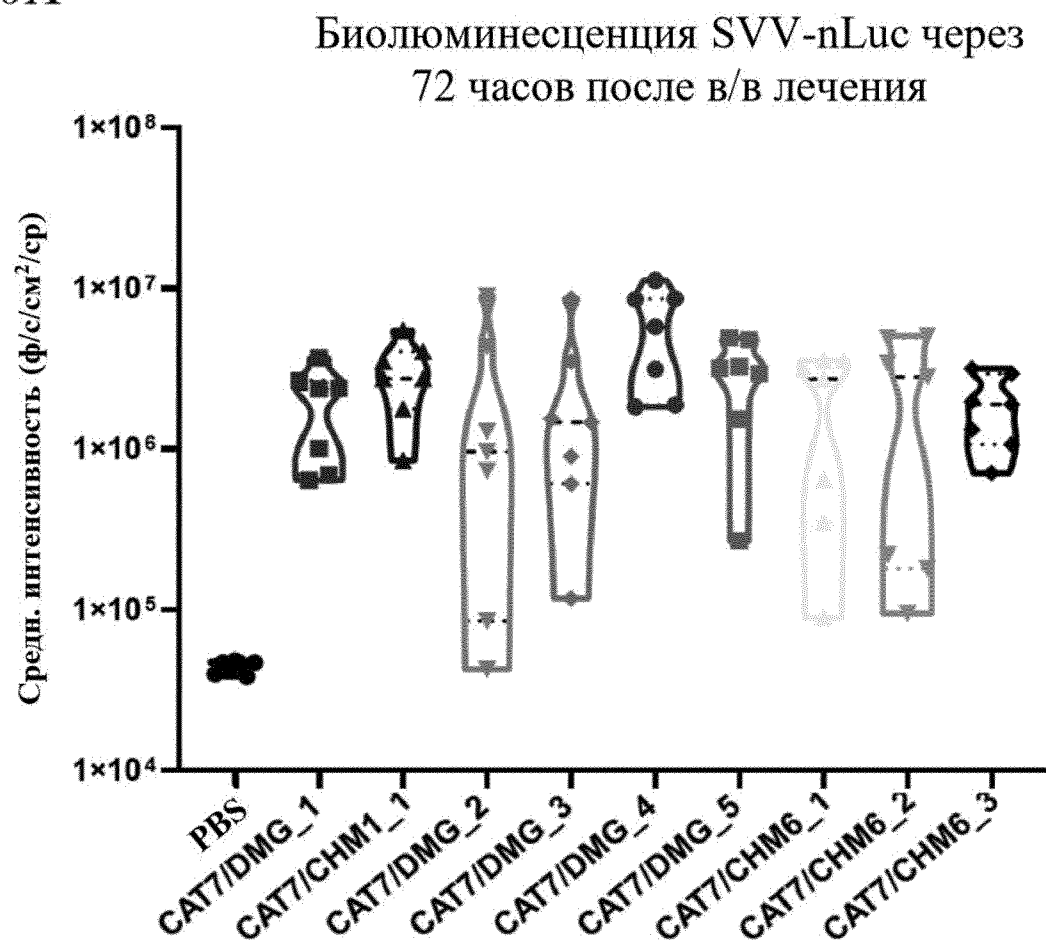
ФИГ. 59D

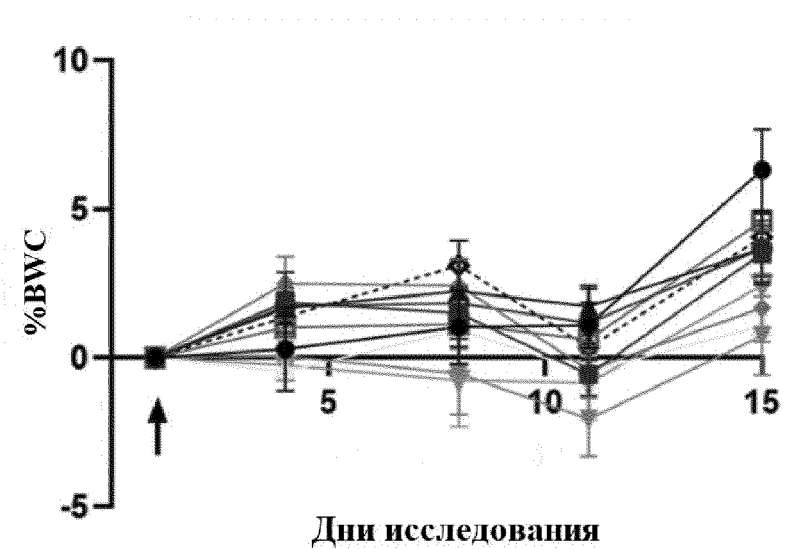


ФИГ. 59Е

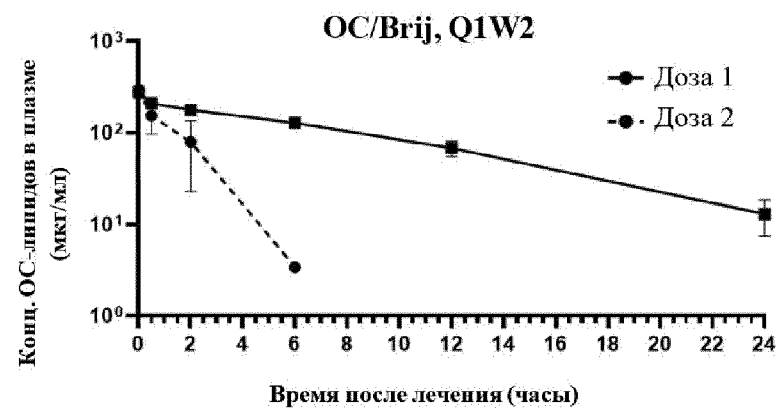


ФИГ. 60А

