

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392426 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.02

(22) Дата подачи заявки
2022.02.18

(51) Int. Cl. C12N 7/04 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(54) КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, ОБЛАДАЮЩЕЕ ПРОТИВОВИРУСНЫМ ЭФФЕКТОМ В ОТНОШЕНИИ НОВОГО КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2

(31) 2021106335

(32) 2021.03.11

(33) RU

(86) PCT/RU2022/000050

(87) WO 2022/191738 2022.09.15

(71) Заявитель:

ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР "ИНСТИТУТ
ИММУНОЛОГИИ"
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-
БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА
(RU)

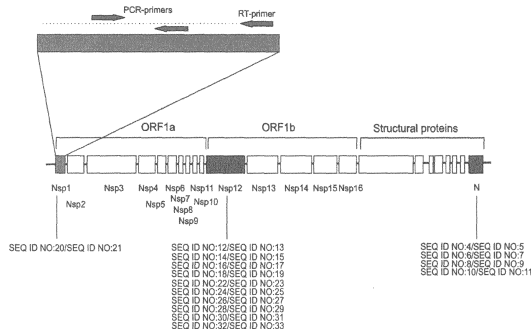
(72) Изобретатель:

Хаитов Муса Рахимович, Шиловский
Игорь Петрович, Кожихова
Ксения Вадимовна, Кофиади Илья
Андреевич, Смирнов Валерий
Валерьевич, Сергеев Илья
Викторович, Трофимов Дмитрий
Юрьевич, Трухин Виктор Павлович,
Скворцова Вероника Игоревна (RU)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к медицине, а именно к биотехнологии, вирусологии, иммунологии и фармакологии, а именно настоящее изобретение в целом относится к получению комбинированного лекарственного средства (КЛС), обладающего противовирусным эффектом в отношении коронавируса SARS-CoV-2 и родственных вирусов при условии тождественности генетической мишени, против которой направлен специфический компонент данного препарата. Комбинированное лекарственное средство для профилактики или лечения коронавирусной инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, содержит: (i) эффективное количество молекул миРНК, направленных против генома вируса SARS-CoV-2, представленных в виде двух комплементарных цепей, характеризующихся структурой (+G)GAAGGAAGUUCUGUUGAA(+T)(+T)dT и UUCAACAGAACUCCUCC(+T)(+T)dT; (ii) дендримерный катионный пептид, обладающий трансфекционной активностью и характеризующийся структурой $R_8K_4X_4K_2H_2KZC$, где R - аргинин; K - лизин; X - SEQ ID NO: 3; H - гистидин; Z - фенилаланин (F); C - цистеин или цистеинамид; (iii) фармацевтически приемлемое вспомогательное средство (растворитель). Изобретение обеспечивает подавление репликации вируса SARS-CoV-2, что дает новую возможность для лечения инфекции COVID19, вызываемой данным вирусом.



A1

202392426

202392426

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-302388EA/092

КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, ОБЛАДАЮЩЕЕ ПРОТИВОВИРУСНЫМ ЭФФЕКТОМ В ОТНОШЕНИИ НОВОГО КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2

Область техники

Изобретение относится к медицине, а именно биотехнологии, вирусологии, иммунологии и фармакологии, а именно настоящее изобретение, в целом, относится к получению комбинированного лекарственного средства (КЛС), обладающего противовирусным эффектом в отношении нового коронавируса SARS-CoV-2 и родственных вирусов при условии тождественности генетической мишени, против которой направлен специфический компонент данного препарата. Противовирусное действие КЛС основано на механизме РНК-интерференции (РНКи) и включает специфическое распознавание геномных мишеней вируса с последующим привлечением собственных белковых комплексов клетки, разрушающих вирусный геном (и его мРНК-транскрипты) и, тем самым, нарушающих процесс воспроизводства (репликации) вируса. КЛС может применяться, как в стационаре, так и амбулаторно для подавления репликации вируса SARS-CoV-2, снижения вирусной нагрузки, снижения риска передачи инфекции воздушно-капельным путем, облегчения симптомов COVID-19, связанных с репликацией вируса и уменьшения риска развития вызванных вирусной инфекцией клинических осложнений.

Уровень техники

В декабре 2019 года в китайском городе Ухань была зафиксирована вспышка тяжелой острой респираторной инфекции COVID-19, которая в последствии приобрела характер пандемии. Этиологическим фактором этой пандемии является новый штамм коронавируса SARS-CoV-2. Вирус SARS-CoV-2 и родственные ему вирусы SARS-CoV и MERS-CoV могут вызывать тяжелые респираторные заболевания у людей и возникли в результате трансвидового перехода от животных к человеку.

SARS-CoV-2, так же, как вирусы SARS-CoV и MERS-CoV, относится к семейству Coronaviridae, роду Beta-coronavirus. В целом коронавирусы - это оболочечные вирусы, имеющие относительно большой (около 30 000 оснований) несегментированный геном, представленный одноцепочечной (+)РНК. Геномная (+)РНК коронавирусов непосредственно служит матрицей для трансляции вирусных белков. В отличие от многих других РНК-вирусов, геномная РНК коронавирусов по общей структуре схожа с клеточной мРНК: имеет кэп-структуру на 5'-конце и полиадениловый хвост на 3'-конце.

После входа вируса в клетку на матрице геномной (+)РНК вируса транслируется вирусная репликаза (РНК-зависимая РНК-полимераза), которая синтезирует (-)РНК, комплементарную геномной РНК. В состав вирусного репликазного комплекса входят экзонуклеазы, исправляющие ошибки РНК-полимеразы (proofreading activity), в связи с чем частота мутаций в геноме коронавирусов сравнительно невелика. На матрице (-)РНК

та же репликаза синтезирует новые копии геномной (+) РНК, которые включаются в новые вирионы, а также более короткие субгеномные (+)РНК, служащие матрицами для трансляции вирусных белков.

В рамках борьбы с новой инфекцией был разработан ряд профилактических вакцин, а также средств неспецифической терапии, облегчающих течение заболевания. Однако в дополнение к существующим средствам терапии необходимы специфические препараты, оказывающие непосредственное действие на вирус, приводящие к облегчению симптомов заболевания, ускоренному разрешению заболевания, блокированию передачи инфекции и уменьшению риска развития клинических осложнений.

В настоящее время в патентной литературе имеются данные об успешном применении малых интерферирующих РНК (миРНК) в отношении инфекций, вызванных различными вирусами, в том числе коронавирусами.

В патенте CN101173275B (07.05.2008) описано изобретение, представляющее собой две двуцепочечные молекулы РНК (дцРНК), направленные к двум отдельным участкам вирусной РНК, кодирующем белок М вируса атипичной пневмонии -1 (SARS-CoV-1). Одна из молекул миРНК направлена к участку с координатами 220-241 вирусной РНК, кодирующей М-белок SARS, тогда как вторая к участку 460-480. Комбинация этих двух молекул миРНК подавляла экспрессию вирусных генов более чем на 70%.

В документе CN1648249A (03.08.2005) описываются последовательности миРНК, сконструированные для подавления экспрессии генов М, N, и Е вируса SARS-CoV-1. Показано, что три из них (№ 15, 58 и 90) ингибируют экспрессию белков слияния GFP-M, GFP-N и GFP-E, соответственно. Еще три молекулы миРНК (№8*, 51* и 56*) содержали модификацию на 3' конце смысловой цепи. Эти модифицированные миРНК более эффективно ингибировали экспрессию генов вируса SARS-CoV-1 по сравнению с оригинальными миРНК.

В документе US20050004063A1 (06.01.2005) раскрыты шесть молекул миРНК (SARSi-1-6), направленных к области генома, кодирующей репликазу 1А вируса SARS-CoV-1. Показано, что самой эффективной была миРНК SARSi-4 (5'-gсасиuгuсiаccсiиuгаugtt-3'). Кроме того, в этом патенте описаны миРНК (SARSi-7-11) направленные на область генома, кодирующую гены S, E, N и М вируса SARS-CoV-1. Авторы показали, что SARSi-2, SARSi-3, SARSi-4 и SARSi-7-11 ингибировали репликацию коронавируса SARS-CoV-1 в культуре клеток FRhk-4. Самой эффективной оказалась миРНК SARSi-4, которая практически полностью ингибировала репликацию вируса. За ней следовали SARSi-2 и SARSi-3.

Также известны последовательности миРНК, сконструированные для подавления экспрессии генов, кодирующих РНК-зависимую РНК-полимеразу, хеликазу, нуклеопротеин N и протеолитические ферменты вируса SARS-CoV-1. Эти миРНК ингибировали репликацию штамма BJ01 коронавируса SARS-CoV-1 на 50-90%. При этом самыми эффективными были миРНК, направленные к генам, кодирующим протеолитические ферменты (CN1569233A, 26.01.2005). Раскрыты последовательности

трех молекул миРНК, направленных к гену, кодирующему ORF3a вируса SARS-CoV-1 (CN101085986B, 12.12. 2007). Этот ген играет важную роль в репликации вируса поэтому сконструированные молекулы миРНК эффективно подавляют репликацию вируса.

Эффективность 62 молекул миРНК (способность ингибировать репликацию SARS-CoV-1), направленных к разным участкам генома вируса SARS-CoV-1, была протестирована в культуре клеток Vero и/или FRhk-4 (US20070270360A1, 22.11.2007).

В документе CN101182517A (21.05.2008) описывается смесь молекул миРНК, направленных к разным мишеням. В частности, к участку генома вируса SARS-CoV-1, кодирующему белок Spike (5'-AAGCTCCTAATTACACTCAAC-3'), белок nsp-9 (5'-AAGGATGAGGAAGGCAATTTA-3'), nsp-10 (5'-AAGGATAAGTCAGCTCAATGC-3') и nsp-13 (5'-ACTGGCACACTACTTGTCTGA-3'). Эффективность смеси миРНК тестировали в культуре клеток FRhK-4, зараженной вирусом SARS-CoV-1.

Известно исследование, которое проводили на макаках-резусах, инфицированных SARS-CoV-1. Смесь препаратов миРНК вводили в количестве 30мг (5% растворе глюкозы) на животное (US2007/0203082A, 30.08.2007)

В документе WO2004092383A2 (10.02.2005) изобретение включает в себя несколько типов нуклеиновых кислот, такие как: миРНК, микро-РНК (miRNA) и короткие шпилечные РНК (shRNA), а также способы, используемые для модуляции экспрессии РНК вируса SARS-CoV-1. Аналогичные изобретения описаны в патенте US20040192626A1 (30.09.2004) и в патенте US20050020525A1 (27.01.2005). Отличие от разрабатываемого препарата заключается в том, что в его состав которого входят только миРНК, ингибирующие репродукцию SARS-CoV-2.

Патент CN102453712B (19.02.2014) описывает изобретение на основе миРНК для ингибирования репликации вируса SARS-CoV-1 посредством молекул миРНК, направленных к гену хозяина, кодирующему PI4KB (phosphatidylinositol 4-kinase IIIβ). Этот фермент опосредует проникновение вируса в клетку. В отличие от разрабатываемого препарата, миРНК, описанные в патенте № CN102453712B направлены не к вирусному геному, а к геному клетки-хозяина.

Патент US7339051B2 (04.03.2008) описывает олигомерные соединения, состоящие из 8-80 азотистых оснований, направленных к геному SARS-CoV-1. Эти соединения гибридизуются с вирусной нуклеиновой кислотой и снижают репликацию SARS-CoV-1 не менее чем на 50%. Они направлены на рамки считывания генома вируса SARS-CoV-1 и при гибридизации с вирусной РНК регулируют процесс рибосомального сдвига рамки считывания. В отличие от разрабатываемого препарата в патенте № US7339051B2 описываются антисмысловые РНК и рибозимы.

Наиболее близкими по техническому решению являются изобретения CN111139241A от 12.05.2020 и CN111139242A от 12.05.2020, раскрывающие малые интерферирующие нуклеиновые кислоты для ингибирования нового штамма коронавируса SARS-CoV-2. Отличием заявленного средства является новый, ранее не описанный состав молекул миРНК, направленных против генома SARS-CoV-2 в участках,

кодирующих РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRP), лидерный протеин (nsр1) и ген N, которые ингибируют репликацию этого вируса.

Однако следует отметить, что внедрение в клиническую практику препаратов на основе миРНК ограничивается рядом факторов, к которым относятся недостаточная эффективность и безопасность средств доставки миРНК в клетки-мишени. Кроме того, важное ограничение заключается в необходимости контроля специфичности используемых миРНК и снижения неспецифического влияния миРНК на активность других генов в том числе генов в геноме человека.

Известно, что миРНК можно доставлять в клетки млекопитающих в экспериментах *in vitro* и *in vivo* множеством способов, известных специалистам в этой области, включая непосредственный контакт с клетками ("депротеинизированная" миРНК) или использование комбинации с одним или несколькими средствами.

В настоящее время известны изобретения для внутриклеточной доставки нуклеиновых кислот (НК), в т. ч. миРНК, путем трансфекции, на основе на основе липидов, полимеров, катионных пептидов. Наиболее перспективными среди них являются дендримерные катионные пептиды (ДКП). ДКП представляют собой разветвленные трехмерные структуры с плотным гидрофобным ядром и внешним слоем положительно-заряженных групп (например, амино- или гуанидиновая группы). Наличие большого количества концевых катионных групп позволяет ДКП эффективно связывать и конденсировать НК. Применение ДКП для трансфекции в значительной степени снимает проблему протеолитической устойчивости ввиду того, что они содержат неприродные ϵ -амидные связи, недоступные для природных ферментов.

Многие методы получения комплексов дендримеров с миРНК и плазмидами и протоколы их доставки в клетки широко опубликованы, но в большинстве источников в качестве дендримерной основы используются дендримерные производные диаминоэтана/пропана/бутана, которые не имеют определенной структуры и неспособны к биодеструкции (Например, в патенте РСТ/GB02/04706 от 24.04.2003 "Dendrimers for use in targeted delivery").

В патенте US 6376248 от 23.04.2002 "Peptide-enhanced transfections» описаны многочисленные композиции для трансфекции клеток эукариот, включающие комплексы НК с пептидами, где нуклеиновая кислота связана ковалентно с линейным катионным ТАТ-пептидом (из ВИЧ), дендримером или липопептидом. Указанные в документе дендримеры являются производными непептидного дендримера РАМAM (от компании Dendritech Inc.), к концевым группам которого, присоединены остатки лизина (LysDmer) или аргинина (ArgDmer). Однако известное решение обладает повышенной токсичностью, сложностью в получении, имеет ограниченный срок хранения.

Известна публикация [1], где описывается использование ДКП, вариант полилизинового дендримера, где в терминальные ветви дендримера вводят фенил-имидазольные остатки для повышения амфипатичности молекулы. Наибольшая эффективность в плане защиты НК (на примере плазмидной ДНК) от деградации

нуклеазами была получена с помощью полилизинового дендримера, имеющего степень ветвления 5 (генерации G5), этот же препарат, единственный, проявлял приемлемую трансфекционную эффективность. В другой работе этих же авторов [2] дендримеры с генерацией G5, с концевыми остатками аргинина, показывали высокую эффективность в отношении трансфекции клеток плазмидной ДНК и последующей экспрессии гена GFP (зеленый флуоресцирующий белок) или pGL3 (люциферазы). Дендример с генерацией G6 хотя и был также эффективен, но оказался намного более токсичен, вероятно из-за высокой плотности положительного заряда. Необходимо отметить, что выход при синтезе таких дендримеров довольно низкий и препараты не были использованы для подавления экспрессии генов (с помощью РНКи).

Патент CN102911252B от 06.02.2013 “Cationic lipid containing peptide dendrimer, transgenic carrier and preparation method and application of transgenic carrier” описывает соединения, как носители для внутриклеточной доставки плазмид, содержащих гены GFP или pGL3. Структура описываемых носителей содержит короткий аргинин-содержащий дендример с липидным фрагментом, содержащим холестерин. Однако, трансфекция в формате РНК-интерференции (миРНК) в патенте не приводится.

В патенте RU 2575603 от 20.02.2016 (РСТ: EP 2011/003719) «Получение комплексов нуклеиновых кислот и поперечно-сшитых дисульфидными связями катионных компонентов, предназначенных для трансфекции и стимуляции» авторы предлагают применять композицию, содержащую полимерный носитель и молекулу-переносчик, в качестве иммуностимулирующего агента или адъюванта. В том числе заявлены олигопептиды и белки с общей формулой $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$, однако авторы не указывают, линейные ли это пептиды или дендримеры. В качестве НК используют одноцепочечную РНК с целью индукции врожденного или адаптивного иммунитета.

В статье [3] описываются ДКП с генерацией G3 для трансфекции клеток молекулами миРНК. Дендримерные пептиды на основе лизина содержат гидрофобный участок, представленный либо гидрофобными аминокислотами, либо жирными кислотами для того, чтобы более эффективно выходить из эндосомы в цитоплазму после интернализации клетки комплексом НК/пептид. Среди них наиболее активные в ми-РНК-трансфекции ДКП были: $(KL)_8(KKL)_4(KLL)_2KK(C_{16})K(C_{16})$ и $(KL)_8(KKL)_4(KLL)_2KLLLL$. Однако, нужно подчеркнуть, что синтез и очистка таких пептидов (длина 37 и 39 аминокислот+жирные кислоты) довольно сложная и крайне дорогостоящая процедура (сделанная вручную), в результате, выходы были очень низкие (менее 10 процентов).

