



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

A61K 47/64 (2017.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 27/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

A61P 33/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07C 215/14 (2006.01)
C07C 233/20 (2006.01)
C07C 233/56 (2006.01)
C07C 237/10 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 47/645 (2020.05); A61K 48/0041 (2020.05); A61P 1/00 (2020.05); A61P 3/00 (2020.05); A61P 11/00 (2020.05); A61P 17/00 (2020.05); A61P 21/00 (2020.05); A61P 25/00 (2020.05); A61P 27/00 (2020.05); A61P 31/00 (2020.05); A61P 33/00 (2020.05); A61P 35/00 (2020.05); A61P 37/00 (2020.05); A61P 43/00 (2020.05); C07C 215/14 (2020.05); C07C 233/20 (2020.05); C07C 233/56 (2020.05); C07C 237/10 (2020.05)

(21)(22) Заявка: 2018140462, 09.06.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.06.2017

Дата регистрации:
07.07.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
09.06.2016 EP PCT/EP2016/063226

(43) Дата публикации заявки: 14.07.2020 Бюл. № 20

(45) Опубликовано: 07.07.2021 Бюл. № 19

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на
национальной фазе: 09.01.2019

(86) Заявка PCT:
EP 2017/064059 (09.06.2017)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2017/212009 (14.12.2017)

Адрес для переписки:
190000, Санкт-Петербург, БОКС-1125

(72) Автор(ы):

БАУМХОФ, Патрик (DE),
ТИЛЕ-ЗЮС, Каролин (DE),
РЕЙМАН, Йоханна (DE)

(73) Патентообладатель(и):

КБЮРВАК АГ (DE)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2014/207231 A1, 31.12.2014. J. G.
HARDY et al., Synergistic effects on gene
delivery - co-formulation of small disulfide-linked
dendritic polycations with Lipofectamine 2000,
ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY,
2009, vol. 7, no. 4, pp. 789-793. B.-K. KIM et al.,
Homodimeric SV40 NLS peptide formed by
disulfide bond as enhancer for gene delivery,
(см. прод.)

(54) ГИБРИДНЫЕ НОСИТЕЛИ ДЛЯ ДОСТАВКИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

(57) Реферат:

Изобретение относится к композиции для доставки нуклеиновых кислот. Композиция содержит (а) катионный пептид или полимер; (b) катионное или постоянно катионное липидоидное соединение и (с) соединение нуклеиновой кислоты. При этом указанное катионное или постоянно катионное липидоидное соединение содержит центральный атом азота, соединенный C₂-3 алкиленовыми группами с тремя группами

Формулы Па и/или Формулы Пб: -N(R₁)-CH₂-CH(R₅)-R₂ (Формула Па), -N⁺(R₃)(R₄)-CH₂-CH(R₅)-R₂ (Формула Пб), причем независимо для каждой отдельной группы Формулы Па или Формулы Пб R₁ выбран из водорода или C₁-C₄-алкила, R₂ выбран из линейного C₆, C₈ или C₁₀-алкила или разветвленной, насыщенной или

ненасыщенной C₆-C₁₆ гидрокарбильной цепи, R₃ и R₄ выбраны из C₁-C₄-алкила и R₅ представляет собой водород или гидроксил. Указанный катионный пептид или полимер представляет собой соединение, содержащее по меньшей мере одну катионную группу Р, содержащую по меньшей мере одну группу -SH, способную образовывать дисульфидную связь, или ее дисульфидсоединенный мультимер. Группа Р выбрана из полимерной группы, имеющей молекулярную массу от 0,5 кДа до 30 кДа, или

пептидной группы, состоящей из 3-100 аминокислот, при этом по меньшей мере 10% от общего количества аминокислот указанной пептидной группы представляют собой основные аминокислоты, выбранные из Arg, Lys, His и/или Orn. Изобретение относится также к наночастицам для доставки нуклеиновых кислот, содержащим указанную композицию, набору для получения композиции, вакцине и способу доставки иРНК в глаз. 8 н. и 26 з.п. ф-лы, 8 табл., 11 пр., 11 ил.

(56) (продолжение):

BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, 2012, vol. 22, no. 17, pp. 5415-5418. US 8969353 B2, 03.03.2015. Y. WANG et al., Lipid Nanoparticles for Ocular Gene Delivery, JOURNAL OF FUNCTIONAL BIOMATERIALS, 2015, vol. 6, no. 2, pp. 379-394. RU 2552352 C2, 10.06.2015.

RU 2751001 C2

RU 2751001 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 47/64 (2017.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 27/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

A61P 33/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07C 215/14 (2006.01)
C07C 233/20 (2006.01)
C07C 233/56 (2006.01)
C07C 237/10 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 47/645 (2020.05); *A61K 48/0041* (2020.05); *A61P 1/00* (2020.05); *A61P 3/00* (2020.05); *A61P 11/00* (2020.05); *A61P 17/00* (2020.05); *A61P 21/00* (2020.05); *A61P 25/00* (2020.05); *A61P 27/00* (2020.05); *A61P 31/00* (2020.05); *A61P 33/00* (2020.05); *A61P 35/00* (2020.05); *A61P 37/00* (2020.05); *A61P 43/00* (2020.05); *C07C 215/14* (2020.05); *C07C 233/20* (2020.05); *C07C 233/56* (2020.05); *C07C 237/10* (2020.05)

(21)(22) Application: **2018140462, 09.06.2017**

(24) Effective date for property rights:
09.06.2017

Registration date:
07.07.2021

Priority:

(30) Convention priority:
09.06.2016 EP PCT/EP2016/063226

(43) Application published: **14.07.2020 Bull. № 20**(45) Date of publication: **07.07.2021 Bull. № 19**(85) Commencement of national phase: **09.01.2019**

(86) PCT application:
EP 2017/064059 (09.06.2017)

(87) PCT publication:
WO 2017/212009 (14.12.2017)

Mail address:
190000, Sankt-Peterburg, BOKS-1125

(72) Inventor(s):

**BAUMKHOF, Patrik (DE),
 TILE-ZYUS, Karolin (DE),
 REJMAN, Joanna (DE)**

(73) Proprietor(s):

KYURVAK AG (DE)

(54) **HYBRID CARRIERS FOR DELIVERY OF NUCLEIC ACIDS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to a composition for the delivery of nucleic acids. The composition contains (a) a cationic peptide or polymer; (b) a cationic or permanently cationic lipidoid compound; and (c) a nucleic acid compound. In this case, the specified cationic or permanently cationic lipidoid compound contains a central nitrogen atom connected with C₂₋₃ alkylene groups with three groups of Formula IIa and/

or Formula IIb: -N(R₁)-CH₂-CH(R₅)-R₂ (Formula IIa), -N⁺(R₃)(R₄)-CH₂-CH(R₅)-R₂ (Formula IIb), and independently for each individual group of Formula IIa or Formula IIb R₁ is selected from hydrogen or C₁-C₄-alkyl, R₂ is selected from linear C₆, C₈ or C₁₀-alkyl or branched, saturated, or unsaturated C₆-C₁₆ hydrocarbyl chain, R₃ and R₄ are selected from C₁-C₄-alkyl and R₅ is a hydrogen or hydroxyl. The

specified cationic peptide or polymer is a compound containing at least one cationic group P, containing at least one group-SH, capable of forming a disulfide bond, or its disulfide-coupled multimer. Group P is selected from a polymer group having a molecular weight of 0.5 kDa to 30 kDa, or a peptide group consisting of 3-100 amino acids, with at least 10% of the total amino acids of the specified peptide group being the main amino acids selected from Arg, Lys, His

and/or Orn. The invention also relates to nanoparticles for the delivery of nucleic acids containing the specified composition, a set for the preparation of the composition, a vaccine and a method of delivery and RNA to the eye.

EFFECT: invention provides high efficiency of the composition, and ability to deliver nucleic acids to mammalian cells.

34 cl, 11 dwg, 8 tbl, 11 ex

R U 2 7 5 1 0 0 1 C 2

R U 2 7 5 1 0 0 1 C 2

Уровень техники

Настоящее изобретение относится к областям медикаментозной терапии, предотвращения заболеваний, а также доставки лекарственных препаратов. В частности, настоящее изобретение относится к носителям, которые можно применять для доставки
5 некоторых типов активных ингредиентов нуждающимся в этом субъектам. В частности, настоящее изобретение относится к доставке таких активных ингредиентов, представляющих собой биоактивные соединения, доставка которых через биологические барьеры к их мишеням в живом организме, таким как целевые органы, ткани или клетки, представляет сложность. Примеры таких биоактивных соединений, которые имеют
10 большое терапевтическое значение, и при этом доставка которых к их биологическим мишеням представляет сложность, включают вакцины и терапевтические средства на основе нуклеиновых кислот.

В настоящее время различные заболевания требуют лечения, которое включает введение лекарственных препаратов на основе пептидов, белков и нуклеиновых кислот, в частности, трансфекцию нуклеиновых кислот в клетки или ткани. Полный
15 терапевтический потенциал лекарственных препаратов на основе пептидов, белков и нуклеиновых кислот часто снижен вследствие их ограниченной способности проникать через плазматическую мембрану клеток млекопитающих из-за их размера и электрического заряда, что приводит к недостаточному проникновению в клетки и
20 неполноценной терапевтической эффективности. В настоящее время это препятствие является серьезной проблемой для разработок в сфере биомедицины и затрудняет коммерческий успех многих биофармацевтических препаратов (см., например, работу Foerg and Merkle, Journal of Pharmaceutical Sciences, опубликованную в Интернете на вебсайте www.interscience.wiley.com, 2008, 97(1): 144-62).

Для лечения некоторых заболеваний или нарушений были разработаны генно-терапевтические подходы в качестве специфической формы таких способов лечения, которые требуют трансфекции клеток или тканей генами и их встраивания в ДНК
25 клеток, например, в случае наследственных заболеваний, при которых дефектный мутантный аллель заменяют функциональным аллелем. Однако на сегодняшний день перенос или встраивание нуклеиновых кислот или генов в клетки индивидуума все еще
30 представляет собой серьезную проблему, несмотря на то, что это безусловно необходимо для обеспечения существенного терапевтического эффекта генной терапии.

Чтобы добиться успешного переноса нуклеиновых кислот или генов в клетки индивидуума, необходимо преодолеть ряд различных сложностей. Транспорт
35 нуклеиновых кислот обычно происходит посредством ассоциации нуклеиновой кислоты с клеточной мембраной и последующего поглощения эндосомами. В эндосомах введенные нуклеиновые кислоты отделены от цитозоля. Поскольку экспрессия происходит в цитозоле, эти нуклеиновые кислоты должны покинуть эндосому. Если нуклеиновые кислоты не покидают эндосому до слияния эндосомы с лизосомой, они
40 подвергаются обычному процессу расщепления содержимого эндосомы и разрушаются. В другом случае эндосома может слиться с клеточной мембраной, что приводит к возвращению ее содержимого во внеклеточную среду. Соответственно, понятно, что для эффективного переноса нуклеиновых кислот высвобождение из эндосомы, является одним из наиболее важных этапов помимо эффективности самой трансфекции. Вплоть
45 до настоящего времени существуют разные подходы к решению этих проблем. Однако до сих пор ни один из подходов не был полностью успешным во всех аспектах.