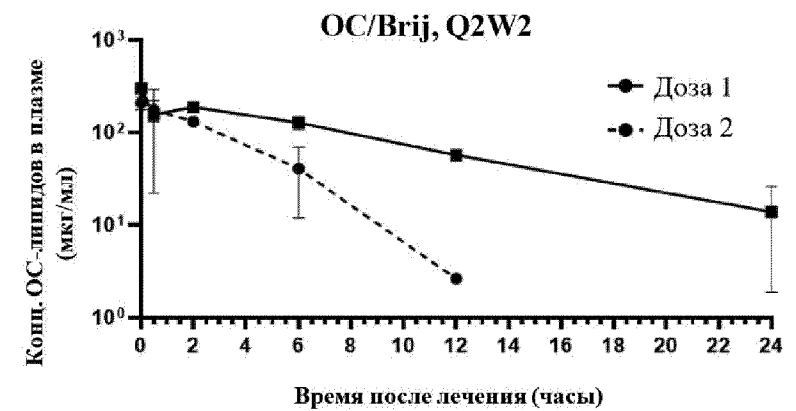




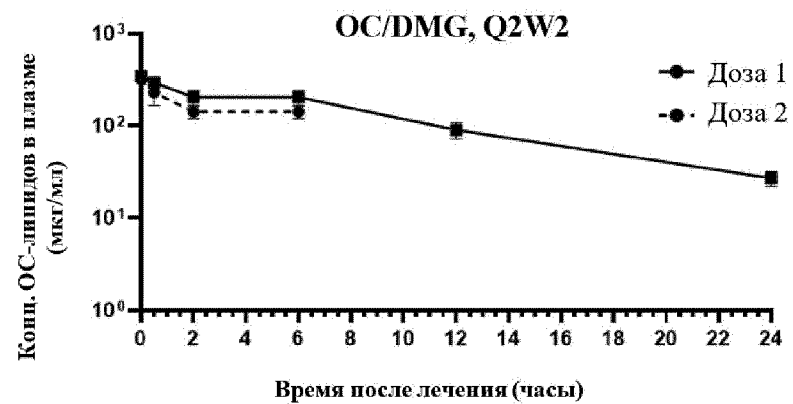
ФИГ. 61A



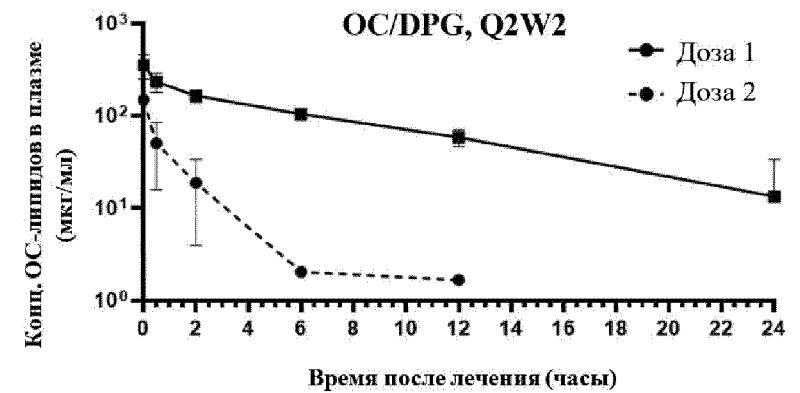
ФИГ. 61B



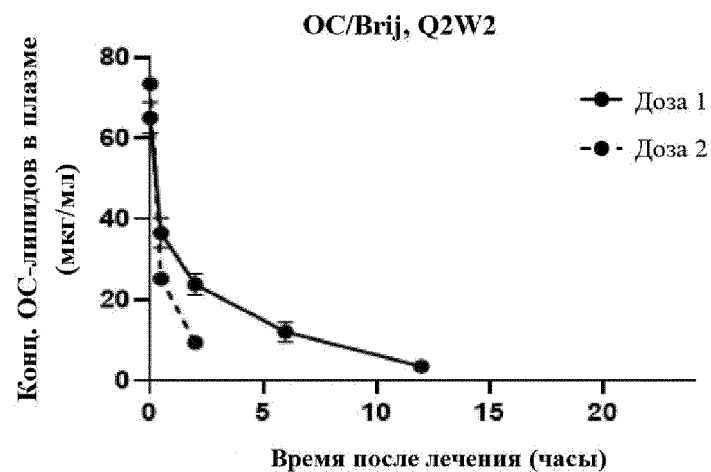