В статье [4] описано применение полилизиновых дендримеров содержащих более 40 остатков лизина для улучшенной доставки ДНК (плазмиды) в клетки в качестве средств для противоопухолевой терапии, указывается высокая скорость и эффективность трансфекции, а также относительно малая токсичность для здоровой ткани. Их применение для РНКи не описано. Очевидно, ввиду высокой молекулярной массы выходы пептидов при твердофазном синтезе были очень низкие.

Дендримерный пептид ЛТП, описанный в патенте RU 2572575 C1 от 20.01.2016, обладающий трансфекционной активностью при образовании комплексов с НК, низкой токсичностью в отношении клеток млекопитающих. Однако по сравнению с липосомальным средством доставки для *in vitro* исследований Lipofectamine®2000, ЛТП имеет трансфекционную активность на 2-3 порядка ниже.

Таким образом, в настоящее время существует острая необходимость в разработке нового противовирусного средства, эффективного в отношении нового коронавируса SARS-CoV-2. Одним из путей достижения этой цели является создание КЛС специфического противовирусного действия, подавляющего воспроизводство вируса по механизму РНКи.

В состав КЛС по настоящему изобретению входит ДКП, осуществляющий доставку миРНК, направленных против генома вируса SARS-CoV-2, внутрь клетки. ДКП образует комплексы с отрицательно заряженными миРНК и конденсирует их в компактные наноструктуры, и это, с одной стороны, обеспечивает защиту миРНК от действия нуклеаз, а с другой, способствует их транслокации через клеточные мембраны за счет эндоцитоза. В составе КЛС ДКП находится в избытке, обеспечивая суммарный положительный заряд всего комплекса, что повышает эффективность его проникновения в клетки, т.к. поверхность клетки обычно несет отрицательный заряд.

Краткое содержание изобретения

Настоящее изобретение в целом обеспечивает новое лечение состояний и нарушений, связанных с симптомами COVID-19.

Целью, лежащей в основе данного изобретения, является получение нового этиотропного противовирусного средства, обладающего высокой эффективностью в отношении SARS-CoV-2.

Решение этой проблемы обеспечено получением комбинированного лекарственного средства с созданными молекулами миРНК, способными опосредовать мишень-специфическое подавление репликации вируса SARS-CoV-2 за счет механизма РНКи, и ДКП, обладающего повышенной трансфекционной активностью и выступающего в роли носителя для молекул миРНК.

В общем варианте осуществления КЛС для профилактики или лечения коронавирусной инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, содержит: (i) эффективное количество молекул миРНК, направленных против генома вируса SARS-CoV-2, представленных в виде двух комплементарных цепей с нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4 - SEQ ID NO 33, или содержащих модификацию LNA в одной или нескольких позициях смысловой и антисмысловой цепи указанных последовательностей, (ii) дендримерный катионный пептид (КК-46), обладающий трансфекционной активностью и характеризующийся структурной формулой $R_8K_4X_4K_2H_2KZC$, где R - аргинин; K - лизин; X - 5 аминокислот в любом порядке, где аминокислоты представляют собой: триптофан (W), лейцин (L), изолейцин (I), треонин (T), валин (V), пролин (P), глутаминовую кислоту (E); H -

гистидин; Z - гидрофобный аминокислотный остаток, содержащий аланин (A) или фенилаланин (F); C - цистеин или цистеинамид, (iii) фармацевтически приемлемое вспомогательное средство (растворитель).

Эффективное количество молекул миРНК, направленных против генома вируса SARS-CoV-2 также представлено в виде двух комплементарных цепей структуры (+G)GAAGGAAGUUCUGUUGAA(+T)(+T)dT и UUCAACAGAACUCCUCCC(+T)(+T)dT, где знаком «+» отмечены LNA-модифицированные нуклеотиды, а dT - обозначен дезокситимидин.

Эффективное количество дендримерного катионного пептида, обладающего трансфекционной активностью содержит линейный участок аминокислотных остатков, представленный последовательностью SEQ ID NO 3.

КЛС (siRk-12-EM/KK-46) по настоящему изобретению содержит: (i) эффективное количество молекул миРНК (siRk-12-EM), направленных против генома вируса SARS-CoV-2, представленных в виде двух комплементарных цепей, характеризующихся структурой (+G)GAAGGAAGUUCUGUUGAA(+T)(+T)dT и UUCAACAGAACUCCUCCC(+T)(+T)dT, где модифицированные нуклеотиды в смысловой и антисмысловой цепи представлены модификацией LNA (ii) ДКП, обладающий трансфекционной активностью и характеризующийся структурой $R_8K_4X_4K_2H_2KZC$, где R - аргинин; K - лизин; X - SEQ ID NO 3; H - гистидин; Z - фенилаланин (F); C - цистеин или цистеинамид.

Эффективное количество молекул миРНК, направленных против генома вируса SARS-CoV-2, в составе КЛС составляет от 1 мкг до 10 г, предпочтительно от 1 мкг до 100 мг, в особенности от 10 мкг до 10 мг и катионного дендримерного пептида от 1 мкг до 10 г, предпочтительно от 10 мкг до 1 г, в особенности от 1 мг до 100 мг.

Комбинированное лекарственное средство предназначено для ингаляционного или интраназального введения.

Способ лечения профилактики или лечения коронавирусной инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, включает введение в организм млекопитающих заявленного КЛС в эффективном количестве. Комбинированное лекарственное средство вводится одновременно, отдельно или последовательно с другими терапевтическими средствами. При этом способ лечения включает ингаляционное или интраназальное введение КЛС.

Набор для получения комбинированного лекарственного средства содержит по меньшей мере два контейнера, где первый контейнер содержит компонент (А): эффективное количество молекул миРНК, направленных против генома вируса SARS-CoV-2, представленных в виде двух комплементарных цепей с нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4 - SEQ ID NO 33, и/или содержащих модификацию LNA в одной или нескольких позициях смысловой и антисмысловой цепи указанных последовательностей, второй контейнер содержит компонент (Б): дендримерный катионный пептид, обладающий трансфекционной активностью и характеризующийся структурной формулой $R_8K_4X_4K_2H_2KZC$, где R -

аргинин; К - лизин; Х - 5 аминокислот в любом порядке, где аминокислоты представляют собой: триптофан (W), лейцин (L), изолейцин (I), треонин (Т), валин (V), пролин (P), глутаминовую кислоту (E); Н - гистидин; Z - гидрофобный аминокислотный остаток, содержащий аланин (A) или фенилаланин (F); С - цистеин или цистеинамид, и инструкцию по применению.

Набор дополнительно содержит один или несколько контейнеров с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом. В наборе компонент (A) и компонент (B) находятся в лиофилизированной форме.

В одном варианте осуществления изобретения набор содержит компонент (A), где эффективное количество молекул миРНК, направленных против генома вируса SARS-CoV-2, представлено в виде двух комплементарных цепей, характеризующихся структурой $(+G)GAAGGAAGUUCUGUUGAA(+T)(+T)dT$ и $UUCAACAGAACUCCUCCC(+T)(+T)dT$, где модифицированные нуклеотиды в смысловой и антисмысловой цепи представлены модификацией LNA. Компонент (B) представляет собой катионный дендримерный пептид со структурной формулой R8K4X4K2H2KZC, где R - аргинин; К - лизин; Х - SEQ ID NO 3; Н - гистидин; Z - фенилаланин (F); С - цистеин или цистеинамид, в виде биосовместимой соли или основания.

Технический результат заключается в создании эффективного противовирусного средства, обеспечивающего подавление репликации вируса SARS-CoV-2 и безопасную его доставку в клетки-мишени.

Указанный технический результат достигается тем, что синтетические миРНК представляющие собой дуплексы комплементарных одноцепочечных РНК с нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO 1 и SEQ ID NO 2 или в вариантах осуществления последовательностями SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO:33 специфически воздействуют на один или несколько участков в геноме вируса SARS-CoV-2 или на мРНК-транскрипты вируса. Технический результат по настоящему изобретению достигается тем, что созданы синтетические миРНК с последовательностями SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, где указанные миРНК направлены против региона в геноме SARS-CoV-2, кодирующего RdRp.

Также указанный технический результат достигается тем, что создано КЛС, содержащее модифицированные синтетические миРНК структуры $(+G)GAAGGAAGUUCUGUUGAA(+T)(+T)dT$ и $UUCAACAGAACUCCUCCC(+T)(+T)dT$, где знаком «+» отмечены LNA-модифицированные нуклеотиды, а dT - обозначен дезокситимидин, где указанные миРНК осуществляют более эффективное блокирование репликативного цикла вируса по сравнению с не модифицированными миРНК. При этом модификация молекулы миРНК нуклеотидами LNA приводит к увеличению резистентности миРНК к воздействию нуклеаз с сохранением антивирусного эффекта, что в итоге обеспечивает пролонгированный противовирусный эффект.

Также указанный технический результат достигается тем, что обеспечивается эффективная и безопасная доставка полученных синтетических миРНК с помощью ДКП, обладающего трансфекционной активностью, обеспечивающего суммарный положительный заряд всего комплекса, что повышает эффективность его проникновения в клетки и характеризующегося структурой $R_8K_4X_4K_2N_2KZC$, где R - аргинин; K - лизин; X - SEQ ID NO 3; H - гистидин; Z - фенилаланин (F); C - цистеин или цистеинамид, что позволяет проводить противовирусную терапию на основе механизма РНКи.

Сущность заявленной группы изобретений поясняется чертежами.

Краткое описание графических материалов.

ФИГ. 1. Схематическое изображение генома вируса SARS-CoV-2 с указанием мишеней, против которых направлены миРНК по настоящему изобретению и его вариантах (nsp1 - лидерный протеин, RdRp - РНК-полимераза, N - нуклеопротеин).

ФИГ. 2. Схематическое изображение механизма биологического эффекта препаратов на основе молекул миРНК, направленных против геномных мишеней коронавирусов.

ФИГ. 3. Модифицированная миРНК обладает повышенной устойчивостью к деградации нуклеазами: а) Стабильность немодифицированной siRk-12 (круглый маркер) и модифицированной siRk-12-EM (квадратный маркер) в 50% сыворотке мыши сравнивали в течение 264 ч при 37°C (N=4). б) Для этого аликвоты каждого образца (3 мкг миРНК на дорожку геля) анализировали методом 1.5% агарозного гель-электрофореза. Количество миРНК в различных временных точках рассчитывалось методом анализа электрофореграмм с использованием программного обеспечения ImageLab (BioRad); Различия между несколькими группами анализировали методом ANOVA с тестом Даннетса.

ФИГ. 4. Плазмидные конструкции и положение участков связывания молекул миРНК в геноме SARS-CoV-2. Схема бицистронной экспрессионной плазмиды, кодирующей люциферазу светлячков (Luc) и полноразмерный фермент RdRp (pVAX1-pRdRp-full-IRES-LUC) (a) Nsp1 (pVAX1-LP-IRES-LUC) (b), или N (pVAX1-N-IRES-LUC) (c), d) позиции участков связывания молекул миРНК в геноме SARS-CoV-2. Отмечена область гена ORF1 (nsp1-лидерный белок), на которую создана ОТ-ПЦР-ПВ тест-система для количественной детекции вирусной нагрузки в клетках.

ФИГ. 5. Противовирусный эффект молекул миРНК в экспериментах *in vitro* на модели с использованием рекомбинантных плазмид. Клетки Hep-2 трансфецировали каждой из плазмид, кодирующих гены SARS-CoV-2, и ген люциферазы светлячка (pVAX1-pRdRp-full-IRES-LUC) (a), pVAX1-N-IRES-LUC (b) или pVAX-LP-IRES-LUC (c) с последующей трансфекцией специфической, направленной против генома SARS-CoV-2 или контрольной миРНК. В качестве положительного и отрицательного контроля использовали миРНК, направленные против гена люциферазы (siLuc) и гена флуоресцентного белка GFP (siGFP). Lipofectamine3000 использовался в качестве средства доставки плазмид и миРНК. Спустя 24 часа клетки были собраны, лизированы и в лизатах

была оценена активность люциферазы. Данные выражены в виде относительных единиц люминесценции (RLU) на 10 тыс. клеток. Различия между несколькими группами были оценены с помощью теста Краскела-Уоллиса с последующим использованием (при необходимости) непарного U-теста Манна-Уитни. На диаграмме показаны медианы пяти независимых экспериментов $\pm$ SD.

ФИГ. 6. Противовирусный эффект молекул миРНК в экспериментах *in vitro* на модели инфекции клеток Vero E6 вирусом SARS-CoV-2. Клетки Vero E6 трансфецировали комплексами миРНК/Lipofectamine 3000. Среда с комплексами была удалена через четыре часа после трансфекции и клетки были инфицированы SARS-CoV-2 при MOI=0,0001. Вирусную нагрузку определяли методом ОТ-ПЦР-РВ. Результаты выражены в виде количества копий РНК вируса на мл. Различия между несколькими группами оценивали с помощью теста Краскела-Уоллиса с последующим использованием (при необходимости) непарного U-теста Манна-Уитни. На диаграмме показаны медианы пяти независимых экспериментов $\pm$ SD.

ФИГ. 7. Ингибирование репликации SARS-CoV-2 в экспериментах *in vitro* комплексами, состоящими из немодифицированных или LNA-модифицированных миРНК (siRk-12 и siRk-12-EM) и ДКП КК-46. Клетки Vero E6 трансфецировали комплексами siRk-12/КК-46 или siRk-12-EM/К-46 в трех концентрациях (ось x). Среда с комплексами удаляли через четыре часа после трансфекции, и клетки заражали SARS-CoV-2 при MOI=0,0001. Через 48 часов супернатанты и клетки были собраны. Вирусную нагрузку определяли методом ОТ-ПЦР-РВ в лизатах клеток (а) и супернатантах клеток (б). Результаты выражены в виде копий вирусной РНК на мл. Различия между несколькими группами были оценены с помощью теста Краскела-Уоллиса с последующим использованием (при необходимости) непарного U-теста Манна-Уитни. На диаграмме показаны медианы пяти независимых экспериментов $\pm$ SD.

ФИГ. 8. Оценка трансфекционной активности ДКП КК-46 на клетках Vero C1008 (E6), HEK293, A549, HepG2, ФЭЧ, HeLa. Клетки трансфецировали с помощью ДКП в 3 разведениях (с массовыми соотношениями пептида к НК - 50:1, 25:1 и 12,5:1) в комплексе с плазмидой pGL3 Luciferase Reporter Vector (0,3 мкг). В качестве положительного контроля использовали коммерческий трансфекционный агент Lipofectamine2000 (Lf) в комплексе с pGL3. В качестве отрицательного контроля использовали плазмиду pGL3 без носителя (PI). Данные выражены в относительных единицах люминесценции (RLU). Различия между несколькими группами проанализированы с помощью критерия Стьюдента с использованием программы Statistica 8.0. На диаграмме показаны медианы пяти независимых экспериментов.

ФИГ. 9. Химическая схема синтеза ДКП КК-46.

ФИГ. 10. Трансфекционные свойства ДКП КК-46. Клетки Hep-2 трансфецировали комплексами pGL3 Luciferase Reporter Vector (0,25 мкг) и ДКП КК-46 (ось x) в различных массовых соотношениях 100:1, 50:1, 25:1, 20:1, 12,5:1, 5:1. Проведена оценка активности люциферазы через сутки после трансфекции. В качестве положительного контроля

использовали комплекс pGL3/Lipofectamin3000. Данные выражены в относительных единицах люминесценции (RLU). Различия между несколькими группами были проанализированы методом ANOVA с использованием теста Тьюки. На диаграмме показаны медианы пяти независимых экспериментов. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

ФИГ. 11. Дозозависимое ингибирование репликации SARS-CoV-2 в легких хомячков после ингаляционного введения КЛС siRk-12-EM/КК-46, состоящего из модифицированных молекул миРНК (siRk-12-EM) и ДКП КК-46 в экспериментах *in vivo*. Сирийских хомячков заражали SARS-CoV-2 в дозе 10^5 БОЕ на животное и обрабатывали тремя дозами КЛС siRk-12-EM/КК-46 (0,7, 1,96 и 5,6 мг/кг). Ингаляции с комплексами повторялись ежедневно в течение шести суток. Через два и шесть дней после инфицирования животных забивали и проводили определение вирусного титра (а) и макроскопическую оценку плюс оценку гистопатологии (б) в легких. Гидроксихлорохин назначали *per os* (в течение 1 часа после инфицирования доза 3,8 мг/животное, а затем ежедневно в течение 6 дней после инфицирования 1,5 мг/животное). Результаты выражены в виде БОЕ на мл (а) или баллов (б), полученных для гистологического анализа патологических изменений в легких хомячков; в) кривая "доза-ответ" по титру вируса в легких на шестой день после инфицирования, где ED50 составляет ~ 3.453 мг/кг. Различия между несколькими группами были оценены с помощью теста Краскела-Уоллиса с последующим тестированием с использованием непарного U-теста Манна-Уитни. На диаграмме указаны медианы одного эксперимента (пять животных на группу) $\pm$ SDs.