Агенты для трансфекции, применяемые в настоящее время в данной области техники, обычно включают различные типы пептидов, полимеров, липидов, а также другие

соединения-носители, которые могут быть собраны в нано- или микрочастицы (см., например, Gao, X., K. S. Kim, et al., (2007), AAPS J 9(1): E92-104). Большинство из этих агентов для трансфекции успешно применяли только в реакциях в условиях *in vitro*.

При трансфекции клеток живого животного нуклеиновыми кислотами необходимо соблюдать дополнительные требования. Например, комплекс нуклеиновой кислоты и носителя должен быть стабильным в физиологических солевых растворах в отношении образования агрегатов. Кроме того, он не должен взаимодействовать с частями системы комплемента хозяина. Помимо этого, комплекс должен защищать нуклеиновую кислоту от преждевременного разрушения вне клетки повсеместно встречающимися нуклеазами. Для сфер применения генной терапии также очень важно, чтобы носитель не распознавался адаптивной иммунной системой (иммуногенность) и не стимулировал неспецифическую «цитокиновую бурю» (острый иммунный ответ) (см. Gao, Kim et al., (2007, выше); Martin, M. E. and K. G. Rice (2007), AAPS J 9(1): E18-29; и Foerg and Merkle, (2008, выше)).

В работе Foerg и Merkle (2008, выше) обсуждается терапевтический потенциал лекарственных препаратов на основе пептидов, белков и нуклеиновых кислот. Согласно результатам анализа в данной работе, полный терапевтический потенциал таких лекарственных препаратов часто снижен вследствие их ограниченной способности проникать через плазматическую мембрану клеток млекопитающих, что приводит к недостаточному проникновению в клетки и неполноценной терапевтической эффективности. В настоящее время это препятствие представляет собой серьезную проблему для разработок в сфере биомедицины и затрудняет коммерческий успех многих биофармацевтических препаратов.

Применительно к упомянутому выше в Gao et al. (Gao et al., The AAPS Journal 2007; 9 (1) Article 9) описано, что первостепенной проблемой для генной терапии является разработка способа доставки терапевтического гена в выбранные клетки, в которых может быть достигнута корректная экспрессия гена. Однако доставка генов и, в частности, успешное введение нуклеиновых кислот в клетки или ткани не являются простыми процессами и обычно зависят от многих факторов. Для успешной доставки, например, доставки нуклеиновых кислот или генов в клетки или ткани, необходимо преодолеть множество барьеров. В соответствии с Gao et al., (2007) оптимальный способ доставки генов должен удовлетворять 3 основным критериям: (1) он должен защищать трансген от разрушения нуклеазами в межклеточных матриксах, (2) он должен переносить трансген через плазматическую мембрану, и (3) он не должен иметь неблагоприятных эффектов.

Обычно трансфекцию клеток нуклеиновыми кислотами осуществляют с применением вирусных или невирусных векторов или носителей. Для успешной доставки такие вирусные или невирусные векторы должны быть способны преодолеть вышеупомянутые барьеры. Наиболее успешные стратегии генной терапии, доступные в настоящее время, основаны на применении вирусных векторов, таких как аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, ретровирусы и вирусы герпеса. Вирусные векторы способны опосредовать перенос генов с высокой эффективностью и возможностью обеспечения длительной экспрессии генов, а также удовлетворяют 2 из 3 критериев. Однако острый иммунный ответ, иммуногенность и инсерционный мутагенез, обнаруженные в ходе клинических исследований средств генной терапии, вызвали серьезные опасения в отношении безопасности некоторых обычно применяемых вирусных векторов.

Эта проблема может быть решена с помощью применения невирусных векторов.

Несмотря на то, что невирусные векторы не столь эффективны как вирусные векторы, многие невирусные векторы были разработаны для обеспечения более безопасных альтернативных вариантов генной терапии. Способы невирусной доставки генов были изучены с использованием физического (доставка генов без носителя) и химического

5 подходов (доставка генов на основе синтетического вектора). Физические подходы обычно включают простую инъекцию с использованием инъекционных игл, электропорацию, доставку с помощью генной пушки, ультразвука и гидродинамическую доставку. В некоторых из этих подходов применяют физическую силу, которая приводит к пермеабиллизации клеточной мембраны и облегчает внутриклеточный перенос генов.

10 В химических подходах в качестве носителей для доставки трансгена в клетки обычно применяют синтетические или природные соединения, например, катионные липиды или катионные полимеры. Несмотря на то, что в области фундаментальной науки и в способах применения различных невирусных систем доставки генов был достигнут значительный прогресс, большинство невирусных подходов по-прежнему менее

15 эффективны, чем вирусные векторы, в частности, при доставке гена в условиях *in vivo* (см., например, Gao et al.. The AAPS Journal 2007; 9(1) Article 9).