ФИГ. 61C



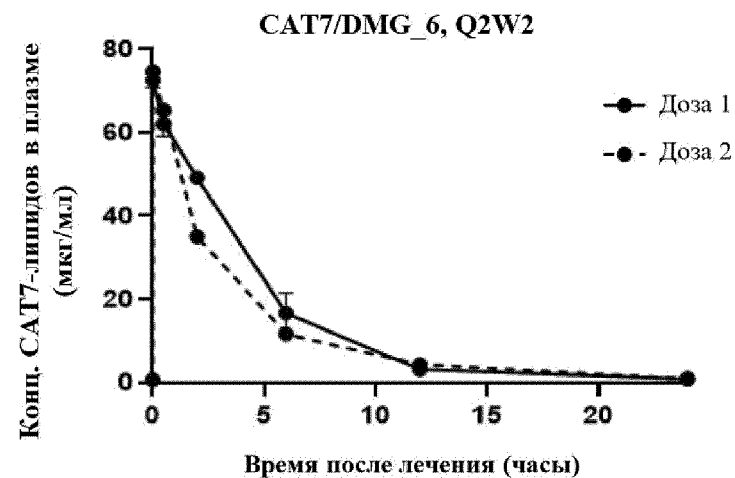
ФИГ. 61D



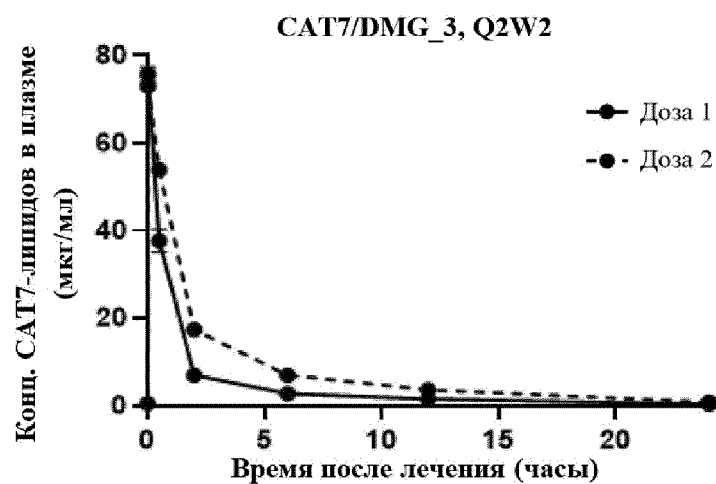
ФИГ. 62A



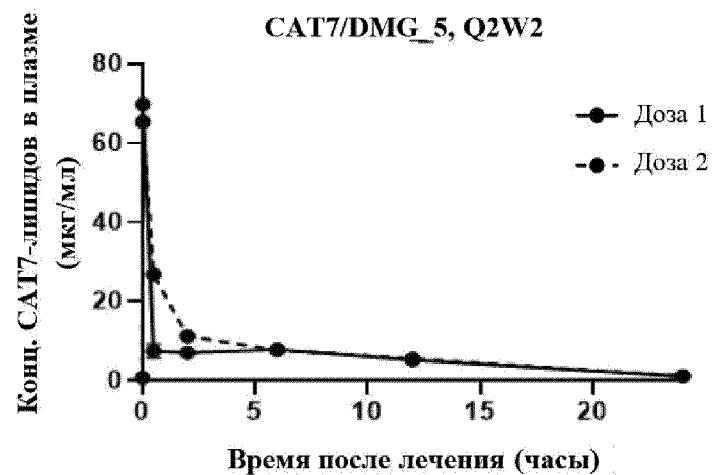