ФИГ. 12. Влияние многократных ингаляционных введений КЛС siRk-12-EM/КК-46 (содержащего модифицированные молекулы миРНК siRk-12-EM и ДКП КК-46) в низких дозах у сирийских хомячков. Сирийские хомячки были инфицированы SARS-CoV-2 в дозе 10^5 БОЕ/животное и подвергнуты аэрозольной обработке различными дозами препарата (0,175, 0,35 и 1,0 мг/кг) дважды в сутки с интервалом в два часа. Таким образом суточная доза препарата составила 0,35, 0,7 и 2 мг/кг. Через два и шесть дней после инфицирования животных забивали, анализировали вирусные титры (а) и проводили макроскопическую оценку и оценку гистопатологических повреждений (б) в легком. Фавипиравир назначали *per os* (через 1 час после инфицирования дозу 1,2 мг на животное вводили дважды в сутки, а затем ежедневно в течение 6 дней после инфицирования 0,4 мг на животное дважды в сутки). Результаты выражены в виде БОЕ на мл (а) или баллов (б), полученных для гистологического анализа патологических изменений в легких. Различия между несколькими группами были оценены с помощью теста Краскела-Уоллиса с последующим тестированием с использованием непарного U-теста Манна-Уитни. На диаграмме указаны медианы одного эксперимента (пять животных на группу) $\pm$ SDs.

Подробное описание изобретения

Варианты КЛС, предусмотренные в данном документе, включают без ограничения фармацевтические композиции по данному изобретению. Выражение «фармацевтическая композиция» относится к составу композиции с одним или более фармацевтически

приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами, обычно приемлемыми в данной области техники для доставки соединения или лекарственного средства млекопитающему, например, человеку.

«Фармацевтически приемлемый» относится к тем соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые в пределах обоснованного медицинского суждения подходят для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или осложнения.

Фармацевтические лекарственные формы могут дополнительно содержать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, которое в данном контексте включает, но не ограничивается ими, любые растворители, дисперсионные среды, разбавители или другие жидкие носители, дисперсионные или суспензионные добавки, поверхностно-активные агенты, изотонические агенты, загустители или эмульгаторы, консерванты и т.п., в соответствии с конкретной требуемой лекарственной формой.

Соответственно, лекарственные формы согласно настоящему изобретению могут содержать одно или более вспомогательных веществ, каждое в количестве, которое может увеличивать стабильность миРНК, увеличивать клеточную трансфекцию миРНК.

Лекарственные формы фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, могут быть получены любым известным способом. В целом, такие способы получения включают стадию взаимодействия активного ингредиента с вспомогательным веществом и/или одним или более вспомогательными ингредиентами.

В конкретных вариантах осуществления предусмотренная в данном документе фармацевтическая композиция составлена таким образом, чтобы содержащиеся в ней активные ингредиенты были биодоступными после введения композиции субъекту. В вариантах осуществления фармацевтические композиции могут быть получены путем комбинирования молекул миРНК и ДКП с соответствующим фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или вспомогательным веществом и могут быть составлены в виде препаратов в твердой форме (лиофилизированной форме) или жидкости. Однако, в определенных вариантах осуществления указанные соединения могут быть растворены или суспендированы в стерильной воде, физиологическом растворе, фосфатном буферном растворе или любом другом растворителе, призванном обеспечить физиологические условия для функционирования КЛС.

КЛС настоящего изобретения может быть произведено в лекарственной форме, предназначенной для ингаляционного введения. В одном из воплощений настоящего изобретения твердая лекарственная форма (лиофилизат) растворяется или диспергируется в жидкой среде перед применением и полученная суспензия, эмульсия, или раствор вводится ингаляционно. Процедуру ингаляции осуществляют в течение 5-20 минут с использованием небулайзера.

Такие фармацевтические составы можно получать, упаковывать в качестве лиофилизатов, растворов и/или суспензий, необязательно стерильных, содержащих

активные ингредиенты, и их можно удобным образом вводить с использованием любого устройства для распыления и/или пульверизации.

Такие составы, кроме того, могут содержать один или несколько дополнительных ингредиентов, включая, но не ограничиваясь ими, вкусовую добавку, такую как сахарин натрий, летучее масло, буферное вещество, поверхностно-активное вещество и/или консервант.

Составы, описанные в настоящем описании в качестве пригодных для внутрилегочной доставки, пригодны также для интраназальной доставки фармацевтической композиции и могут быть произведены в виде назальных капель или назального спрея.

Составы, пригодные для ингаляционного или назального введения могут содержать, например, от приблизительно только 0,1% (масс./масс.) и вплоть до 100% (масс./масс.) активного ингредиента, и могут содержать один или несколько дополнительных ингредиентов, указанных в настоящем описании.

Согласно настоящему изобретению, КЛС может быть использовано для профилактики или лечения COVID-19, вызываемой SARS-CoV-2.

Термин "лечение" относится к частичному или полному снижению, облегчению, улучшению, ослаблению, отсрочке возникновения, ингибированию прогрессирования, снижению тяжести и/или уменьшению частоты возникновения одного или более симптомов или признаков конкретной инфекции, заболевания, расстройства и/или патологического состояния. Лечение может быть введено субъекту, не проявляющему признаков заболевания, инфекции, расстройства и/или патологического состояния, и/или субъекту, демонстрирующему лишь ранние признаки заболевания, инфекции, расстройства и/или патологического состояния для снижения риска развития патологии, связанной с заболеванием, инфекцией, расстройством и/или патологическим состоянием.

Особый интерес представляет лечение существующего заболевания, когда лечение стабилизирует или уменьшает нежелательные клинические симптомы пациента.

Используемая в данном документе фраза «улучшение по меньшей мере одного симптома» относится к уменьшению одного или более симптомов заболевания или состояния, от которого субъект получает лечение.

КЛС может быть введено на ранней стадии инфекции во время инкубационной фазы, или во время активной инфекции после возникновения симптомов.

В одном из вариантов реализации согласно настоящему изобретению миРНК в составе КЛС могут быть введены в терапевтически эффективном количестве, а также с другими профилактическими или терапевтическими соединениями.

В данном контексте термин "терапевтически эффективное количество" означает количество агента, подлежащего доставке (например, миРНК), которое является достаточным при введении субъекту, страдающему от инфекции, заболевания, расстройства и/или патологического состояния или предрасположенному к ним, с целью лечения, улучшения симптомов, предупреждения и/или отсрочки возникновения

инфекции, заболевания, расстройства и/или патологического состояния.

«Терапевтически эффективное количество» может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние болезни, возраст, пол и вес индивидуума и средство для получения желаемого ответа у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также относится к такому, при котором любые токсичные или вредные эффекты средства перевешиваются терапевтически благоприятными эффектами.

КЛС вводится одновременно, отдельно, последовательно с другими терапевтическими средствами, или в комбинации с другими известными методами лечения вирусной инфекции, в частности в отношении нового коронавируса SARS-CoV-2 или родственных вирусов при условии тождественности генетической мишени, против которой направлено КЛС. Такие терапевтические средства могут быть приняты в данной области в качестве стандартного лечения для конкретного состояния, описываемого в данном документе, такого как COVID-19.

Молекулы миРНК по настоящему изобретению можно получать общепринятыми способами в этой области, включающими химический синтез или экспрессию нуклеиновой кислоты *in vitro* или *in vivo*. В одном из вариантов осуществления миРНК получают с использованием твердофазного химического синтеза.

Молекулы миРНК по изобретению являются двухцепочечными и содержат 21 (в немодифицированном исполнении SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29) или 22 (в модифицированном исполнении SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2) пары оснований.

Эффективное количество молекул малых интерферирующих РНК представляет собой количество, необходимое для осуществления по меньшей мере 25% снижения параметра, например, ингибирования репликации генов коронавируса. Диапазон эффективного количества миРНК составляет 0,001-5,0 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления “супрессия”, или “сайленсинг”, или “ингибирование” используются взаимозаменяемо для обозначения понижающей регуляции экспрессии продукта последовательности-мишени относительно ее нормального уровня экспрессии в организме дикого типа. Супрессия включает экспрессию, которая уменьшается на примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% относительно уровня экспрессии дикого типа.

В определенных вариантах осуществления композиция может уменьшать уровень экспрессии в клетке на приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 100% по сравнению с клеткой, которая не контактировала с данной композицией.

Используемые в данном документе термины «снижение» или «понижение» или

«уменьшение» или «сокращение» или «ослабление» относятся в целом к способности предусматриваемых композиций производить или вызывать меньший физиологический ответ по сравнению с ответом, вызываемым контрольной молекулой/композицией, например

«Уменьшенный» или «сниженный» ответ обычно является «статистически значимым» ответом и может включать уменьшение в 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 или более раз.

В основных вариантах осуществления нуклеотиды в одном или нескольких (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22) положениях независимо в одной или обеих цепях молекулы миРНК являются модифицированными, что не приводит к изменению свойства специфического нацеливания на геном вируса.

В другом варианте данного изобретения молекула миРНК может содержать по меньшей мере один модифицированный аналог нуклеотида. Аналоги нуклеотидов могут быть локализованы в положениях, которые по существу не определяют мишень-специфическую активность, например, опосредующую РНК активность, например, в районе при 5'-конце и/или 3'-конце двухцепочечной молекулы РНК. Модифицированная миРНК по настоящему изобретению может содержать один или несколько химически модифицированных рибонуклеотидов антисмысловой цепи или смысловой цепи или и той, и другой одновременно.

Модификации можно использовать для улучшения характеристик *in vitro* или *in vivo*, таких как стабильность, активность, иммуногенность и/или биодоступность.

В частности, каждая нуклеотидная последовательность миРНК может содержать по меньшей мере один модифицированный аналог нуклеотида.

Модификации в соответствии с настоящим изобретением могут представлять собой модификации рибонуклеиновых кислот (РНК), например, модифицирована заблокированными нуклеиновыми кислотами (LNA).

Последовательность двухцепочечной молекулы РНК данного изобретения имеет достаточную идентичность относительно молекулы нуклеиновой кислоты-мишени для опосредования мишень-специфической РНКи.

Идентичность означает степень родства последовательностей между нуклеотидными последовательностями, которую определяют на основе совпадения порядка и природы нуклеотидов в последовательностях. В одном из вариантов осуществления антисмысловая нить миРНК, имеющая комплементарность, составляющую 80% и от 80% вплоть до 100%, например, комплементарность 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с последовательностью мРНК-мишени, считают по существу комплементарной, и ее можно применять в настоящем изобретении. Процент комплементарности описывает процент следующих друг за другом нуклеотидов в первой молекуле нуклеиновой кислоты, которые могут образовывать пары оснований согласно правилу Уотсона-Крика с группой следующих друг за другом нуклеотидов во второй молекуле нуклеиновой кислоты.

Варианты ДКП по настоящему изобретению представлены общей формулой $R_8K_4X_4K_2H_2KZC$, где

R - аргинин;

K - лизин;

X - 5 аминокислот в любом порядке, где аминокислоты представляют собой: триптофан (W), лейцин (L), изолейцин (I), треонин (T), валин (V), пролин (P), глутаминовую кислоту (E);

H - гистидин;

Z - гидрофобный аминокислотный остаток, предпочтительно аланин (A) или фенилаланин (F);

C - цистеин или цистеинамид;

Катионный дендримерный пептид представлен структурной формулой $R_8K_4X_4K_2H_2KZC$, где R - аргинин; K - лизин; X - SEQ ID NO 3; H - гистидин; Z - фенилаланин (F); C - цистеин или цистеинамид, в виде биосовместимой соли или основания.

В основных вариантах осуществления L-аминокислоты в одном или нескольких положениях могут быть заменены на D-изомерные остатки, C-конец пептида может быть, как в карбоксильной, так и в амидной форме, что не приводит к изменению специфических трансфекционных свойств.

В другом варианте данного изобретения молекула ДКП может содержать различный порядок из набора аминокислот, локализованных в положениях, которые по существу определяют трансфекционную активность комплексом гидрофобных свойств, например, между второй и третьей точкой ветвления.

Любой из вариантов ДКП может быть получен в виде биосовместимой соли (например, трифторацетата, ацетата, хлорида, фосфата) или основания.

Диапазон эффективного количества ДКП составляет 0,01-50,0 мг/мл.

Массовое соотношение молекул малых интерферирующих РНК и ДКП в целом может составлять от 2:1 до 1:2000, например, от 1:1 до 1:1000, от 1:2 до 1:100 или от 1:5 до 1:50. Более предпочтительно это соотношение составляет от 1:10 до 1:50, например от 1:15 до 1:25.

Растворители включают, но не ограничиваются ими, фосфатные буферные растворы не содержащую пирогенов воду, изотонический солевой раствор.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу производства комбинированного лекарственного средства для применения в ингибировании репликативного цикла вируса SARS-CoV-2 у нуждающихся в этом живых индивидуумов, включающему комбинирование i) эффективного количества молекул миРНК, направленных против генома вируса SARS-CoV-2, представленных в виде двух комплементарных цепей с нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2 или SEQ ID NO 4 - SEQ ID NO 33, содержащими модификации LNA в смысловой и/или антисмысловой цепи указанных последовательностей, (ii) ДКП, обладающего

трансфекционной активностью и характеризующегося структурной формулой $R_8K_4X_4K_2H_2KZC$, в качестве фармацевтического носителя.

Изобретение также предоставляет наборы для применения в настоящих способах.

Набор может, кроме того, включать описание выбора индивидуума, подходящего для лечения. Инструкции, поставляемые с наборами по изобретению, обычно представляют собой письменные инструкции на этикетке или упаковочном вкладыше (например, листе бумаги, включенном в набор).

Наборы по изобретению находятся в подходящей упаковке. Подходящие упаковки включают без ограничения флакончики, бутылки, гибкую упаковку и им подобные. Инструкции в целом включают информацию, относящуюся к дозировке, схеме введения и пути введения для предполагаемого лечения.

В состав набора для получения КЛС входит по меньшей мере 2 контейнера (флакона) с лиофильно высушенным компонентом (А) и компонентом (Б), представленными порошком белого цвета. В другом варианте осуществления набор содержит растворитель.

Варианты наборов могут быть представлены следующими контейнерами, но не ограничиваются ими.

Вариант 1: Флакон 1) миРНК siRk-12-ЕМ. Флакон 2) пептид КК-46.

Вариант 2: Флакон 1) миРНК siRk-12-ЕМ, NaCl, KCl, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 . Флакон 2) пептид КК-46, NaCl, KCl, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4

Вариант 3: Флакон 1) миРНК siRk-12-ЕМ, NaCl, Флакон 2) пептид КК-46, NaCl.

Вариант 4: Флакон 1) миРНК siRk-12-ЕМ. Флакон 2) пептид КК-46. Флакон 3-4) Вода для инъекций

Вариант 5: Флакон 1) миРНК siRk-12-ЕМ, NaCl, KCl, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 . Флакон 2) пептид КК-46, NaCl, KCl, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 3-4) Вода для инъекций

Вариант 6: Флакон 1) миРНК siRk-12-ЕМ. Флакон 2) пептид КК-46. Флакон 3-4) Фосфатный буферный раствор

Вариант 7: Флакон 1) миРНК siRk-12-ЕМ. Флакон 2) пептид КК-46. Флакон 3-4) Изотонический раствор NaCl.

Вариант 8: Двухкамерный флакон 1) миРНК siRk-12-ЕМ в комплекте с растворителем. Двухкамерный флакон 2) пептид КК-46 в комплекте с растворителем.

Осуществление изобретения

Далее приведено детальное описание экспериментальных примеров, подтверждающих эффективность полученного средства для профилактики или лечения заболеваний в соответствии с данным изобретением, где приведенные примеры не предназначены для ограничения объема изобретения.

ПРИМЕР 1. Синтез миРНК, обладающих противовирусной активностью в отношении коронавируса SARS-CoV-2 и подтверждение биологической активности.

Вирусный геном SARS-CoV-2 представлен одноцепочечной положительной молекулой рибонуклеиновой кислоты РНК (+ssRNA) длиной около 30 тпн, кодирующей

не менее 5 открытых рамок считывания (Open Reading Frame, ORF). Первый ORF (ORF1a/b) занимает около 70% всего генома и кодирует 16 неструктурных белков (nsp1-16), в том числе РНК-зависимую РНК-полимеразу RdRp, необходимую для репликации вируса. Остальные 30% генома кодируют 4 основных структурных белка, необходимых для сборки вириона: шиповидный белок (S), мембранный белок (M), белок оболочки (E), белок нуклеокапсида (N) (ФИГ.1). Весь этот комплекс белков необходим для воспроизводства вируса, включающего репликацию генома и сборку новых вирусных частиц.