В течение последнего десятилетия сообщали о привлекательных перспективах в отношении существенного улучшения клеточной доставки нуклеиновых кислот, предположительно, в результате их физической сборки или химического лигирования

20 с так называемыми проникающими в клетку пептидами (CPP), также обозначаемыми как домены белковой трансдукции (PTD) (см. Foerg and Merkle, (2008, выше)). CPP представляют собой короткие пептидные последовательности, содержащие от 10 до приблизительно 30 аминокислот, которые могут проникать через плазматическую мембрану клеток млекопитающих и, соответственно, могут обеспечить не имеющие

25 аналогов возможности для доставки в клетку лекарственных препаратов. Практически все такие пептиды содержат ряд катионных аминокислот в сочетании с последовательностью, которая образует α -спираль при низком значении pH. Поскольку в условиях *in vivo* pH непрерывно снижается протонными насосами, конформационное изменение пептида обычно быстро инициируется. Указанный спиральный мотив

30 опосредует встраивание в мембрану эндосомы, что приводит к высвобождению ее содержимого в цитоплазму (см. Foerg and Merkle, (2008, выше); и Vives, E., P. Brodin, et al. (1997); A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. J Biol Chem 272(25): 16010-7). Несмотря на эти преимущества основным препятствием для доставки лекарственных препаратов,

35 опосредуемой CPP, как полагают, является частый быстрый метаболический клиренс пептидов при контакте с ферментативными барьерами эпителия и эндотелия или при прохождении через них. Следовательно, метаболическая стабильность CPP является важным биофармацевтическим фактором для их клеточной биодоступности. Однако в данной области техники отсутствуют CPP, которые, с одной стороны, достаточно

40 стабильны, чтобы донести свой груз к мишени, прежде чем они будут расщеплены в результате метаболизма, и которые, с другой стороны, могут быть удалены из ткани, прежде чем они смогут накопиться и достичь токсичных уровней.

Еще один подход в данной области техники для доставки транспортируемых молекул в клетки, например, для генной терапии, включает применение других типов пептидных

45 лигандов (см. Martin and Rice (см. Martin and Rice, The AAPS Journal 2007; 9 (1) Article 3)). Такие пептидные лиганды могут представлять собой короткие последовательности, полученные из более крупных белков, которые представляют собой незаменимые аминокислоты, необходимые для распознавания рецептором, такие как пептид EGF,

применяемый для нацеливания на раковые клетки. Были идентифицированы другие пептидные лиганды, включая лиганды, применяемые для нацеливания на лектиноподобный окисленный рецептор ЛПНП (LOX-1). Активация LOX-1 в эндотелиальных клетках связана с дисфункциональными состояниями, такими как гипертония и атеросклероз. Однако такие пептидные лиганды не пригодны для многих подходов генной терапии, поскольку они не могут быть соединены с молекулами своего груза за счет образования комплексов или адгезии, а нуждаются в образовании ковалентных связей, например, с помощью сшивающих агентов, которые обычно проявляют цитотоксические эффекты в клетке.

Синтетические векторы также можно применять для доставки транспортируемых молекул в клетки, например, для целей генной терапии. Однако одним из основных недостатков многих синтетических векторов является свойственная им низкая эффективность трансфекции по сравнению с вирусными векторами, и для дальнейшей клинической разработки требуются существенные улучшения. Было выявлено несколько препятствий, которые ограничивают перенос нуклеиновых кислот как в условиях *in vitro*, так и в условиях *in vivo*, которые включают плохую внутриклеточную доставку, токсичность и нестабильность векторов в физиологических условиях (см., например, Read, M. L., K. H. Bremner, et al., (2003): Vectors based on reducible polycations facilitate intracellular release of nucleic acids. *J Gene Med* 5(3): 232-45).

В одном конкретном подходе генной терапии применяют катионные или катионируемые липиды. Однако, несмотря на то, что многие катионные или катионируемые липиды проявляют превосходную активность в отношении трансфекции в клеточной культуре, большинство из них малоэффективны в присутствии сыворотки, и лишь некоторые из них активны в условиях *in vivo*. Значительное изменение размера, поверхностного заряда и липидного состава происходит, когда липоплексы подвергаются воздействию подавляющего количества отрицательно заряженных и часто амфипатических белков и полисахаридов, которые присутствуют в крови, жидкости эпителиальной выстилки слизистой оболочки или тканевом матриксе. После введения в условиях *in vivo* липоплексы, как правило, взаимодействуют с отрицательно заряженными компонентами крови и образуют большие агрегаты, которые могут быть абсорбированы на поверхности циркулирующих эритроцитов, захвачены в толстый слизистый слой или эмболизированы в микроциркуляторные части сосудистого русла, что препятствует достижению ими предполагаемых клеток-мишеней в удаленном месте. Помимо этого, наблюдали токсичность, связанная с липоплексами. Симптомы включают, помимо прочего, индукцию воспалительных цитокинов. У человека были отмечены нежелательные воспалительные реакции различной степени тяжести, включая гриппоподобные симптомы у субъектов, получавших липоплексы. Соответственно, безопасность применения липоплексов у человека представляется сомнительной, в частности, если требуется повторное введение.