ФИГ. 62B



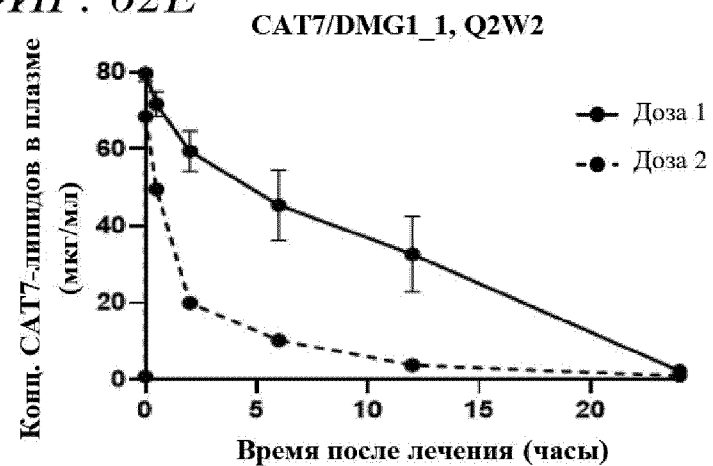
ФИГ. 62C



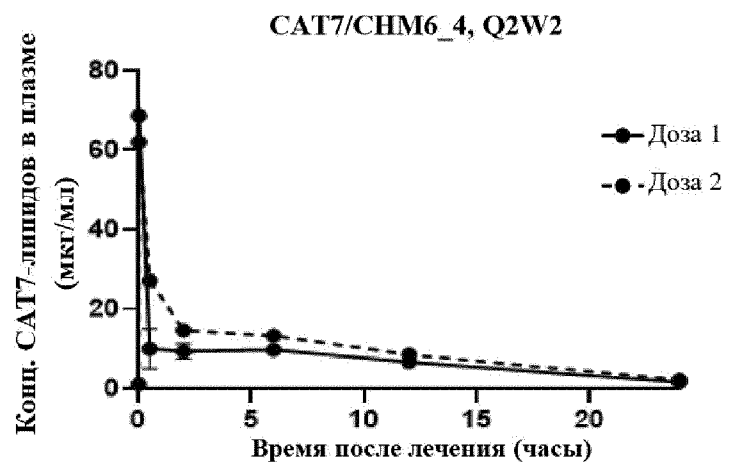
ФИГ. 62D



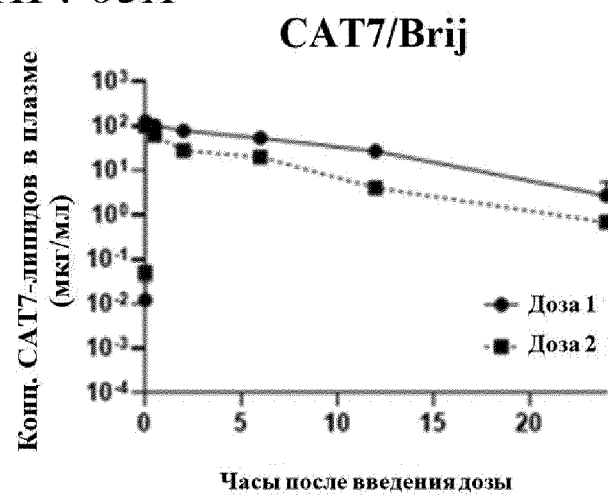