Процесс воспроизводства вируса может быть подавлен с помощью механизма РНКи в терапевтических целях. РНКи основана на отрицательной регуляции экспрессии генов на посттранскрипционном уровне. Суть процесса заключается в блокировании трансляции вирусных белков за счет комплементарного связывания РНК-мишени с короткими (21-26 п.н.) двуцепочечными молекулами миРНК. Противовирусный эффект обусловлен привлечением клеточных ферментов (DICER, Ago, мультисубъединичного комплекса RISC), ответственных за деградацию РНК-мишени вируса (ФИГ. 2).

Синтез РНК-олигонуклеотидов осуществляли твердофазным амидофосфатным синтезом на автоматическом ДНК/РНК синтезаторе (Polygen, Германия). Суть метода заключается в добавлении одного нуклеотидного звена к иммобилизованному защищенному нуклеозиду или олигонуклеотиду. Нуклеозидный компонент связан ковалентно с нерастворимым полимером (CPG, controlled pore glass), используемым в качестве полимерной подложки, а нуклеотидный компонент и необходимые реагенты подавались в растворенном состоянии. В синтезе РНК использовались 2'-О-TBDMS-фосфорамидиты (ChemGenes, США) соответствующих азотистых оснований. Наличие TBDMS-защитной группы на 2'-конце рибозы предотвращает разрушение молекулы во время синтетического процесса. После ее удаления комплексом триэтиламина и тригидрофторида (TEA/TEA*3HF) формируется 2'-гидроксил соответствующий «природной» РНК-молекуле.

Очистка РНК-олигонуклеотидов проводилась методом обращено-фазовой ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии). Такой метод очистки был выбран исходя из того, что только целевой компонент (синтетический РНК-олигонуклеотид) содержит на 5'-конце гидрофобную диметокситритильную группу. Все побочные продукты с более низкой молекулярной массой, которые могли появиться в результате твердофазного синтеза, не несут на 5'-конце диметокситритильной группы. Оптимальным методом выделения для такого компонента является градиентная хроматография на обращено-фазовой колонке C18 с полярным растворителем (50% ацетонитрил) в качестве элюента, где целевой компонент будет обладать наибольшим временем удерживания и соответственно может легко быть отделен от нецелевых продуктов. РНК-олигонуклеотид содержит модифицированные группы, повышающие его стабильность (ФИГ. 3)

Полученный РНК-олигонуклеотид высушивали в мягких условиях (не выше 15°C) и разводили в деионизированной воде MQ/DEPC (DNAse/RNAse free) в концентрации 600

нмоль/л. олигонуклеотиды объединяются в эквимольных количествах, перемешиваются и подвергаются дуплексированию, т.е. образованию водородных связей между азотистыми основаниями нуклеотидов двух цепей, в соответствии со стандартной методикой, в следующих комбинациях:

Молекула нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления, где

а) первый фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

GGAAGGAAGUUCUGUUGAATTT (SEQ ID NO 1)

второй фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

UUCAACAGAACUCCUUCCTTT (SEQ ID NO 2) или

б) первый фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

AGACGUGGUCCAGAACAAATT (SEQ ID NO 4)

второй фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

UUUGUUCUGGACCACGUCUTT (SEQ ID NO 5) или

с) первый фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

ACUGAGGGAGCCUUGAAUATT (SEQ ID NO 6)

второй фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

UAUUCAAGGCUCCUCAGUTT (SEQ ID NO 7) или

д) первый фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

CCCACCAACAGAGCCUAAATT (SEQ ID NO 8)

второй фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

UUUAGGCUCUGUUGGUGGGTT (SEQ ID NO 9) или

е) первый фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

GCAUAUUGACGCAUACAAATT (SEQ ID NO 10)

второй фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

UUUGUAUGCGUCAAUAUGCTT (SEQ ID NO 11) или

ф) первый фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

GUAGUUGAAGUUGUUGAUATT (SEQ ID NO 12)

второй фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

UAUCAACAACUUCAACUACTT (SEQ ID NO 13) или

g) первый фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

GAAUAGAGCUCGCACCGUATT (SEQ ID NO 14)

второй фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

UACGGUGCGAGCUCUAUUCTT (SEQ ID NO 15) или

h) первый фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

GGUGUCUCUAUCUGUAGUATT (SEQ ID NO 16)

второй фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

UACUACAGAUAGAGACACCTT (SEQ ID NO 17) или

i) первый фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

GGUGUACUGACAUAUAGAUATT (SEQ ID NO 18)

второй фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

UAUCUAAUGUCAGUACACCTT (SEQ ID NO 19) или

j) первый фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

CUUCGUAAGAACGGUAAUATT (SEQ ID NO 20)

второй фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

UAUUACCGUUCUUACGAAGTT (SEQ ID NO 21) или

k) первый фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

GUUACGAUGGUGGCUGUAUTT (SEQ ID NO 22)

второй фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

AUACAGCCACCAUCGUAACCTT (SEQ ID NO 23) или

l) первый фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

GUAAGGCUAGACUUUAUUATT (SEQ ID NO 24)

второй фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

UAAUAAAGUCUAGCCUUACTT (SEQ ID NO 25) или

m) первый фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

AUGGGGUAAGGCUAGACUUUAUUAT (SEQ ID NO 26)

второй фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

AUAAUAAAGUCUAGCCUACCCCAUUU (SEQ ID NO 27) или

n) первый фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

GGAAGGAAGUUCUGUUGAATT (SEQ ID NO 28)

второй фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

UUCAACAGAACUCCUUCCTT (SEQ ID NO 29) или

о) первый фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

UCAGGAGUAUGCUGAUGUCTT (SEQ ID NO 30)

второй фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

GACAUCAGCAUACUCCUGATT (SEQ ID NO 31) или

р) первый фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

UGUUGGACUGAGACUGACCTT (SEQ ID NO 32)

второй фрагмент смежных нуклеотидов содержит следующую нуклеотидную последовательность:

GGUCAGUCUCAGUCCAACATT (SEQ ID NO 33)

Таким образом, спроектированные и синтезированные молекулы миРНК, направлены против консервативных участков генома вируса SARS-CoV-2 с пониженной частотой мутаций.

Первичный скрининг противовирусной активности миРНК проводился на неинфекционной модели *in vitro* с использованием векторов, экспрессирующих вирусные гены, объединенных с геном репортером (ген светлячковой люциферазы). Сконструированы три вектора, экспрессирующие полноразмерные гены и генные фрагменты лидерного белка SARS-CoV-2 (NCBI RefSeq NC_045512.2) NSP1 (540 п.о.), RdRp РНК-зависимой РНК-полимеразы (2796 п.о.) и нуклеокапсидного белка N (1260 п.о.) (pVAX1-LP-IRES-LUC, pVAX1-RdRp-full-IRES-LUC и pVAX1-N-IRES-LUC, соответственно) (ФИГ. 4а-с) Молекулы миРНК по изобретению направлены против геномных мишеней в пределах гена ORF1/2 (RdRp - регион гена РНК-зависимой РНК полимеразы) (ФИГ. 4d). Биологический эффект молекул миРНК определяли по снижению активности люциферазы в лизатах клеток. (ФИГ. 4d).

Подтверждение биологической активности молекул миРНК проводили в экспериментах *in vitro* на инфекционной модели заражения клеток Vero вирусом SARS-CoV-2, а количественную оценку проводили с помощью ОТ-ПЦР-тест-системы, сконструированной на ген *nsp1* (ФИГ. 4d).

Для первичного определения биологической активности молекул миРНК в

условиях *in vitro* клетки Нер-2 высаживали в 24-луночный планшет в количестве 100 тыс. клеток на лунку в 600 мкл полной питательной среды DMEM (10% фетальной бычьей сыворотки, 2% буферного раствора HEPES, 0,1% антибиотика гентамицина, 0,6% L-глутамин) накануне трансфекции и инкубировали сутки при 37°C в CO₂ инкубаторе до достижения 75% конфлюентности. Перед внесением трансфекционной смеси в лунках с клетками заменяли полную питательную среду DMEM на бессывороточную среду DMEM (2% буферного раствора HEPES, 0,1% антибиотика гентамицина, 0,6% L-глутамин) с промежуточной отмывкой клеток с помощью физиологического раствора (0,9% раствор хлорида натрия). Трансфекцию проводили в два этапа. Первую дисперсию трансфекционного агента общим объемом 80 мкл, состоящего из 0,25 мкг плазмиды, кодирующей определенный участок генома вируса SARS-CoV-2 и 0,5 мкл коммерческого трансфекционного агента Lipofectamine3000 (с добавкой P3000), готовили в бессывороточной среде OPTIMEM. Приготовленные смеси выдерживали 15 мин при комнатной температуре и вносили в лунки с монослоем клеток. Вторую дисперсию трансфекционного агента общим объемом 87,5 мкл, состоящего из 7,5 мкл соответствующей миРНК и 1,5 мкл коммерческого трансфекционного агента Lipofectamine3000, готовили в бессывороточной среде OPTIMEM. В качестве контроля в одну из лунок после 1 трансфекции никаких миРНК не вносили. В качестве неспецифичных к плазмидам миРНК использовали siUTR, siIL4, siGFP, в качестве специфичной - siLuc. Приготовленные смеси выдерживали 15 мин при комнатной температуре и вносили в лунки с монослоем клеток. Клетки инкубировали при 37°C в CO₂ инкубаторе. Через 4 часа в каждую лунку добавляли 60 мкл 10% фетальной бычьей сыворотки. После этого клетки инкубировали при 37°C в CO₂ инкубаторе в течение 20 часов и затем определяли люциферазную активность методом люциферазного теста. Тест проводился с использованием коммерческого набора “Luciferase Assay System” (Promega) согласно рекомендациям производителя. Для этого удаляли ростовую среду из лунок, затем добавляли 150 мкл лизирующего буфера Glo lysis byffer, 1x (USA). Клетки выдерживали 15 минут при 37°C в CO₂ инкубаторе для достижения полного лизиса. Затем соскабливали их со дна ячеек и переносили клеточную суспензию в пробирки типа erppendorf на 1,5 мл. Для осаждения клеточного дебриса полученный лизат центрифугировали 2 минуты на 10000 оборотов. Отбирали по 50 мкл супернатанта в отдельные пробирки типа erppendorf на 1,5 мл и добавляли к ним люциферазный субстрат в соотношении 1:1. Эффективность трансфекции оценивали по уровню люминисценции на Glomax 20/20 luminometr. Для всех количественных данных вычисляли среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего (m). Определяли межгрупповые различия и оценивали достоверности различий между группами с помощью критерия Стьюдента с использованием программы Statistica 8.0.

Для подтверждения активности молекул миРНК проводили эксперименты *in vitro* на модели репликации SARS-CoV-2 в клетках Vero C1008 (E6) (Почки зеленой обезьяны). Клетки высаживали в 24-луночный планшет в количестве 100-150 тыс. клеток

на лунку в 600 мкл полной питательной среды DMEM (10% фетальной бычьей сыворотки, 2% буферного раствора HEPES, 0,1% антибиотика гентамицина, 0,6% L-глутамина) накануне эксперимента и инкубировали сутки при 37°C в CO₂ инкубаторе до достижения 75% конфлюентности. Перед внесением миРНК в лунках с клетками заменяли полную питательную среду DMEM на бессывороточную среду DMEM в количестве 500 мкл (2% буферного раствора HEPES, 0,1% антибиотика гентамицина, 0,6% L-глутамина). Дисперсию исследуемого препарата общим объемом 100 мкл, состоящего из 0,5 мкг миРНК и 1 мкл коммерческого трансфекционного реагента Lipofectamine3000, готовили в бессывороточной среде OPTIMEM. Приготовленные смеси выдерживали 15 мин при комнатной температуре и вносили в лунки с монослоем клеток. В качестве отрицательного контроля клетки обрабатывали 100 мкл бессывороточной среды OPTIMEM, не содержащей молекул миРНК. Клетки инкубировали при 37°C в CO₂ инкубаторе в течение 4 часов. После чего удаляли смеси миРНК/Lipofectamine3000/optiMEM и клетки заражали SARS-CoV-2 при минимальной заражающей дозе=0,001 в бессывороточной среде объемом 500 мкл, инкубировали 1 час при 37°C в CO₂ инкубаторе. Затем производили замену культуральной среды на полную питательную среду DMEM в количестве 400 мкл для создания оптимальных условий культивирования клеток. После чего клетки были повторно обработаны смесью 0.5 мг миРНК и 1 мкл Lipofectamine3000 в 100 мкл бессывороточной среды OPTIMEM. Через 1 и 4 суток после инфекции оценивалась вирусная нагрузка методом ОТ-ПЦР. Для этого собирали супернатанты и клеточные лизаты, из которых затем выделяли РНК для последующей постановки реакции ОТ-ПЦР с целью определения количества копий вирусной РНК. Клетки лизировали непосредственно в лунке без использования механических и ферментативных методов отделения. Каждый вариант миРНК был изучен в 1 концентрации в дублях в 4-х независимых повторях. Данные представлены в виде количества копий вирусной РНК на 1 мл супернатанта и на 100 тыс. клеток, а также были нормализованы в % относительно неспецифических молекул миРНК, принятых за 100%.

По результатам первичного скрининга восемь из 15 разработанных миРНК (SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 33) существенно снижали активность люциферазы *in vitro* по сравнению с неспецифическими миРНК (siGFP) и/или клетками, трансфецированными только плазмидой (ФИГ. 5). SEQ ID NO: 4/ SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8/ SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10/ SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12/ SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16/ SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20/ SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 28/ SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30/ SEQ ID NO: 31 значительно снижали уровень люминесценции, в %: 82.43 (P <0.05), 74.53 (P <0.01), 69.21 (P <0.05), 84.03 (P <0.01), 67.95 (P <0.05), 88.28 (P <0.01), 68.77 (P=0.0519) и 65.17 (P=0.0519), соответственно, по сравнению с клетками, трансфецированными только плазмидой и 84,67 (P <0.05), 76,35 (P <0.05), 64,88 (P=0.0568), 81,78 (P <0.05), 63,45 (P=0.0666), 89,12 (P <0.01), 71 (P <0.05) и 67,66 (P <0.05), соответственно, по сравнению с клетками, трансфецированными неспецифическими миРНК. Контрольная миРНК siLuc значительно снижала экспрессию люциферазы светлячка, в %: 70,24 (P<0,001), 77,69

($P < 0,05$) и 53,1 (NS) по сравнению с клетками, трансфицированными только плазмидой pRdRp-full, pVAX-N-IRES-LUC и pVAX-LP-IRES-LUC, соответственно; в %: 72. 37 ($P < 0,01$), 74,56 ($P < 0,05$) и 56,63 (НД) по сравнению с клетками, трансфицированными pVAX-N-IRES-LUC и pVAX-LP-IRES-LUC, соответственно, с последующей трансфекцией siGFP. Согласно результатам, приведенным на ФИГ. 6 SEQ ID NO: 8/ SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10/ SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 28/ SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30/ SEQ ID NO: 31 значительно снижали экспрессию люциферазы в клетках, котрансфицированных плазмидой и миРНК. Эти молекулы были отобраны в качестве наиболее эффективных в отношении вируса SARS-CoV-2.

Созданные синтетические миРНК последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 в составе комбинированного лекарственного средства направлены против региона гена RdRp.

По результатам экспериментов с целью подтверждения активности отобранных в ходе первичного скрининга молекул миРНК выявлено существенное отличие в концентрации вирусной РНК между клетками, обработанными специфическими миРНК SEQ ID NO: 28/ SEQ ID NO: 29, направленными против гена RdRp, по сравнению как с клетками трансфицированными неспецифическими миРНК (siLuc), так и с инфицированными клетками ($P < 0,05$) (ФИГ. 6).

Таким образом авторы настоящего изобретения установили, что молекула нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 28/ SEQ ID NO: 29, содержащая двухцепочечную структуру, где двухцепочечная структура образована первой цепью и второй цепью, где первая цепь содержит фрагмент смежных нуклеотидов, и вторая цепь содержит фрагмент смежных нуклеотидов, где первая цепь состоит из:

(i) нуклеотидной последовательности GGAAGGAAGUUCUGUUGAATT (SEQ ID NO: 28)

а вторая цепь состоит из:

(ii) нуклеотидной последовательности UUCAACAGAACUCCUUCCTT (SEQ ID NO: 29) способна вызывать максимальную РНК-интерференцию.

Эту нуклеиновую кислоту, включающую цепи с данными последовательностями, будут обозначать в настоящем описании как siRk-12 (или siRk-12-ЕМ в ее модифицированном исполнении) - молекула нуклеиновой кислоты по изобретению.

ПРИМЕР 2. Получение модифицированных миРНК.