В еще одном подходе генной терапии применяют катионные или катионируемые полимеры. Такие полимеры оказались эффективными при доставке нуклеиновых кислот, поскольку они могут образовывать прочные комплексы и конденсировать отрицательно заряженную нуклеиновую кислоту. Соответственно, был изучен ряд катионных или катионируемых полимеров в качестве носителей для доставки генов в условиях *in vitro* и в условиях *in vivo*. К ним относятся полиэтиленмин (ПЭИ), дендримеры полиамидамина и полипропиламина, полиаллиламин, катионный декстран, хитозан, различные белки и пептиды. Несмотря на то, что большинство катионных или катионируемых полимеров обладают функцией конденсации ДНК в мелкие частицы

и способны облегчать клеточное поглощение посредством эндоцитоза за счет взаимодействия заряд-заряд с анионными сайтами на клеточных поверхностях, их трансфекционная активность и токсичность значительно различаются. Следует отметить, что катионные или катионизируемые полимеры проявляют лучшую эффективность трансфекции при увеличении молекулярной массы благодаря более сильному комплексообразованию с отрицательно заряженной транспортируемой нуклеиновой кислотой. Однако увеличение молекулярной массы также приводит к увеличению токсичности полимера. ПЭИ, возможно, является наиболее активным и наиболее изученным полимером для доставки генов, но основным его недостатком как реагента для трансфекции является неспособность к биологическому разложению в природе и токсичность. Помимо этого, несмотря на то, что полиплексы, образованные высокомолекулярными полимерами, проявляют улучшенную стабильность в физиологических условиях, полученные данные указывали на то, что такие полимеры могут препятствовать распаковке вектора. Например, было показано, что поли-L-лизин (PLL), состоящий из 19-36 аминокислотных остатков, диссоциирует от ДНК быстрее, чем PLL, состоящий из 180 остатков, что приводит к значительному усилению кратковременной экспрессии генов. Для уплотнения ДНК в структуры, активные при опосредуемой рецептором доставке генов, требуется минимум от шести до восьми катионных аминокислот. Однако полиплексы, образованные с короткими поликатионами, нестабильны в физиологических условиях и обычно быстро агрегируют в физиологических солевых растворах. Чтобы преодолеть это негативное влияние, Read et al. (см. Read, M.L., K.H. Bremner, et al., (2003): Vectors based on reducible polycations facilitate intracellular release of nucleic acids. *J Gene Med* 5(3): 232-45; и Read, M.L., S. Singh, et al., (2005): A versatile reducible polycation-based system for efficient delivery of a broad range of nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 33(9): e86) разработали новый тип синтетического вектора на основе линейного восстанавливаемого поликатиона (RPC), полученного с помощью окислительной поликонденсации пептида Cys-Lysio-Cys, который может расщепляться под действием внутриклеточного окружения, чтобы облегчить высвобождение нуклеиновых кислот. Авторы смогли показать, что полиплексы, образованные RPC, дестабилизируются под действием восстанавливающих условий, что обеспечивает эффективное высвобождение ДНК и иРНК. Расщепление RPC также снижало токсичность поликатиона до уровней, сопоставимых с уровнями для низкомолекулярных пептидов. Недостаток данного подхода Read et al., (2003, выше) заключался в том, что для повышения эффективности трансфекции до целесообразных уровней дополнительно требовался эндосомолитический агент хлорохин или катионные липиды DOTAP. Как следствие, Read et al., (2005, выше) включили в RPC остатки гистидина, которые обладают известной эндосомальной буферной емкостью. Они смогли показать, что богатые гистидином RPC могут расщепляться под действием внутриклеточного восстанавливающего окружения, обеспечивая эффективную цитоплазматическую доставку широкого спектра нуклеиновых кислот, включая молекулы плазмидной ДНК, иРНК и миРНК, без потребности в эндосомолитическом агенте хлорохине.

Read et al., (2005, выше) не оценивали возможность непосредственного использования богатых гистидином RPC для вариантов применения в условиях *in vivo*. В их исследовании трансфекции выполняли в отсутствие сыворотки, чтобы избежать эффекта маскировки способности остатков гистидина усиливать перенос генов, который мог возникнуть в результате связывания белков сыворотки с полиплексами, ограничивающего клеточное поглощение. Предварительные эксперименты указывают

на то, что присутствие белков сыворотки может отрицательно влиять на трансфекционные свойства богатых гистином полиплексов RPC, при этом в присутствии 10% ФСТ (фетальной сыворотки теленка) наблюдали 50% уменьшение количества GFP положительных клеток. Для применения в условиях *in vivo* авторы предлагают модификации с применением гидрофильного полимера поли-N-2-гидроксипропилметакриламида. Соответственно, Read et al., (2005, выше) не удалось предотвратить агрегацию полиплексов и связывание поликатионных белков с белками сыворотки. Кроме того, из-за большого избытка полимера, который характеризуется высоким соотношением N/P, при комплексообразовании с нуклеиновой кислотой образуются прочные комплексы, которые имеют ограниченное применение в условиях *in vivo* вследствие их сильной склонности к индуцированной солью агломерации и взаимодействиям с компонентами сыворотки (опсонизация). Помимо этого, такие комплексы могут вызывать острый иммунный ответ при применении в целях генной терапии. Read et al., (2003, выше) также не представили в публикации данные, полученные в условиях *in vivo* для комплексов на основе RPC. Как оказалось, упомянутые прочные комплексы на основе RPC полностью неактивны после местного введения в дерму. Также Read et al., (2005, выше) применяли жесткие условия окисления (30% ДМСО) для индукции образования высокомолекулярных полимеров с максимально возможной длиной цепи («ступенчатая полимеризация»), чтобы обеспечить полное комплексообразование транспортируемой нуклеиновой кислоты.