ФИГ. 62E



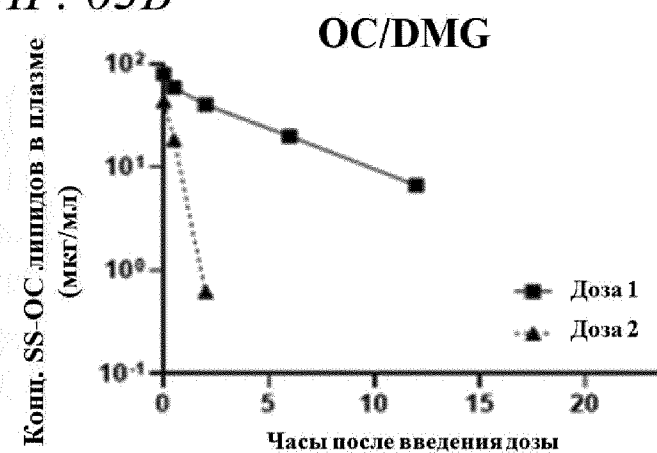
ФИГ. 62F



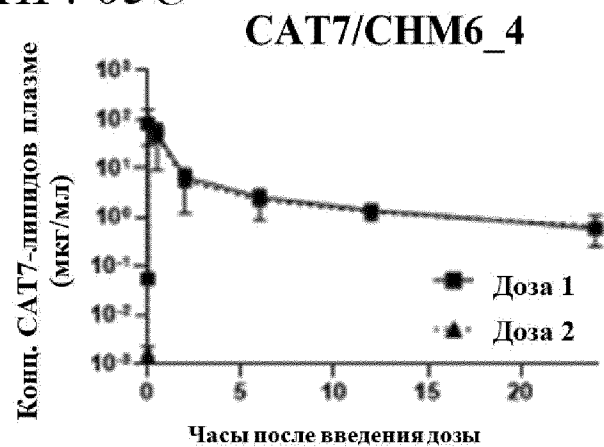
ФИГ. 63А



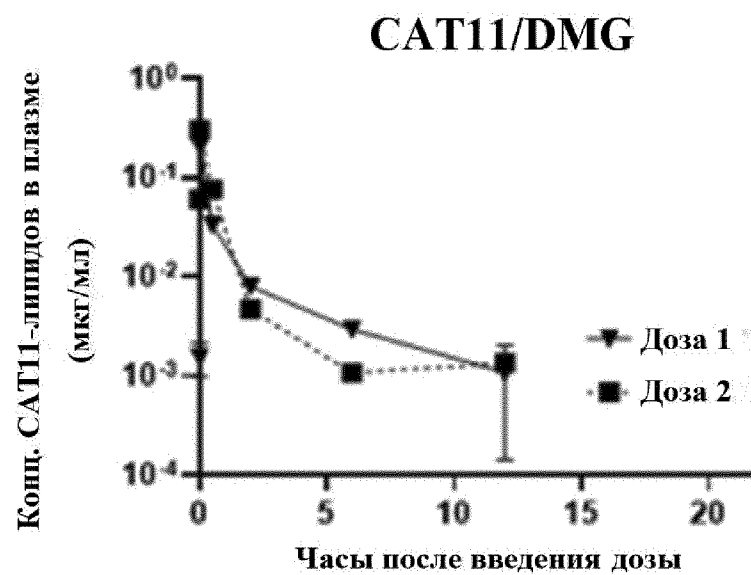
ФИГ. 63В