Синтез модифицированных РНК-олигоуклеотидов осуществляли твердофазным амидофосфатным синтезом на автоматическом ДНК/РНК синтезаторе (Polygen, Германия) в соответствии со способом получения, указанным в ПРИМЕРЕ 1. Отличием метода является добавление одного или нескольких модифицированных нуклеотидных звеньев к иммобилизованному защищенному нуклеозиду или олигонуклеотиду.

В состав миРНК включены модифицированные нуклеотиды (LNA, Locked Nucleic Acids), обеспечивающие надежную связь миРНК с мишенью и повышающие стабильность

дуплексов. Для подтверждения структуры полученных молекул РНК использовали масс-спектрометр BRUKER microflex LT (матрица 3-HPA)

Получена молекула нуклеиновой кислоты siRk-12-ЕМ по любому из вариантов осуществления, где молекула нуклеиновой кислоты состоит из

а) первого фрагмента смежных нуклеотидов, имеющего следующую структуру:
(+G)GAAGGAAGUUCUGUUGAA(+T)(+T)dT

второго фрагмента смежных нуклеотидов, имеющего следующую структуру:

UUCAACAGAACUCCUCCC(+T)(+T)dT, где dT - дезокситимидин, «+» отмечены LNA-модифицированные нуклеотиды.

Указанные цепи формируют дуплексную область с полной комплементарностью и/или частично некомплементарную, а также имеющих фрагменты, выходящие за пределы дуплексной области.

В одном из вариантов осуществления дуплексная область содержит один или множество модифицированных нуклеотидов, обозначаемых в настоящем описании как "модифицированные группы", где каждая модифицированная группа состоит из одного или нескольких идентично модифицированных нуклеотидов. В одном из вариантов осуществления каждая модифицированная группа в дуплексной области является идентичной, т.е. каждая модифицированная группа состоит из равного количества идентично модифицированных нуклеотидов, расположенных непосредственно друг за другом, в терминальных позициях или в любой из позиций 1-22. В другом варианте осуществления модифицированная группа может иметь терминальное положение и выходить за пределы комплементарной части РНК-дуплекса

Нуклеиновая кислота указанной структуры, включающая все эти варианты осуществления, будут обозначать в настоящем описании как siRk-12-ЕМ - молекула нуклеиновой кислоты по изобретению.

ПРИМЕР 3. Сравнение стабильности модифицированных и немодифицированных миРНК.

При использовании миРНК предпочтительно использование модификаций, повышающих эффективность молекул и их устойчивость к ферментативной деградации РНКазами. Одним из возможных способов модификации является синтез ковалентно-замкнутых нуклеиновых кислот (LNA - «locked nucleic acid»). Такая модификация приводит к образованию более прочных дуплексов, а также к устойчивости к нуклеазной деградации. Введение подобных модификаций в олигонуклеотидную последовательность позволяет пролонгировать время нахождения миРНК в биологических средах (сыворотка крови, слизистые оболочки, цитоплазма клетки и т.д.), что усиливает их биологический эффект.

Повышенная стабильность модифицированных миРНК подтверждена экспериментально при смешивании миРНК (C=1 мг/мл) с FBS в соотношении 1:1 и последующей инкубацией смеси миРНК/FBS при +37C в течение 5 суток. Детекцию не

деградировавшей миРНК осуществляли методом электрофореза в 1,5% агарозном геле. Количественное определение миРНК определяли с помощью программного обеспечения Image Lab (BioRad) (ФИГ. 3). Показано, что LNA-модификация молекулы миРНК приводит к увеличению стабильности дуплексов миРНК и сохранению их структуры в течение 264 часов, что в среднем в 2-3 раза больше по сравнению с немодифицированной миРНК. С другой стороны, модификация не приводит к потере активности миРНК (ФИГ. 7).

Таким образом, использование модифицированных миРНК для подавления экспрессии генов является одним из вариантов для достижения пролонгированного противовирусного эффекта.

ПРИМЕР 4. Синтез дендримерных пептидов и подтверждение трансфекционной активности.

Для доставки миРНК в клетки-мишени в состав КЛС введен пептидный вектор, играющий роль транспортера миРНК (ДКП, образующий комплексы с отрицательно заряженными молекулами миРНК и конденсирующий их в компактные наноструктуры).

Оптимальное соотношение ДКП/миРНК составляет 12,5-50/1 по массе. Доставка действующего вещества миРНК в клетку (трансфекция) осуществляется за счет транслокации комплекса миРНК с пептидным вектором через клеточные мембраны по механизму эндоцитоза. Для проявления специфической активности миРНК в составе средства siRk-12-ЕМ/КК46 проникают в цитоплазму клетки-мишени, обеспечивая терапевтический эффект.

Реагенты и растворители для получения дендримерных пептидов были получены от компаний Sigma-Aldrich/Merck, Anaspec, ApexBio, Gyros Proteins, Alfa Aesar, Merck, Fluka AG, Reachem, Novabiochem, Protein Technologies Inc, Carl Roth GmbH, Scharlau, Fisher Chemical с качеством либо для пептидного синтеза, либо ВЭЖХ, либо ГЖХ/МС, либо для анализа. Для синтеза пептидов использовали автоматический синтезатор пептидов PS3 (Protein Technologies Inc., США) или мануальный синтез.

Для очистки пептидов использовалась высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Одна из используемых систем состояла из бинарного насоса 321-H (Gilson), колонки Vydac 218TP1022 (Grace), фотометрического детектора Spectroflow 757 (Kratos Analytical), регистратора 2210 (LKB) и коллектора фракций Multirac 2111 (LKB), другая система ВЭЖХ- Серии LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония). При элюировании использовали линейный градиент 5-70% элюента В (25 минут) при 10 мл/мин с детектированием при 226/280 нм. Элюент А содержал 0,1% TFA/H₂O; элюент В содержал чистый ацетонитрил (Sigma-Aldrich).

Функциональные группы боковых цепей Fmoc-аминокислот (AnaSpec, США/ Sigma Aldrich, Германия/Iris Biotech, Германия) были защищены трет-бутилом (t-Bu) для гидроксильных и карбоксильных групп, трет-бутилоксикарбонилем (Boc) или флуоренилметоксикарбонилем (Fmoc) для ε-аминогруппы лизина, тритильной группой (Trt) для SH-группы цистеина и имидазольной группы гистидина, и 2,2,4,6,7-пентаметил-

дигидробензофуран-5-сульфонил (Pbf) для гуанидиновой группы аргинина. Синтез осуществляли либо вручную, либо автоматически на пептидном синтезаторе PS3 (Protein Technologies Inc., США) с использованием смолы стирол-МВНА (смола Rink-amide-МВНА) или смол на ПЭГ-основе (Rink-amide chemmatrix, TGR-, TGA-). При ручном варианте смесь DIC/НВТ использовалась для реакции конденсации, в то время как в автоматическом синтезе для конденсации использовали смесь НВТУ/НММ. Растворителем, использованным для всех стадий синтеза, в обоих случаях был N, N-диметилформамид (DMF) или смесь DMF с N-метилпирролидоном (NMP); снятие Fmoc-защиты после каждой стадии конденсации проводили в растворе 4-метилпиперидина (для Fmoc), а полное снятие защит осуществляли путем использования трифторуксусной кислоты (TFA) (все защитные группы боковых цепей, кроме Fmoc, были лабильными для TFA).

Схема твердофазного синтеза основана на повторяющемся цикле стандартных операций, который включает:

- 1) На старте навеску исходной смолы, например Rink Amide, вносят в реактор, добавляют ДМФА, энергично перемешивают суспензию до полного набухания смолы, операцию повторяют 3 раза по 10-30 мин, удаляя растворитель фильтрованием под давлением.
- 2) Удаление Fmoc-защиты 20% раствором 4-метилпиперидина (МПП) в течение 10-20 мин 2 раза.
- 3) Промывку смолы.
- 4) Присоединение аминокислоты путем добавления в реактор активированной Fmoc-аминокислоты в среде ДМФА или N-метилпирролидона (МП) и инкубацией в течение 30 мин - 2 ч.
- 5) Промывку смолы с пептидом.
- 6) Операции по пунктам 2-5 повторяются.

Отщепление пептидов от смолы проводили в 95% растворе TFA с добавлением скавенджеров, например, тиоанизола, 1,2-этандитиола или триизопропилсилана и деионизированной воды. Сырые пептидные продукты осаждали диэтиловым эфиром, экстрагировали разбавленной уксусной кислотой и затем высушивали лиофильно. Заявляемые ДКП - стабильные вещества при хранении в сухом виде. Их синтез можно осуществлять, используя автоматический пептидный синтезатор или в ручном режиме. В результате были получены варианты дендримерного пептида общей формулы $R_8K_4X_4K_2H_2KZC$, где

R - аргинин;

K - лизин;

X - 5 аминокислот в любом порядке, где аминокислоты представляют собой: триптофан (W), лейцин (L), изолейцин (I), треонин (T), валин (V), пролин (P), глутаминовую кислоту (E);

H - гистидин;

Z - гидрофобный аминокислотный остаток, предпочтительно аланин (A) или фенилаланин (F);

C - цистеин или цистеинамид;

Для проведения анализа на трансфекционную активность ДКП клетки Vero C1008 (E6), HEK293, A549, HepG2, ФЭЧ, HeLa высевали в 48-луночный планшет в количестве $4 \cdot 10^4$ клеток на лунку в 300 мкл соответствующей полной питательной среды (DMEM, или F12, или Игла-Мем, или RPMI, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, 2% буферного раствора HEPES, 0,1% антибиотика гентамицина, 0,6% L-глутамин) накануне трансфекции и инкубировали сутки при 37°C в CO₂ инкубаторе до достижения 75% конфлюентности. Дисперсию трансфекционного агента в 3 разведениях (с массовыми соотношениями пептида к НК - 50:1, 25:1 и 12,5:1) общим объемом 80 мкл, состоящего из 0,3 мкг плазмиды pGL3 и раствора пептида в соответствующей концентрации согласно массовым соотношениям к НК, готовили в бессывороточной среде OPTIMEM. В качестве положительного контроля использовали коммерческий трансфекционный агент Lipofectamine2000 (Lf). В качестве отрицательного контроля использовали плазмиду pGL3 без носителя (PI). Приготовленные смеси выдерживали 15 мин при комнатной температуре и вносили в лунки с монослоем клеток. Перед внесением трансфекционной смеси в лунках с клетками заменяли полную питательную среду на бессывороточную. Клетки инкубировали при 37°C в CO₂ инкубаторе в течение 4 часов. Затем к клеткам добавляли 30 мкл 10% фетальной бычьей сыворотки. Клетки инкубировали при 37°C в CO₂ инкубаторе в течение 24 часов и затем определяли люциферазную активность методом люциферазного теста. Тест проводился с использованием коммерческого набора "Luciferase Assay System" (Promega) согласно рекомендациям производителя. Для этого удаляли ростовую среду из лунок, затем добавляли 100 мкл лизирующего буфера (Glo lysis buffer, 1x, USA). Клетки выдерживали 15 минут при 37°C в CO₂ инкубаторе для достижения полного лизиса. Затем соскабливали их со дна ячеек и переносили клеточную суспензию в пробирки типа eppendorf на 1,5 мл. Для осаждения клеточного дебриса полученный лизат центрифугировали 2 минуты на 10000 оборотов. Отбирали по 50 мкл супернатанта в отдельные пробирки типа eppendorf на 1,5 мл и добавляли к ним люциферазный субстрат в соотношении 1:1. Эффективность трансфекции оценивали по уровню люминисценции на Glomax 20/20 luminometr. Для всех количественных данных вычисляли среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего (m) (ФИГ. 8). Определяли межгрупповые различия и оценивали достоверности различий между группами с помощью критерия Стьюдента с использованием программы Statistica 8.0

Синтез ДКП (КК-46), характеризующийся тем, что в формуле X - SEQ ID NO 3, осуществляли в соответствии с Примером 4 по химической схеме, представленной на ФИГ. 9.

Таким образом, обеспечивается эффективная и безопасная доставка полученных синтетических миРНК с помощью ДКП, обладающего трансфекционной активностью, обеспечивающего суммарный положительный заряд всего комплекса, что повышает

эффективность его проникновения в клетки и характеризующегося структурой R8K4X4K2H2KZC, где R - аргинин; K - лизин; X - SEQ ID NO 3; H - гистидин; Z - фенилаланин (F); C - цистеин или цистеинамид, что позволяет проводить противовирусную терапию на основе РНКи.

ПРИМЕР 5. Оптимизация состава комплекса миРНК/пептидный носитель.

Для оценки оптимального соотношения пептида и нуклеиновой кислоты клетки Нер-2 трансфецировали комплексами pGL3 Luciferase Reporter Vector (0,25 мкг) и различным количеством пептидного дендримера КК-46 в различных массовых соотношениях 100:1, 50:1, 25:1, 20:1, 12,5:1, 5:1. Проведена оценка активности люциферазы. В качестве положительного контроля использовали комплекс pGL3/Lipofectamine3000. Результаты теста приведены на ФИГ. 10. Диапазон оптимальных массовых соотношений в комплексе «нуклеиновая кислота/КК-46» находится в интервале от 1/12,5 до 100/1.

ПРИМЕР 6. Получение комбинированного лекарственного средства siRk-12-ЕМ/КК46 и его состав.

Для получения лекарственного средства эффективное количество миРНК (siRk-12 или siRk-12-ЕМ) и пептида КК-46 растворяют в равных объемах подходящего растворителя (например, 2,5 мл или 3,5 мл для каждого), содержимое каждого флакона перемешивают с помощью шприца, вортекса или встряхиванием и объединяют. Замораживание раствора не допускается.

Вариант 1: 1) миРНК siRk-12 или siRk-12 ЕМ - 0,088 мг; 2) пептид КК-46-1,762 мг;

Вариант 2: 1) миРНК siRk-12 или siRk-12 ЕМ - 0,176 мг; 2) пептид КК-46-3,524 мг;

Вариант 3: 1) миРНК siRk-12 или siRk-12 ЕМ - 0,528 мг; 2) пептид КК-46-10,572 мг;

Вариант 4: 1) миРНК siRk-12 или siRk-12 ЕМ - 1,056 мг; 2) пептид КК-46-21,144 мг;

Вариант 5: 1) миРНК siRk-12 или siRk-12 ЕМ - 3,168 мг; 2) пептид КК-46-63,432 мг;

Где в варианте 1-5 добавляют физиологический раствор (0,9% NaCl) - 5 мл;

Где в варианте 1-5 добавляют физиологический раствор (0,9% NaCl) - 7 мл;

Где в варианте 1-5 добавляют стерильную воду очищенную - 5 мл;

Где в варианте 1-5 добавляют стерильную воду очищенную - 7 мл;

Где в варианте 1-5 добавляют фосфатный буферный раствор - 5 мл;

Где в варианте 1-5 добавляют фосфатный буферный раствор - 7 мл;

Вариант 6: 1) миРНК siRk-12 или siRk-12 ЕМ - как в варианте 1-5, вместе с NaCl - 20 мг, KCl - 0,5 мг, Na₂HPO₄-3,6 мг, KH₂PO₄-0,6 мг; 2) пептид КК-46 - как в варианте 1-5, вместе с NaCl - 20 мг, KCl - 0,5 мг, Na₂HPO₄-3,6 мг, KH₂PO₄-0,6 мг.

Вариант 7: 1) миРНК siRk-12 или siRk-12 ЕМ - как в варианте 1-5, NaCl - 20 мг, KCl - 0,5 мг, Na₂HPO₄-3,6 мг, KH₂PO₄-0,6 мг; 2) пептид КК-46 - как в варианте 1-5, NaCl - 20 мг, KCl - 0,5 мг, Na₂HPO₄-3,6 мг, KH₂PO₄-0,6 мг.

Вариант 8: 1) миРНК siRk-12 или siRk-12 EM - как в варианте 1-5, NaCl -20 мг, KCl- 0,5 мг, Na₂HPO₄-3,6 мг, KH₂PO₄-0,6 мг; 2) пептид КК-46 - как в варианте 1-5, NaCl - 20 мг, KCl- 0,5 мг, Na₂HPO₄-3,6 мг, KH₂PO₄-0,6 мг; 3) Растворитель как выше указано.

ПРИМЕР 7. Подтверждение противовирусной активности комбинированного лекарственного средства *in vivo*.

Для подтверждения активности КЛС siRk-12-EM/КК46 *in vivo* использовались сирийские хомячки (самки в возрасте 4-5 недель, вес 40-60 г). Было сформировано шесть групп животных (N=10). Пять из шести групп были интраназально инфицированы 10⁵ БОЕ/особь штамма В SARS-CoV-2 на 0-й день. В тот же день (через час после инфицирования) и на 1-й день инфицированные животные получили аэрозоль siRk-12-EM/КК46 в трех дозах: 0,7, 1,96 или 5,6 мг/кг. Хомяки подвергались анестезии и помещались в ингаляционную камеру. Аэрозоли формировались с помощью обычного микросеточного распылителя Xiaomi Andon VP-M3A Micro Mesh Nebulizer. Положительную контрольную группу составили животные, принимавшие Гидроксихлорохин, ресуспендированный в 1% растворе крахмала перорально (через 1 час после инфицирования в дозе 3,8 мг/особь, а затем ежедневно в течение 6 дней после инфицирования в дозе 1,5 мг/особь). Контрольная группа включала животных, инфицированных вирусом SARS-CoV-2. Интактная группа не получала никакого лечения и служила в качестве отрицательного контроля. Пять животных из каждой группы были забиты на 2-й день после инфицирования, легкие были удалены. Проведена макроскопическая оценка состояния легких. Правая доля легкого была гомогенизирована, а вирусный титр оценивался с помощью подсчета бляшек для определения количества БОЕ. Пять животных, оставшихся в каждой группе, подверглись воздействию аэрозоля siRk-12-EM/КК46 в 3, 4, 5 дни и были забиты на 6 день после инфицирования. Легкие были удалены и обработаны, как описано выше (ФИГ 11).