В случае подхода, аналогичного подходу Read et al., McKenzie et al., (McKenzie, D.L., K.Y. Kwok, et al., (2000), J Biol Chem 275(14): 9970-7., McKenzie, D.L., E. Smiley, et al. (2000), Bioconjug Chem 11(6): 901-9, и US 6770740 B1) разработали самосшивающиеся пептиды в качестве агентов для доставки генов с помощью встраивания нескольких остатков цистеина в короткие синтетические пептиды с целью снижения токсичности, которая наблюдается для высокомолекулярных поликатионов. Для образования комплексов с ДНК они смешивали самосшивающиеся пептиды с ДНК, чтобы индуцировать образование межпептидных дисульфидных связей одновременно с образованием комплекса с транспортируемой ДНК. Для подходов к доставке генов в условиях *in vivo* они предлагают дериватизацию самосшивающихся пептидов путем нанесения покрытия, обеспечивающего малозаметность (например, полиэтиленгликоля), или с применением нацеливающего агента, функционально присоединенного к пептиду в сайте, удаленном от каждого конца. В другом подходе те же авторы разработали дериватизацию несшивающего пептида CWK₁₈ полиэтиленгликолем за счет восстанавливаемых или невосстанавливаемых связей для маскировки ДНК-пептидных конденсатов и уменьшения таким образом взаимодействия с компонентами крови (Kwok, K.Y., D.L. McKenzie, et al., (1999). «Formulation of highly soluble poly(ethylene glycol-peptide DNA condensates.» J Pharm Sci 88(10): 996-1003).

Подытоживая вышеизложенное, в настоящее время уровень техники, описанный в качестве примера выше, имеет различные недостатки. Один конкретный недостаток самосшивающихся пептидов, описанных Read et al., (2003, выше) или McKenzie et al., (2000 I и II, выше, и US 6770740 B1), касается высокого положительного заряда на поверхности образующихся частиц. Из-за такого заряда частицы проявляют высокую нестабильность в отношении агломерации, когда эти частицы подвергаются воздействию повышенных концентраций соли в условиях *in vivo*. Однако такие концентрации соли обычно возникают в условиях *in vivo* в клетках или внеклеточных средах. Также комплексы с высоким положительным зарядом проявляют сильную тенденцию к опсонизации. Это ведет к усиленному поглощению макрофагами и быстрой инактивации

комплекса из-за разрушения. В частности, поглощение этих комплексов клетками иммунной системы обычно приводит к последующей стимуляции различных цитокинов. Однако такая неспецифическая активация врожденной иммунной системы является серьезным недостатком этих систем и ее следует избегать, особенно для целей нескольких аспектов генной терапии, когда следует неукоснительно избегать острого иммунного ответа (цитокиновой бури). Помимо этого, в биологических системах положительно заряженные комплексы могут быть легко связаны или иммобилизованы отрицательно заряженными компонентами внеклеточного матрикса или сыворотки. Помимо этого, нуклеиновые кислоты в комплексе могут высвобождаться слишком рано, что приводит к снижению эффективности переноса и времени полужизни комплексов в условиях *in vivo*. Кроме того, обратимая дериватизация носителей с помощью агента, обеспечивающего малозаметность, который является предпочтительным для доставки генов в условиях *in vivo*, такого как полиэтиленгликоль (ПЭГ), была возможна только для пептидных мономеров, но не для самосшивающихся пептидов, или предпочтительнее для полимерного носителя с определенной длиной полимерной цепи. В частности, такая обратимая дериватизация была невозможна в концевых областях перекрестно сшитого катионного пептидного носителя. Помимо этого в предшествующем уровне техники были описаны только высокомолекулярные полимеры с длинными полимерными цепями или с неопределенной длиной полимерной цепи, состоящие из самосшивающихся пептидов, которые, к сожалению, уплотняют свой груз до такой степени, что высвобождение груза в клетке является ограниченным. Чрезвычайно неопределенная длина полимерной цепи создает еще больше проблем в отношении одобрения регуляторными органами лекарственного средства на основе RPC. Одним из предварительных условий такого одобрения является то, что каждый препарат лекарственного средства имеет одинаковый состав, одинаковую структуру и одинаковые свойства. Это не может быть обеспечено для комплексов на основе RPC, доступных на основании предшествующего уровня техники. Также полимеры или комплексы на основе RPC, представленные в предшествующем уровне техники, трудно охарактеризовать из-за их неопределенной структуры или длины полимерной цепи.

Вследствие этого до настоящего момента не было представлено ни одного общепринятого способа или носителя, который обеспечивает как упаковку, так и стабилизацию нуклеиновой кислоты для целей генной терапии и других вариантов терапевтического применения, и который проявляет хорошую трансфекционную активность в комбинации с хорошим высвобождением транспортируемой нуклеиновой кислоты, в частности, в условиях *in vivo*, с низкой или даже отсутствующей токсичностью, например, благодаря комбинации обратимого нанесения покрытия, обеспечивающего малозаметность, и обратимого комплексообразования нуклеиновой кислоты с помощью самосшивающихся полимеров. Соответственно, в данной области техники все еще существует потребность в обеспечении улучшенных носителей для целей переноса генов, которые являются достаточно стабильными для переноса своего груза к мишени, прежде чем они будут метаболически расщеплены, и которые, тем не менее, выводятся из ткани, прежде чем они смогут накопиться и достичь токсичных уровней.