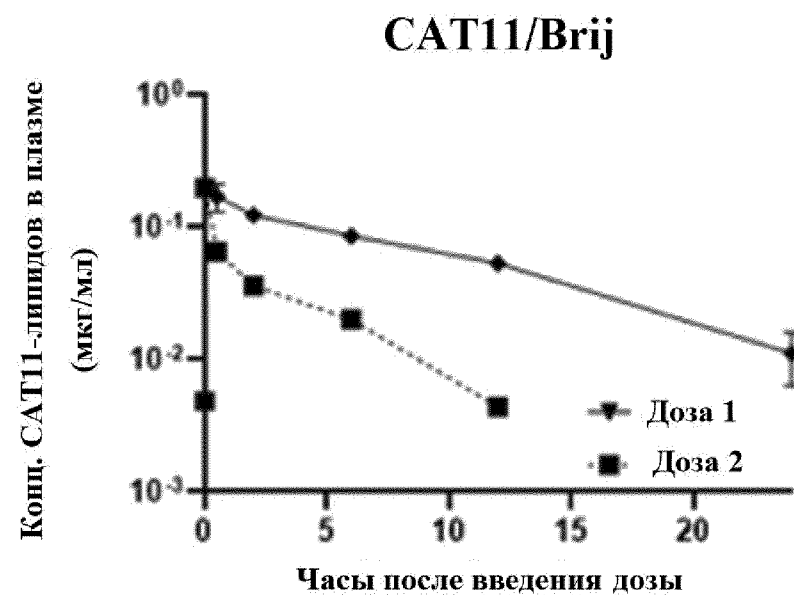
ФИГ. 63С



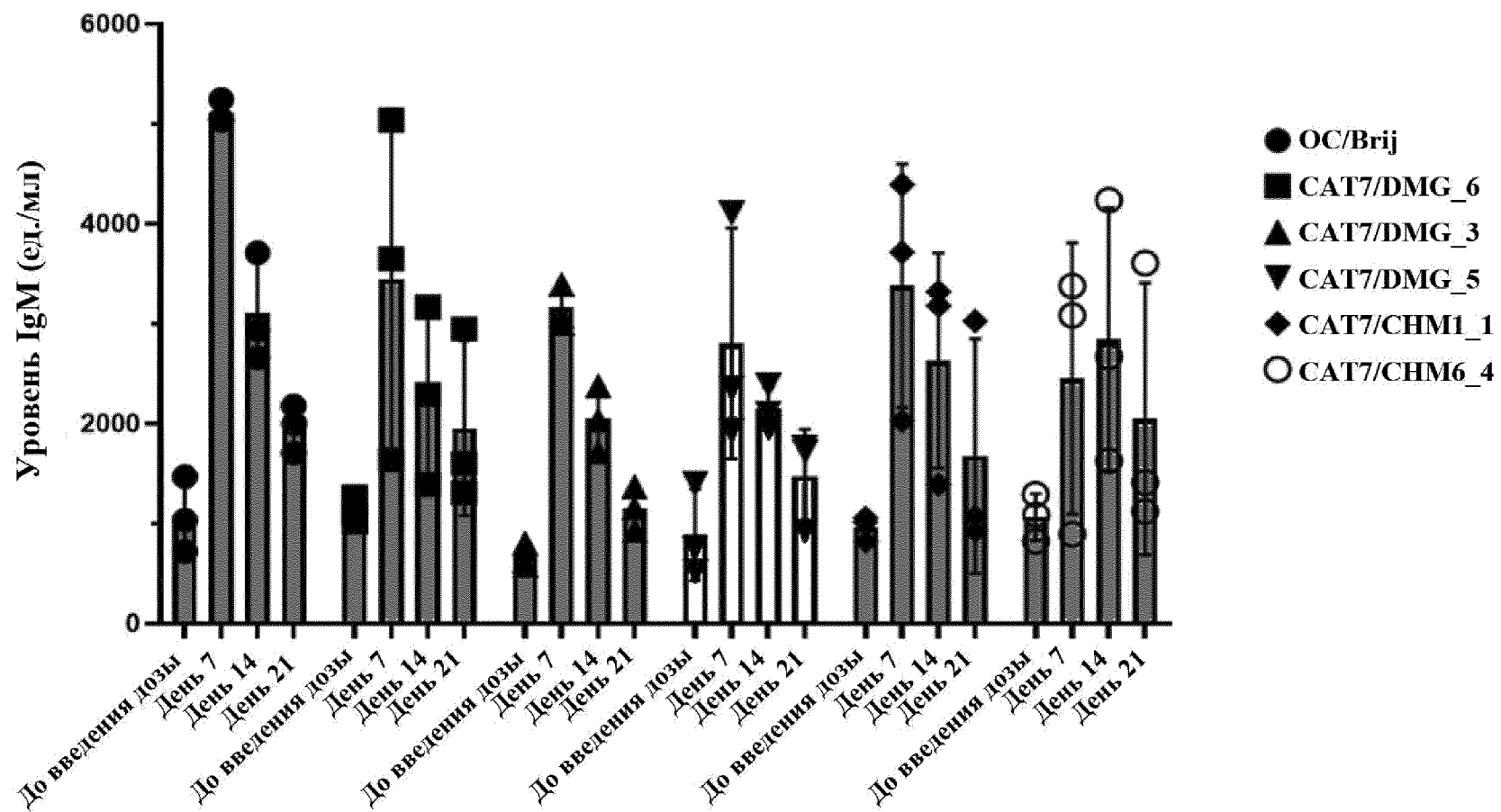
ФИГ. 63D



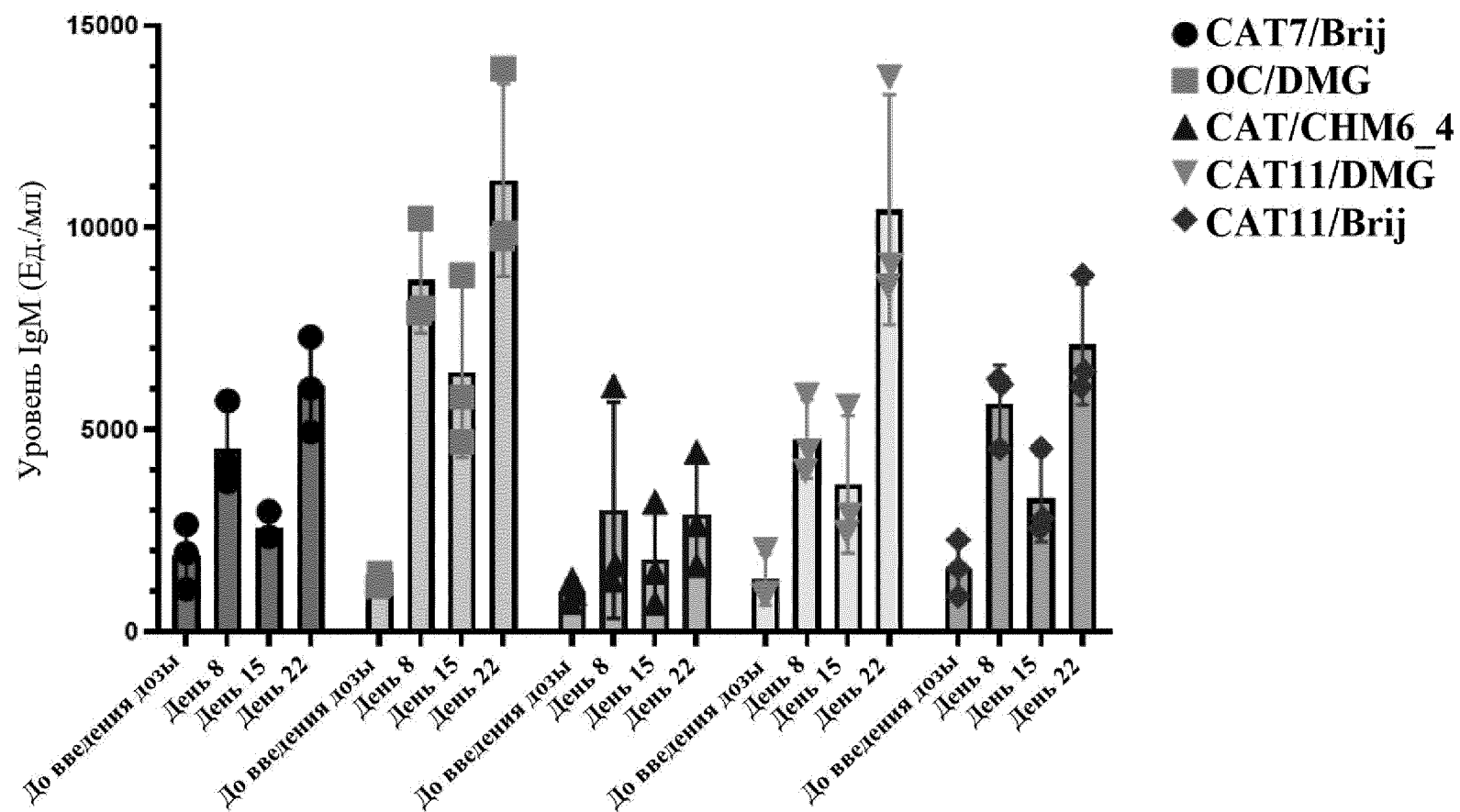
ФИГ. 63E