По результатам исследования показано, что ингаляционное введение КЛС siRk-12-EM/КК46 в дозах 0,7, 1,96 и 5,6 мг/кг, приводит к статистически значимому купированию патологоанатомических изменений в легких на 2 и 6 сутки после инфицирования. Наиболее выраженный эффект на макроскопические изменения в легких отмечен в группе 3 (доза 5,6 мг/кг) на 2 и 6 сутки наблюдения. При этом минимальная доза препарата КЛС siRk-12-EM/КК46, приводящая к улучшению состояния легких, составляет 0,7 мг/кг.

Определен индекс подавления продукции вируса SARS-CoV-2 в легких инфицированных сирийских хомяков методом образования негативных колоний в культуре клеток Vero. КЛС siRk-12-EM/КК46 в дозе 5,6 мг/кг обеспечивал снижение уровня вирусной нагрузки в органе - мишени (легких) леченых животных на 2,3 lg на 6 сутки после инфицирования, что свидетельствует об угнетении его репродукции. При этом минимальная доза, обеспечивающая статистически значимое подавление репродукции вируса в легких, составляет 0,7 мг/кг.

Вторая серия экспериментов *in vivo* проводилась по той же схеме с двумя исключениями. Во-первых, мы подвергали животных воздействию аэрозоля siRk-12-

ЕМ/КК-46 в дозе 0,175, 0,35 и 1,0 мг/кг дважды в сутки с интервалом в два часа, что давало суточную дозу противовирусных комплексов 0,35, 0,7 и 2,0 мг/кг/сут соответственно. Второй контрольной группе животных назначали фавипиравир перорально (в течение 1 часа после инфицирования 2 раза в сутки вводили дозу 1,2 мг на особь, а затем ежедневно в течение 6 дней после инфицирования 2 раза в сутки 0,4 мг на особь) (ФИГ 12).

У инфицированных животных, получивших ингаляции препаратом КЛС siRk-12-ЕМ/КК46 в дозах 0,35; 0,7 и 2,0 мг/кг/сут, отмечено статистически значимое купирование патологоанатомических изменений в легких на 2 и 6 сутки после инфицирования. Наиболее высокий коэффициент защиты по макроскопическим изменениям в легких отмечен в группе 3 (доза 2,0 мг/кг) на 6 сутки наблюдения. Минимальная доза КЛС siRk-12-ЕМ/КК46, приводящая к статистически значимому улучшению состояния легких, составляет 0,35 мг/кг/сут.

На 2 сутки после инфицирования ингаляции препаратом siRk-12-ЕМ/КК46 в дозах 0,35; 0,7 и 2,0 мг/кг/сут индекс подавления репликации вируса составил 1,7; 1,8 и 1,9 lg, соответственно; на 6 сутки после инфицирования индекс подавления репликации вируса составил 1,4, 1,5 и 1,9 lg, соответственно.

Таким образом, КЛС siRk-12-ЕМ/КК46 в дозе 2,0 мг/кг при ингаляционном введении в течение 7 дней по 2 ингаляции в день с интервалом 2 часа обеспечивал выраженное снижение уровня вирусной нагрузки в органе - мишени (легких) на 1,9 lg на 2 и 6 сутки после инфицирования, что свидетельствует об угнетении репродукции вируса.

Минимальная доза, обеспечивающая статистически значимое подавление репродукции вируса в легких, составляет 0,35 мг/кг/сут.

Таким образом, КЛС, содержащее модифицированные синтетические миРНК структуры $(+G)GAAGGAAGUUCUGUUGAA(+T)(+T)dT$ и $UUCAACAGAACUCCUCCC(+T)(+T)dT$, где указанные миРНК осуществляют более эффективное блокирование репликативного цикла вируса по сравнению с не модифицированными миРНК. При этом модификация молекулы миРНК нуклеотидами LNA приводит к увеличению резистентности миРНК к воздействию нуклеаз с сохранением антивирусного эффекта, что в итоге обеспечивает пролонгированный противовирусный эффект.

ПРИМЕР 8. Обоснование выбора дозы лекарственного средства для лечения COVID-19 у человека.

В исследованиях по изучению специфической активности на сирийских хомячках массой 40-60 г (средняя масса животного 50 г) установлено, что препарат в единовременной дозе 0,175 мг/кг обладает статистически значимым антивирусным эффектом. Препарат вводился в течение 7 дней по 2 ингаляции в сутки в дозе 0,175 мг/кг. Таким образом суточная доза составляет 0,35 мг/кг/сут. Для генерации аэрозоли использовали меш-небулайзер модель XIAOMI ANDON VP-M3A со следующими характеристиками: скорость распыления раствора 0,2 мл/мин, скорость потока 5 л/мин;

т.е. из 0,2 мл раствора препарата генерируется 5 л аэрозоли.

Учитывая, что коэффициент межвидового пересчета доз для сирийских хомячков равен 8,1 [5], то единовременная терапевтическая доза для человека составляет 0,022 мг/кг (1,54 мг) ($0,175 \text{ мг/кг} \cdot 8,1$), а суточная терапевтическая доза составляет 0,044 мг/кг/сут (3,08 мг/сут).

Легочная вентиляция для человека составляет 8,732 л/мин по данным [6-8]. Таким образом за 20 мин ингаляции человек получит ~175 л аэрозоли ($8,732 \text{ л/мин} \cdot 20 \text{ мин} = 174,6 \text{ л}$). Небулайзер за 20 минут генерирует 100 л аэрозоли (скорость потока 5 л/мин). Соответственно в 100 л должно содержаться 1,54 мг препарата; концентрация аэрозоли при этом должна составлять 0,015 мг/л ($1,54 \text{ мг} / 100 \text{ л} = 0,015 \text{ мг/л}$).

С учетом того, что из раствора концентрацией 1 мг/мл генерируется аэрозоль с концентрацией в ней препарата 0,04 мг/л, то необходимо уменьшить концентрацию раствора в 2,7 раза ($0,04 \text{ мг/л} / 0,015 \text{ мг/л} = 2,7$), чтобы получить аэрозоль с концентрацией 0,015 мг/л. Таким образом, концентрация раствора препарата, необходимая для ингаляции человеку составит 0,37 мг/мл ($1 \text{ мг/мл} / 2,7 = 0,37 \text{ мг/мл}$).

С учетом скорости распыления небулайзера 0,2 мл/мин и скорости генерируемого потока 5 л/мин, из раствора препарата концентрацией 1 мг/мл образуется аэрозоль с концентрацией в ней препарата 0,04 мг/л ($0,2 \text{ мл} \cdot 1 \text{ мг/мл} / 5 \text{ л} = 0,04 \text{ мг/л}$).

Учитывая производительность небулайзера 0,2 мл/мин, необходимый объем раствора препарата для процедуры ингаляции длительностью 20 минут составит 4 мл ($0,2 \text{ мл/мин} \cdot 20 \text{ минут} = 4 \text{ мл}$). Остаточный объем раствора лекарства в камере небулайзера составляет 0,1-0,5 мл (в зависимости от модели). Таким образом, для 20-минутной ингаляции потребуется ~5 мл.

Так как необходимая концентрация раствора препарата составляет 0,37 мг/мл, то для получения 5 мл необходимо 1,85 мг препарата.

ПРИМЕР 9. Набор для получения фармацевтической композиции для профилактики или лечения коронавирусной инфекции, вызываемой SARS-CoV-2.

Набор для получения комбинированного лекарственного средства содержит два контейнера, где первый контейнер содержит компонент (А): эффективное количество молекул миРНК, направленных против генома вируса SARS-CoV-2, представленных в виде двух комплементарных цепей с нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO 1 и SEQ ID NO 2, второй контейнер содержит компонент (Б): катионный дендримерный пептид КК-46, обладающий трансфекционной активностью, и инструкцию по применению.

Набор представляет собой комбинацию 2 компонентов (siRk-12-ЕМ и КК-46), фасуемых в индивидуальные флаконы в массовом соотношении 1/20, где фасовка миРНК (siRk-12-ЕМ) составляет 0,088 мг/флакон, а фасовка пептида КК-46 составляет 1,762 мг/флакон.

Вышеизложенное описание настоящего изобретения представлено с целью иллюстрации, и специалист в области техники, к которой относится настоящее

изобретение, поймет, что настоящее изобретение может быть легко модифицировано в другие конкретные формы без изменения технического замысла или основных признаков настоящего изобретения. Таким образом, следует понимать, что вышеописанные примеры являются только иллюстративными во всех аспектах, а не ограничивающими.

Цитируемая литература

1. Luo K., Li C., Wang G., Nie Y., He B., Wu Y., Gu Z. Peptide dendrimers as efficient and biocompatible gene delivery vectors: Synthesis and in vitro characterization. *J. Control Release*, 2011, 55(1):77-87. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.10.006.
2. Luo K., et al. "Arginine functionalized peptide dendrimers as potential gene delivery vehicles" *Biomaterials*, 2012, 33(19) 4917-4927.
3. Heitz M., et al. Stereoselective pH responsive peptide dendrimers for siRNA» (*Bioconjug. Chem.* 2019, 30(8):2165-2182.
4. Gorzkiewicz M., Konopka M., Janaszewska A., Tarasenko I.I., ... Klajnert-Maculewicz B. Application of new lysine-based peptide dendrimers D3K2 and D3G2 for gene delivery: Specific cytotoxicity to cancer cells and transfection in vitro. *Bioorg. Chem.*, 2020, 95, 103504.
5. Van Hoosier G.J., McPherson C. *Laboratory Hamsters*. 1st ed. 1987. 400 p.
6. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. 2012.
7. Трахтенберг И.М. et al. Проблема нормы в токсикологии (современные представления и методические подходы, основные параметры и константы). Москва: Медицина, 1991. 208 p.
8. Каркищенко Н.Н., Грачева С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. Москва, 2010.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комбинированное лекарственное средство для профилактики или лечения коронавирусной инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, содержащее: (i) эффективное количество молекул миРНК, направленных против генома вируса SARS-CoV-2, представленных в виде двух комплементарных цепей с нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4 - SEQ ID NO 33 или содержащих модификацию LNA в одной или нескольких позициях смысловой и антисмысловой цепи указанных последовательностей, (ii) дендримерный катионный пептид, обладающий трансфекционной активностью и характеризующийся структурной формулой R8K4X4K2H2KZC, где R - аргинин; K - лизин; X - 5 аминокислот в любом порядке, где аминокислоты представляют собой: триптофан (W), лейцин (L), изолейцин (I), треонин (T), валин (V), пролин (P), глутаминовую кислоту (E); H - гистидин; Z - гидрофобный аминокислотный остаток, содержащий аланин (A) или фенилаланин (F); C - цистеин или цистеинамид, (iii) фармацевтически приемлемое вспомогательное средство.

2. Комбинированное лекарственное средство по п.1, где эффективное количество молекул миРНК, направленных против генома вируса SARS-CoV-2 представлено в виде двух комплементарных цепей структуры (+G)GAAGGAAGUUCUGUUGAA(+T)(+T)dT и UUCAACAGAACUCCUCCC(+T)(+T)dT.

3. Комбинированное лекарственное средство по п.1, где эффективное количество дендримерного катионного пептида, обладающего трансфекционной активностью содержит линейный участок аминокислотных остатков, представленный последовательностью SEQ ID NO 3.

4. Комбинированное лекарственное средство по п.1, содержащее: (i) эффективное количество молекул миРНК, направленных против генома вируса SARS-CoV-2, представленных в виде двух комплементарных цепей, характеризующихся структурой (+G)GAAGGAAGUUCUGUUGAA(+T)(+T)dT и UUCAACAGAACUCCUCCC(+T)(+T)dT, где модифицированные нуклеотиды в смысловой и антисмысловой цепи представлены модификацией LNA (ii) дендримерный катионный пептид, обладающий трансфекционной активностью и характеризующийся структурой R8K4X4K2H2KZC, где R - аргинин; K - лизин; X - SEQ ID NO 3; H - гистидин; Z - фенилаланин (F); C - цистеин или цистеинамид.

5. Комбинированное лекарственное средство п.1, где эффективное количество молекул миРНК, направленных против генома вируса SARS-CoV-2 составляет от 1 мкг до 100 мкг, предпочтительно от 10 мкг до 100 мкг, и катионного дендримерного пептида от 10 мкг до 1 г, предпочтительно от 1 мг до 100 мг.

6. Комбинированное лекарственное средство по п.1, предназначено для ингаляционного или интраназального введения.

7. Способ профилактики или лечения коронавирусной инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, включающий введение в организм млекопитающих комбинированного лекарственного средства по пп.1-4 в эффективном количестве.

8. Способ профилактики или лечения коронавирусной инфекции, вызываемой SARS-CoV-2 по п.7, где комбинированное лекарственное средство вводится одновременно, отдельно или последовательно с другими терапевтическими средствами.

9. Способ профилактики или лечения коронавирусной инфекции, вызываемой SARS-CoV-2 по п.7, включающий ингаляционное или интраназальное введение комбинированного лекарственного средства.

10. Набор для получения комбинированного лекарственного средства по п.1, содержащий по меньшей мере два контейнера, где первый контейнер содержит компонент (А): эффективное количество молекул миРНК, направленных против генома вируса SARS-CoV-2, представленных в виде двух комплементарных цепей с нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2 или SEQ ID NO 4 - SEQ ID NO 33, содержащих модификацию LNA в одной или нескольких позициях смысловой и антисмысловой цепи указанных последовательностей, второй контейнер содержит компонент (Б): дендримерный катионный пептид, обладающий трансфекционной активностью и характеризующийся структурной формулой R8K4X4K2H2KZC, где R - аргинин; К - лизин; X - 5 аминокислот в любом порядке, где аминокислоты представляют собой: триптофан (W), лейцин (L), изолейцин (I), треонин (T), валин (V), пролин (P), глутаминовую кислоту (E); Н - гистидин; Z - гидрофобный аминокислотный остаток, содержащий аланин (A) или фенилаланин (F); С -цистеин или цистеинамид, и инструкцию по применению.

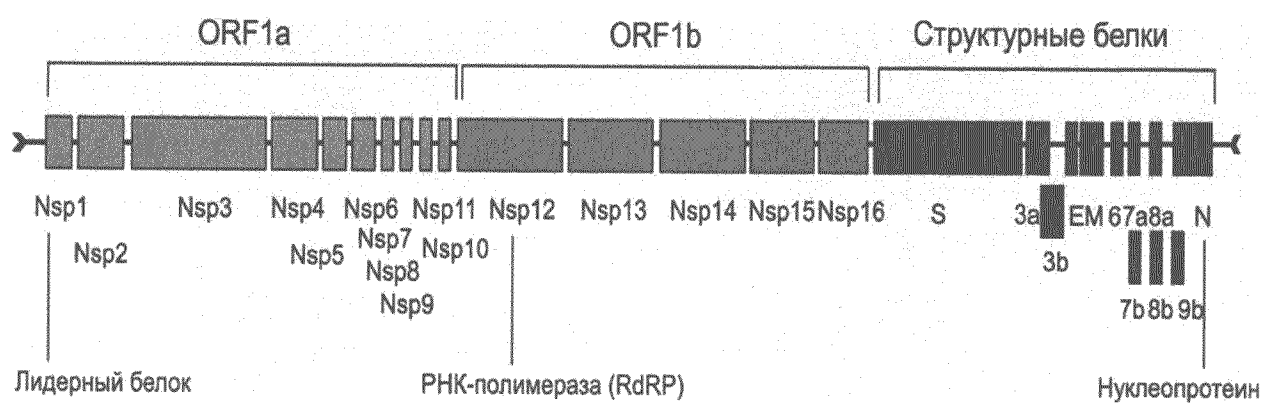
11. Набор по п.10, который по меньшей мере содержит один или более контейнеров с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом.

12. Набор по п.10, где компонент (А) и компонент (Б) находятся в лиофилизированной форме.

13. Набор по п.10, где компонент (А) содержит эффективное количество молекул миРНК, направленных против генома вируса SARS-CoV-2, представленных в виде двух комплементарных цепей, характеризующихся структурой (+G)GAAGGAAGUUCUGUUGAA(+T)(+T)dT и UUCAACAGAACUCCUCC(+T)(+T)dT, где модифицированные нуклеотиды в смысловой и антисмысловой цепи представлены модификацией LNA.