Соответственно, цель настоящего изобретения заключается в обеспечении носителя, в частности, для доставки нуклеиновых кислот для вариантов терапевтического или профилактического применения, который способен упаковывать нуклеиновые кислоты и который обеспечивает их эффективное введение в различные клеточные линии в условиях *in vitro*, а также обеспечивает трансфекцию в условиях *in vivo*. Поскольку

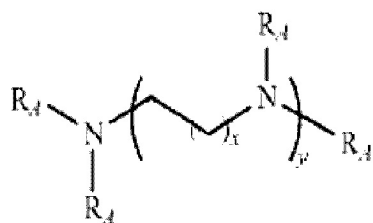
поглощение клетками происходит посредством эндосомного пути, такой носитель или комплексобразующий агент также должен позволять или обеспечивать эффективное высвобождение нуклеиновой кислоты из эндосом. Другой целью является обеспечение носителя, который проявляет устойчивость к агрегации при комплексообразовании с нуклеиновой кислотой. Еще одной целью является обеспечение повышенной стабильности транспортируемой нуклеиновой кислоты в отношении сред, содержащих сыворотку. Другой целью является обеспечение эффективной активности в условиях *in vivo* без сильной острой иммунной реакции. Другой целью является преодоление любых недостатков или ограничений известных носителей для доставки нуклеиновых кислот, как описано, например, в настоящем документе выше. Другие цели, которые достигаются с помощью настоящего изобретения, станут понятны на основании следующего описания, примеров и формулы изобретения.

Цели достигаются с помощью предмета настоящего изобретения, как изложено в формуле изобретения.

Краткое описание изобретения

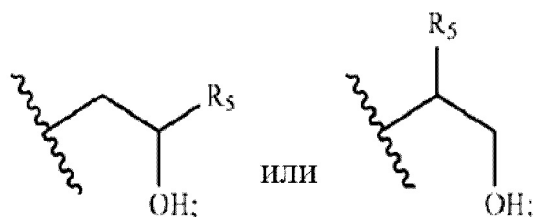
Согласно первому аспекту настоящее изобретение относится к композиции, содержащей катионный пептид или полимер, катионное липидоидное соединение и соединение нуклеиновой кислоты. Липидоидное соединение предпочтительно представляет собой соединение, которое содержит два или более катионных атомов азота и по меньшей мере два липофильных хвоста. В отличие от многих обычных катионных липидов липидоидное соединение может не содержать гидролизующую соединяющую группу, в частности, соединяющие группы, содержащие гидролизуемые сложноэфирные, амидные или карбаматные группы. Катионные атомы азота липидоида могут быть катионизируемыми или постоянно катионными, или в соединении могут присутствовать оба типа катионных атомов азота.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения липидоидное соединение представляет собой соединение в соответствии с Формулой I

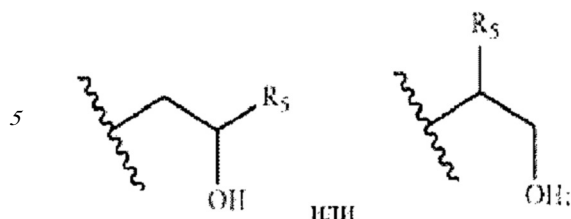


(Формула I)

в которой R_A в каждом случае независимо представляет собой незамещенный, циклический или ациклический, разветвленный или неразветвленный C_{1-20} алифатический заместитель; замещенный или незамещенный, циклический или ациклический, разветвленный или неразветвленный C_{1-20} гетероалифатический заместитель; замещенный или незамещенный арил; замещенный или незамещенный гетероарил;



и в которой по меньшей мере один R_A представляет собой



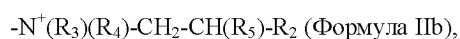
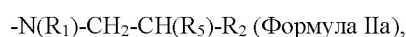
Помимо этого, R_5 в каждом случае независимо представляет собой незамещенный, циклический или ациклический, разветвленный или неразветвленный C_{8-16} алифатический заместитель; замещенный или незамещенный арил; или замещенный или незамещенный гетероарил. В каждом случае x является целым числом от 1 до 10 включительно; и в каждом случае y является целым числом от 1 до 10 включительно. Помимо этого, любая фармацевтически приемлемая соль соединения Формулы I включена в объем

15

липиоидного соединения. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения липидоидное соединение в соответствии с Формулой I содержит группу ПЭГ.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения липидоид представляет собой соединение, которое содержит две или три группы Формулы Ia и/или Формулы Ib:

20

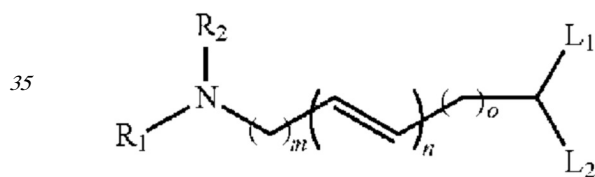


в которых, независимо для каждой отдельной группы Формулы Ia или Формулы Ib, R_1 выбран из водорода или C_1 - C_4 -алкила; R_2 выбран из линейной или разветвленной, насыщенной или ненасыщенной C_6 - C_{16} гидрокарбильной цепи, R_3 и R_4 в каждом случае независимо выбраны из C_1 - C_4 -алкила, и R_5 представляет собой водород или гидроксил, предпочтительно гидроксил. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения липидоидное соединение в соответствии с Формулой Ia и/или Ib содержит

30

группу ПЭГ.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения липидоид представляет собой соединение в соответствии с Формулой III



(Формула III)

в которой каждый из R_1 и R_2 независимо выбран из группы, состоящей из водорода, необязательно замещенного, насыщенного или ненасыщенного C_1 - C_{20} гидрокарбила и необязательно замещенного, насыщенного или ненасыщенного C_6 - C_{20} ацила; каждый из L_1 и L_2 независимо выбран из необязательно замещенных, насыщенных или ненасыщенных C_1 - C_{30} гидрокарбилов; каждый из m и o независимо выбран из группы, состоящей из нуля и любого положительного целого числа; и n представляет собой любое положительное целое число. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения каждый из R_1 , R_2 , L_1 и/или L_2 независимо представляет собой

40

45

группу ПЭГ или замещен группой ПЭГ.