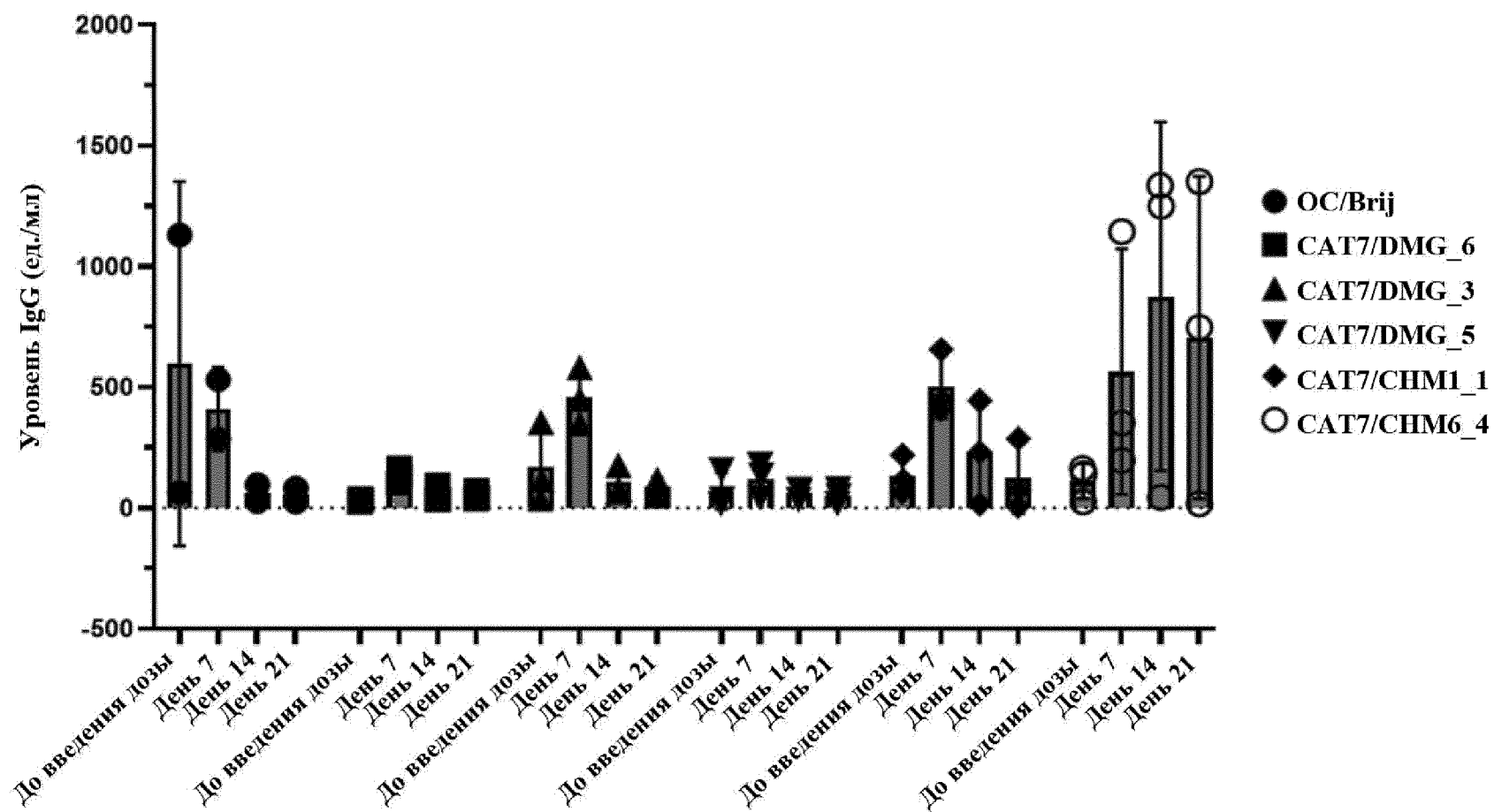
ФИГ. 64А



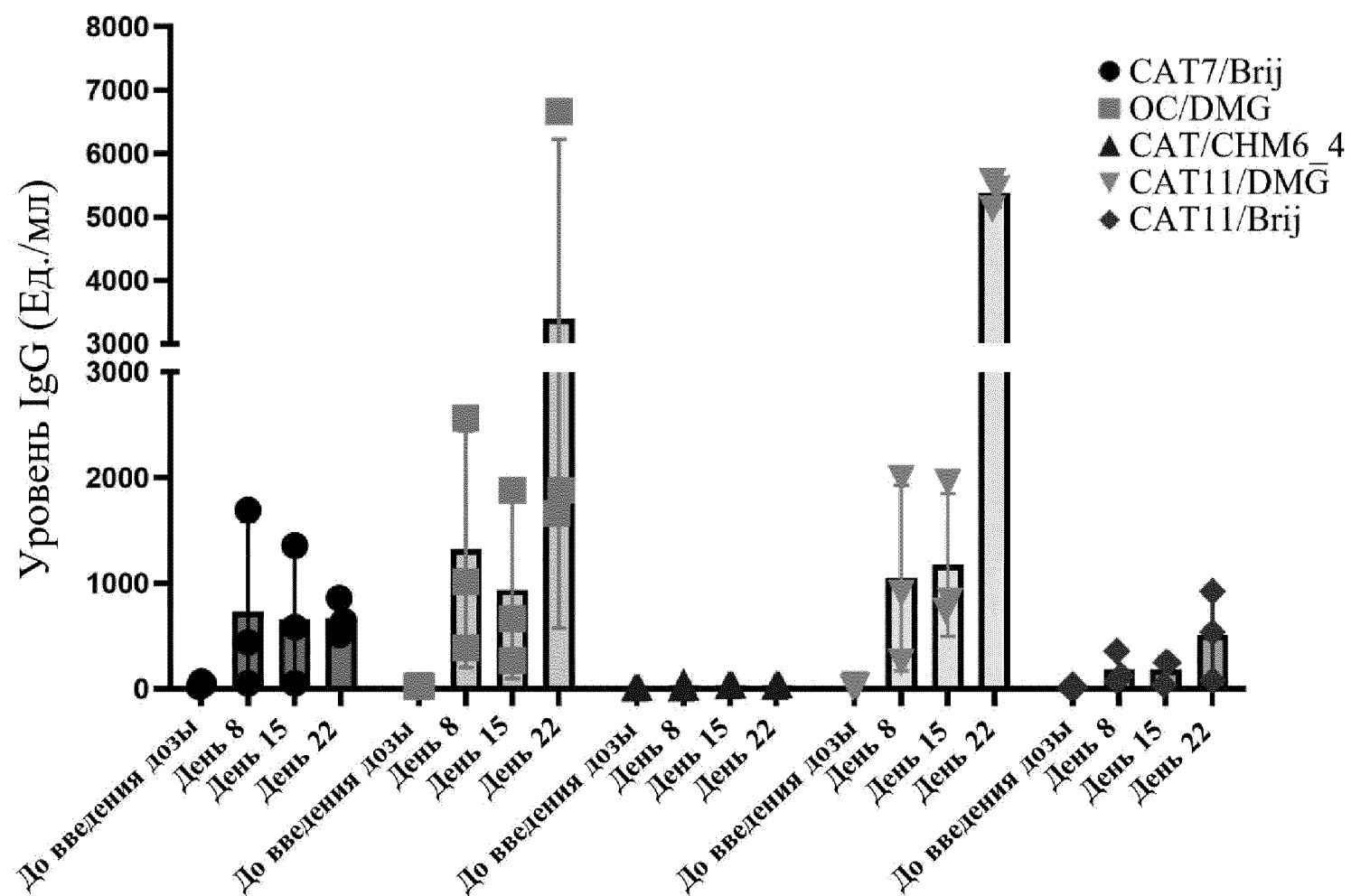
ФИГ. 64В



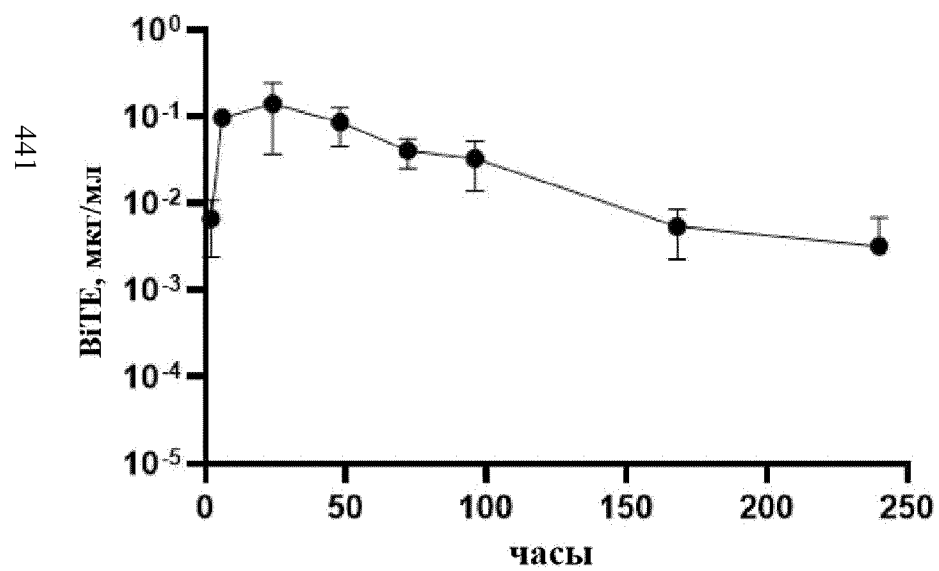
ФИГ. 65А