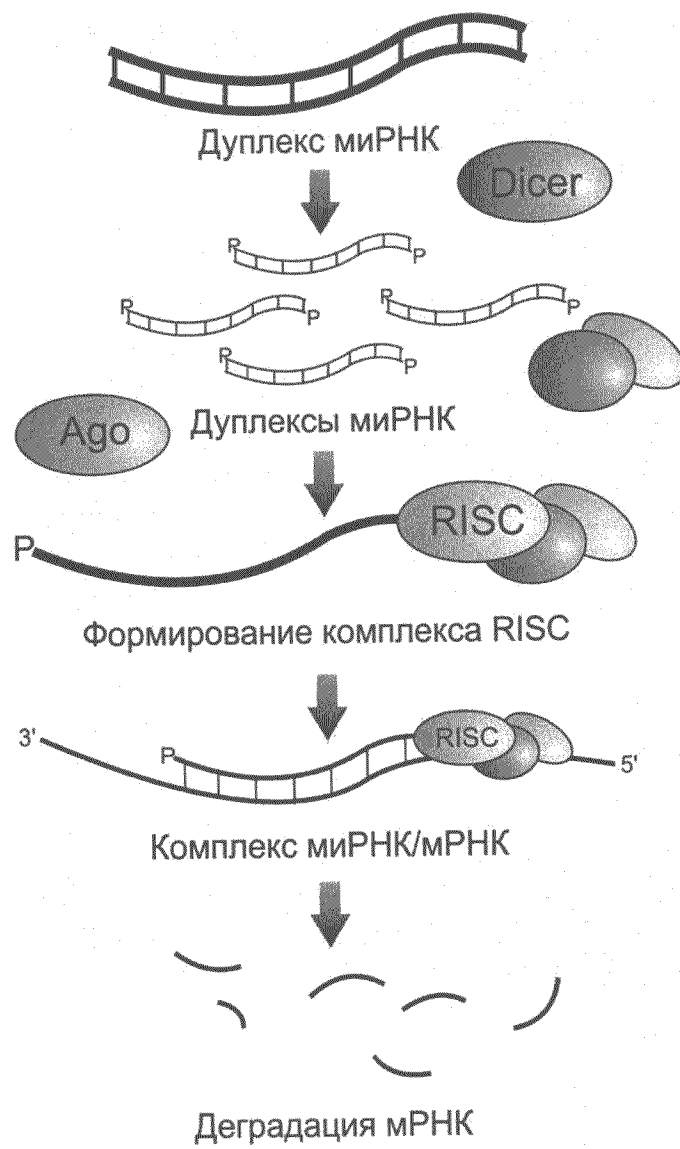
14. Набор по п.10, где компонент (Б) представляет собой катионный дендримерный пептид со структурной формулой R8K4X4K2H2KZC, где R - аргинин; К - лизин; X - SEQ ID NO 3; Н - гистидин; Z - фенилаланин (F); С -цистеин или цистеинамид, в виде биосовместимой соли или основания.

По доверенности

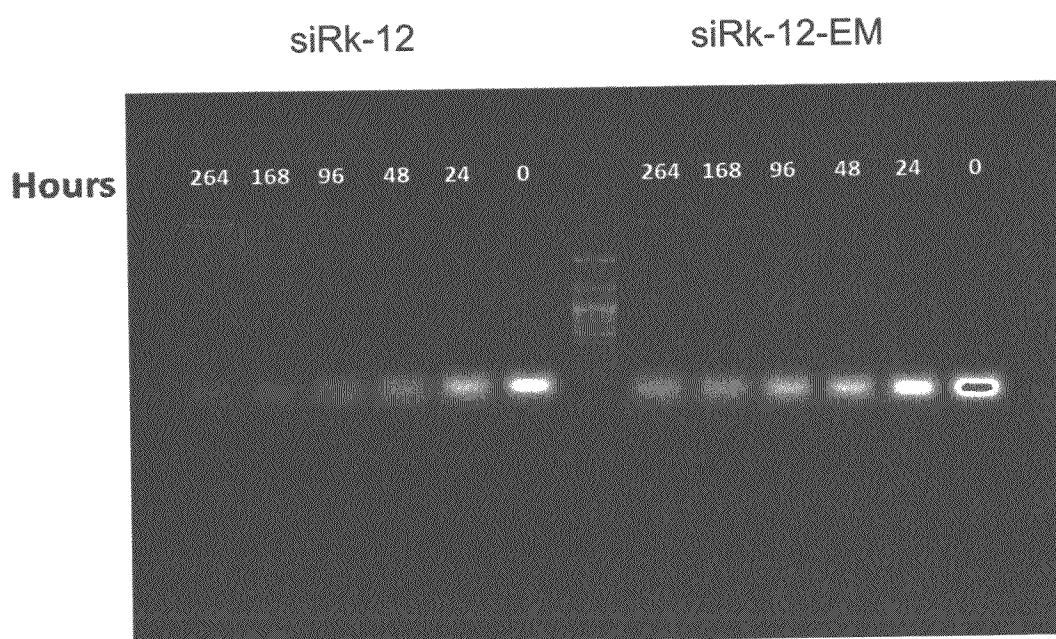
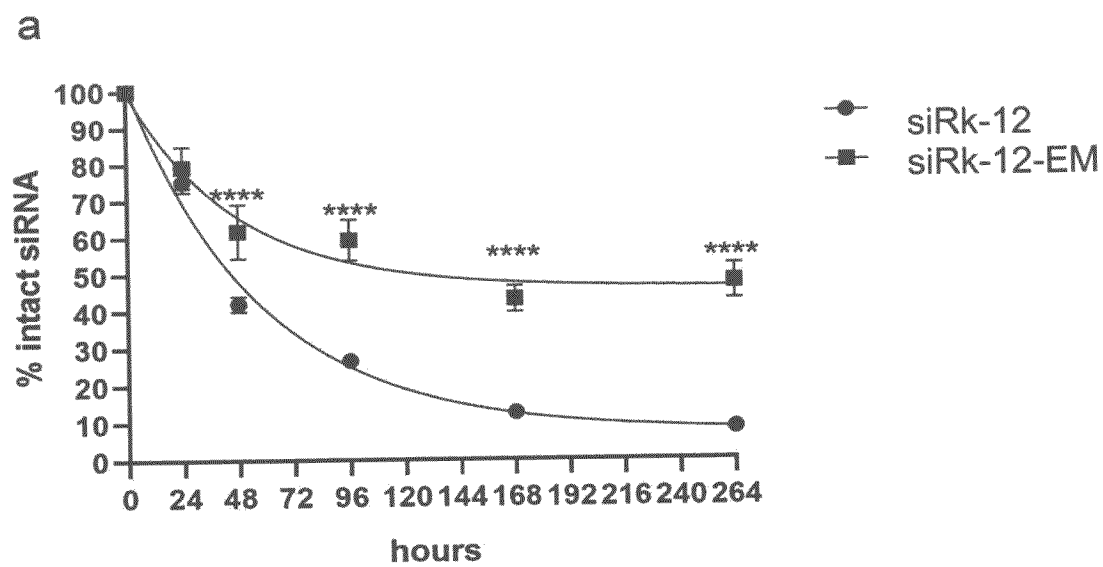