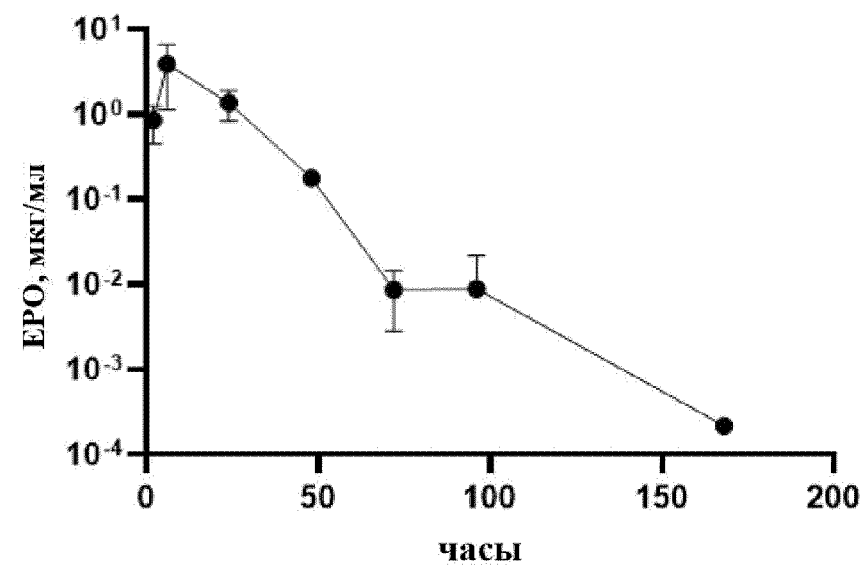
ФИГ. 65В



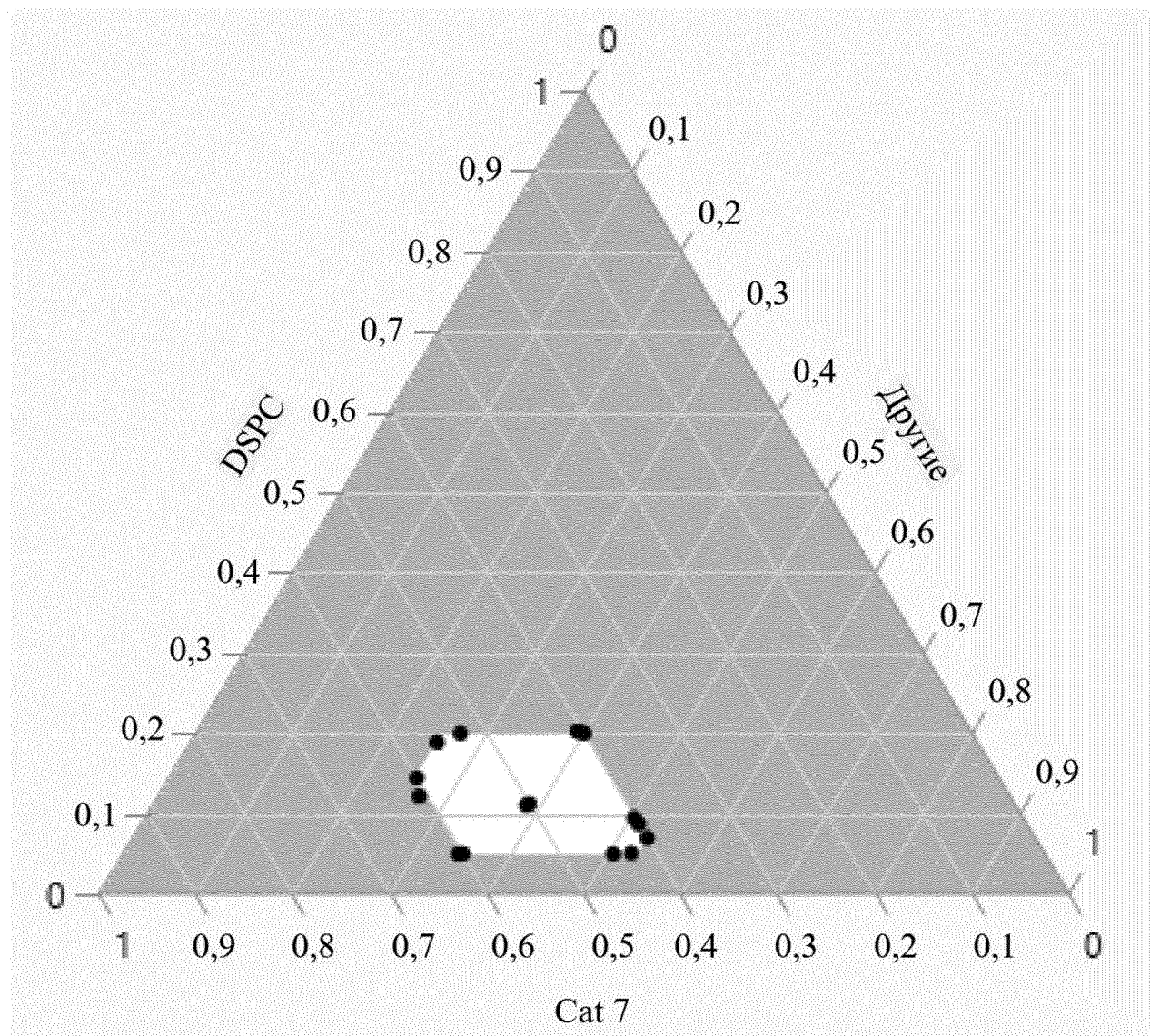
ФИГ. 66А

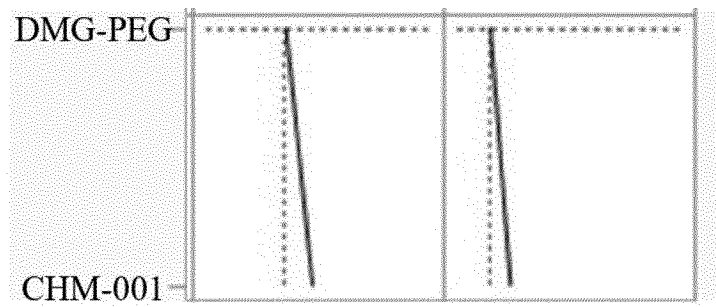


ФИГ. 66В



ФИГ. 67





ФИГ. 68