Фиг.1

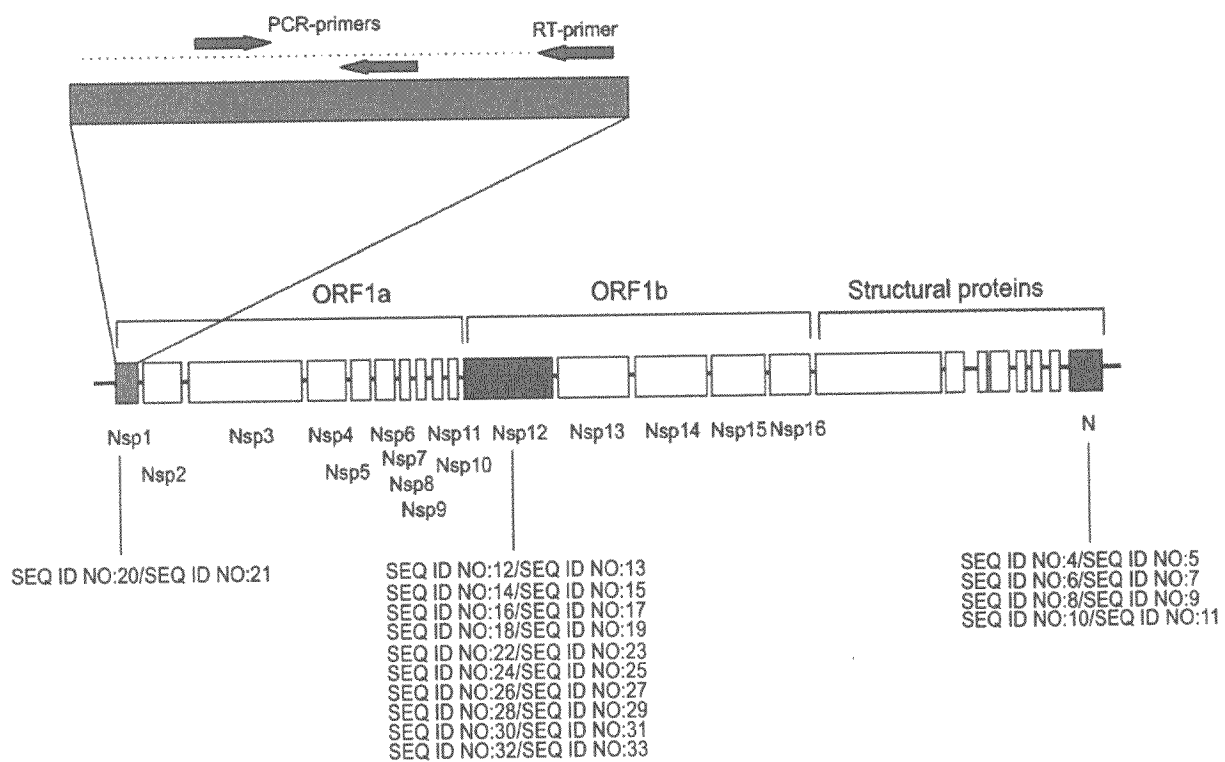
2/12



Фиг.2

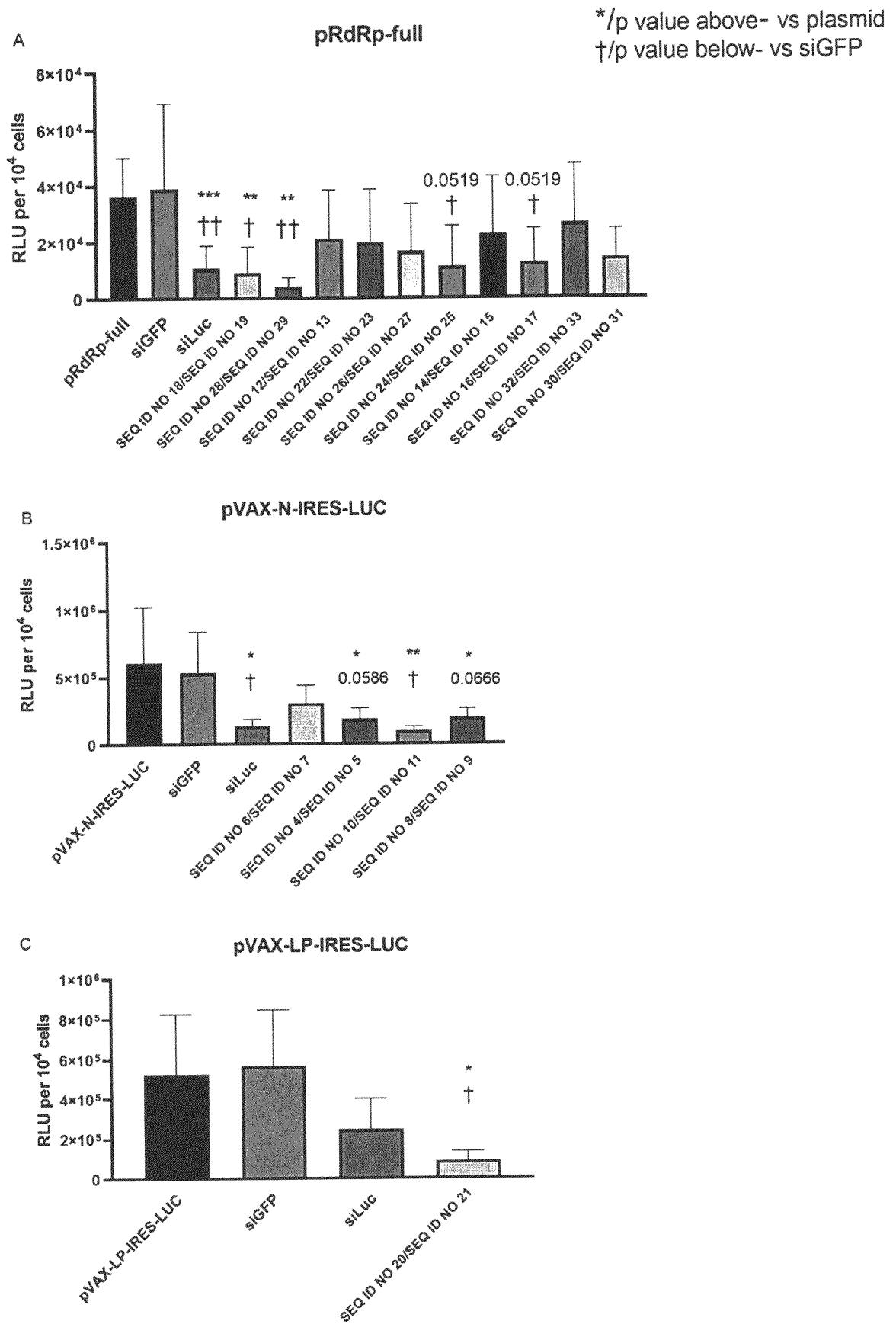


Фиг.3

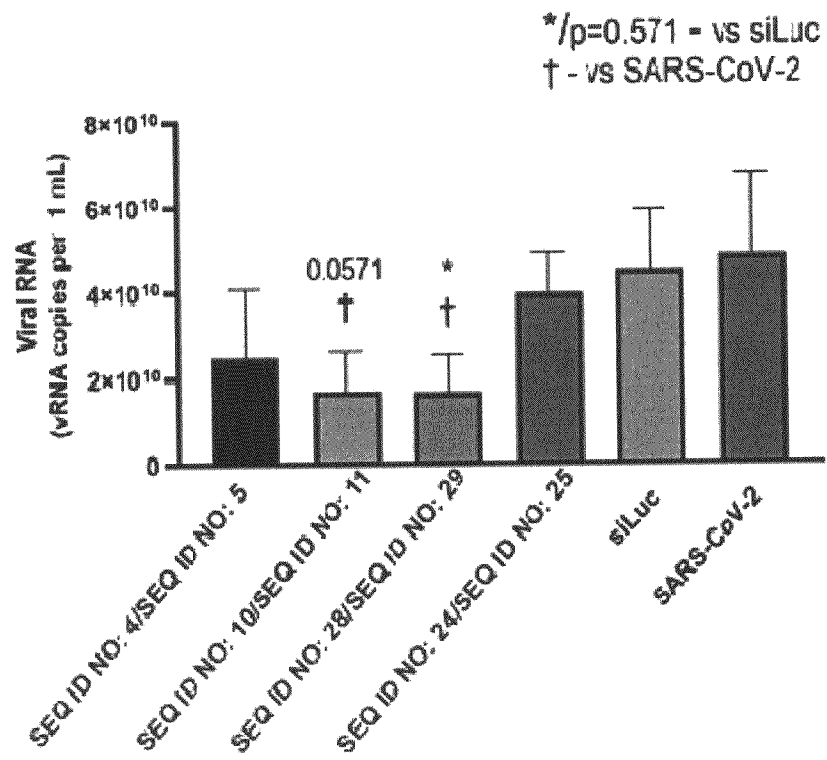


Фиг.4

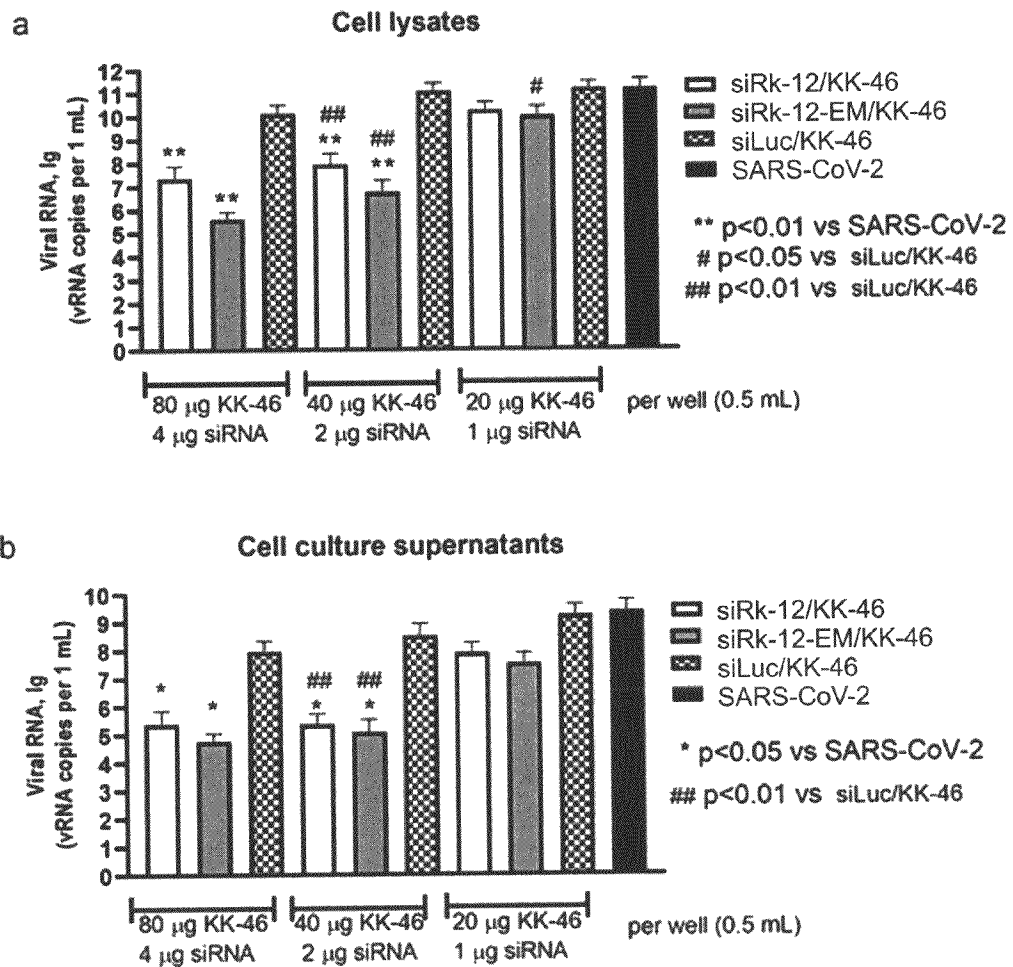
5/12



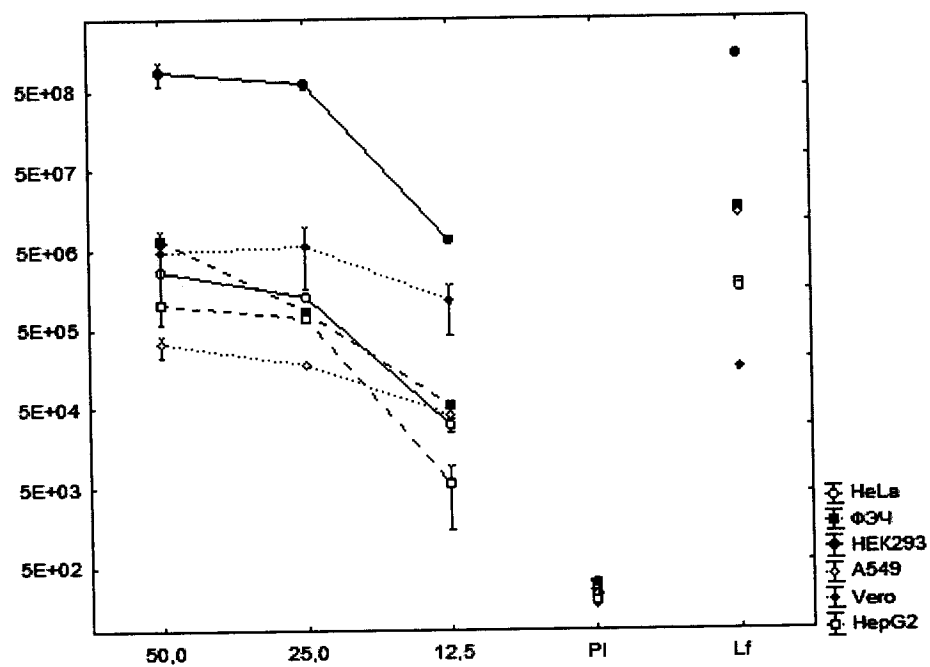
Фиг.5



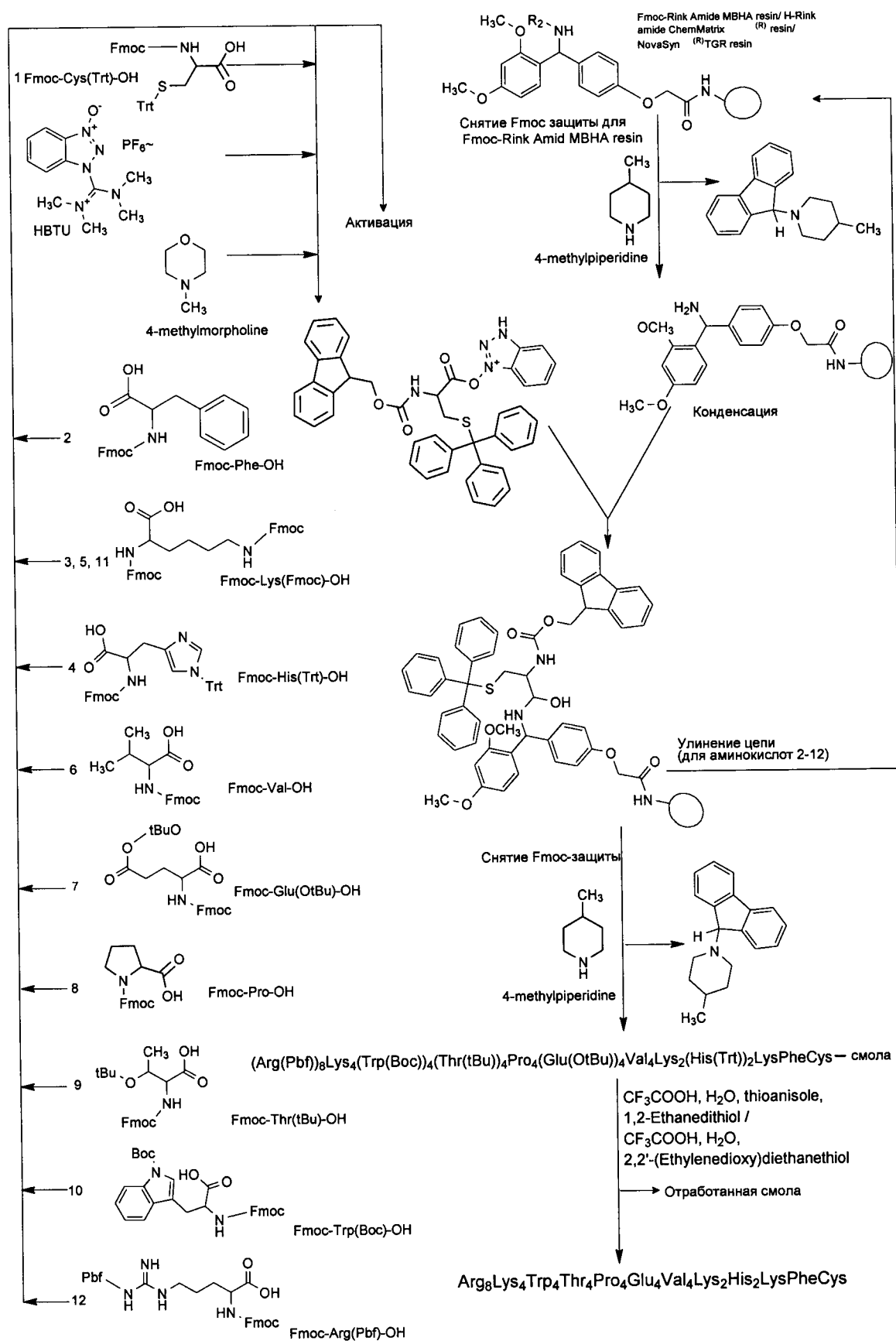
Фиг.6



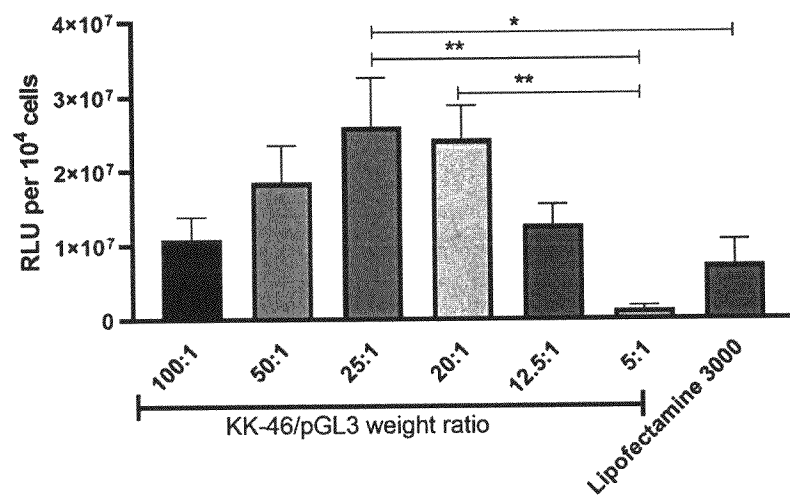
Фиг.7



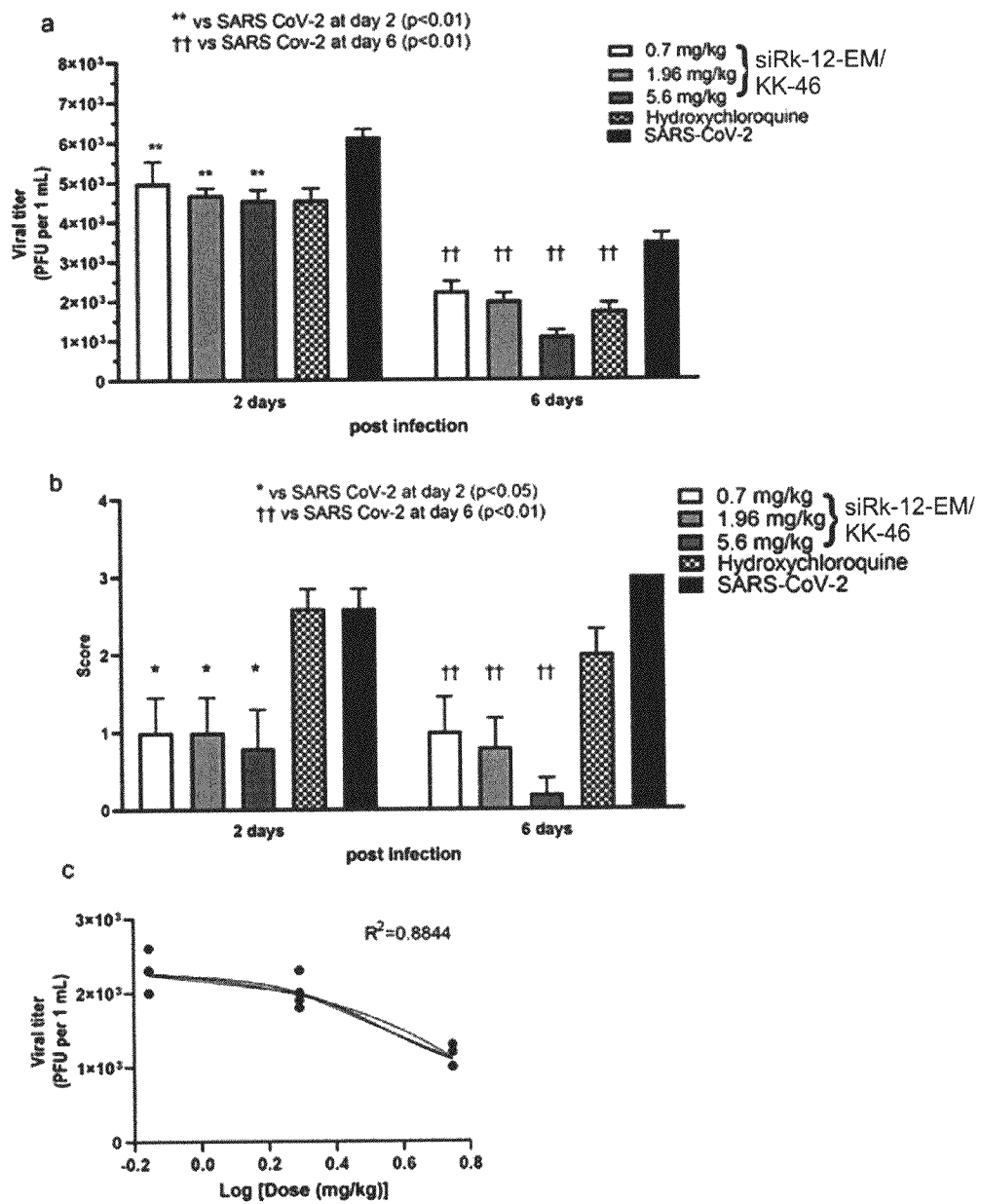
Фиг.8



Фиг.9

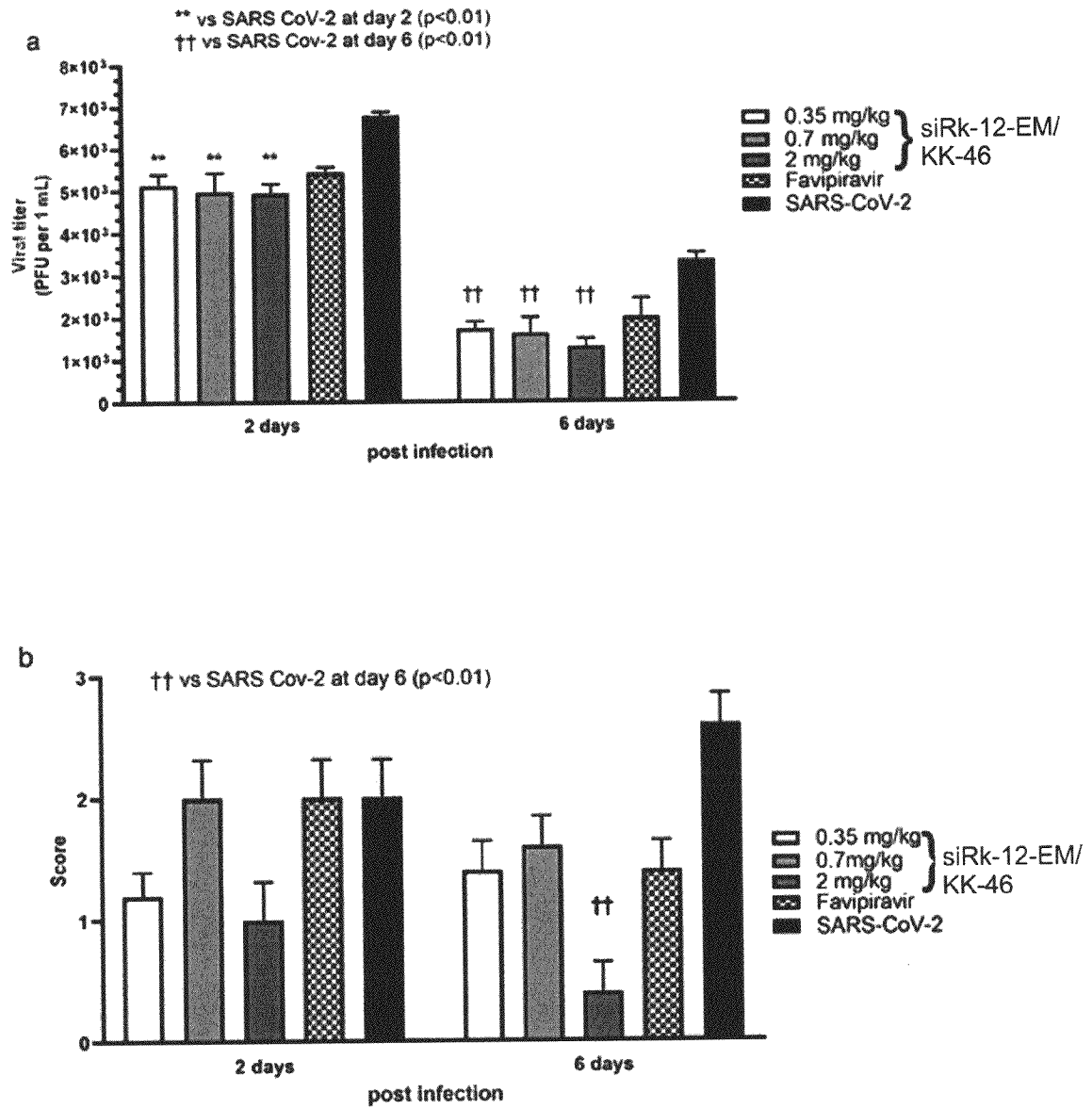


Фиг.10



Фиг.11

12/12



Фиг.12