Катионный пептид или полимер может представлять собой, например, олиго- или полипептид, содержащий или основанный на основных аминокислотах, выбранных из Arg, Lys, His и/или Orn. Согласно другому варианту это может быть полимер на основе мономерных блоков, которые являются аминокислотами, такой как катионный полисахарид, полиимин или полиакрилат.

Соединение нуклеиновой кислоты может быть выбрано, например, из химически модифицированной или немодифицированной ДНК, одноцепочечной или двухцепочечной ДНК, кодирующей или не кодирующей ДНК, необязательно выбрано из плазмиды, (короткого) олигодезоксинуклеотида (т.е. (короткого) ДНК-олигонуклеотида), геномной ДНК, ДНК-праймеров, ДНК-зондов, иммуностимулирующей ДНК, аптамера или любой их комбинации. Согласно другому варианту или в дополнение к нему такая молекула нуклеиновой кислоты может быть выбрана, например, из любой РНК (пептидной нуклеиновой кислоты). Согласно еще одному варианту или в дополнение к нему, а также в соответствии с особенно предпочтительным вариантом реализации нуклеиновая кислота выбрана из химически модифицированной или немодифицированной РНК, одноцепочечной или двухцепочечной РНК, кодирующей или не кодирующей РНК, необязательно выбрана из информационной РНК (иРНК), (короткого) олигорибонуклеотида (т.е. (короткого) РНК-олигонуклеотида), вирусной РНК, РНК-репликона, транспортной РНК (тРНК), рибосомной РНК (рРНК), иммуностимулирующей РНК (исРНК), микроРНК, малой интерферирующей РНК (миРНК), малой ядерной РНК (мяРНК), малой шпилечной РНК (мшРНК), или рибопереключателю, РНК-аптамера, РНК-ловушки, антисмысловой РНК, рибозима, или любой их комбинации. Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты комплекса представляет собой РНК. Более предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты комплекса представляет собой (линейную) одноцепочечную РНК, еще более предпочтительно иРНК или иммуностимулирующую РНК.

Композиция может дополнительно характеризоваться тем, что содержание липидоида в ней является относительно низким по отношению к количеству катионного пептида или полимера или к количеству нуклеиновой кислоты. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения массовое соотношение катионного пептида или полимера и соединения нуклеиновой кислоты составляет по меньшей мере приблизительно 1, и соотношение липидоида и соединения нуклеиновой кислоты не превышает приблизительно 15 нмоль/мкг. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения массовое соотношение липидоида и катионного пептида или полимера не превышает приблизительно 1:50, и/или соотношение липидоида и катионного пептида или полимера не превышает приблизительно 2 нмоль/мкг.

Согласно дополнительному аспекту настоящее изобретение относится к наночастице, содержащей катионный пептид или полимер, липидоид и соединение нуклеиновой кислоты, например, в форме комплекса.

Согласно дополнительному аспекту настоящее изобретение относится к композиции, содержащей такую наночастицу или множество таких наночастиц. Композиция может быть изготовлена, например, в виде стерильной жидкой дисперсии или в виде стерильной твердой композиции, такой как порошок или лиофилизированная форма для восстановления водным жидким носителем.

Согласно еще одному дополнительному аспекту настоящее изобретение относится к набору для получения композиции, определенной выше. Например, набор может содержать первый компонент набора, содержащий катионный пептид или полимер и/

или липидоид; и второй компонент набора, содержащий соединение нуклеиновой кислоты.

Согласно еще одному дополнительному аспекту настоящее изобретение относится к медицинскому применению композиции, наночастицы или набора в соответствии с любым из вышеуказанных аспектов. Медицинское применение может включать, например, профилактику, лечение и/или облегчение заболеваний, выбранных из раковых или опухолевых заболеваний, инфекционных заболеваний, предпочтительно (вирусных, бактериальных или протозойных) инфекционных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, аллергий или аллергических заболеваний, моногенетических заболеваний, т.е. (наследственных) заболеваний, или генетических заболеваний в целом, заболеваний, которые имеют генетическое наследственное происхождение и которые обычно вызваны дефектом определенного гена и наследуются в соответствии с законами Менделя, сердечно-сосудистых заболеваний, нейрональных заболеваний, заболеваний дыхательной системы, заболеваний пищеварительной системы, заболеваний кожи, расстройств опорно-двигательного аппарата, расстройств соединительной ткани, новообразований, иммунодефицитов, заболеваний эндокринной системы, заболеваний, связанных с питанием, и нарушений обмена веществ, заболеваний органов зрения, заболеваний органов слуха и заболеваний, связанных с дефицитом пептида или белка.

Настоящее изобретение основано на открытии того факта, что доставка биологически активных транспортируемых материалов, таких как нуклеиновые кислоты, к определенным тканям или клеткам-мишеням может быть существенно улучшена за счет применения наполнителя, который комбинирует катионный пептид или полимер и липидоид, в составе которого транспортируемый материал эффективно поглощается клетками, тогда как токсичность, которая обычно связана с липидоидом, существенно снижена.

Другие цели, аспекты, подходящие варианты реализации, варианты применения, благоприятные эффекты и преимущества настоящего изобретения будут понятны на основании подробного описания, примеров и Формулы изобретения ниже.

Краткое описание фигур

На Фигурах 1А-1С показано влияние составов полимер-липид или полимер-липидоид согласно настоящему изобретению на эффективность трансфекции в мышечных клетках линии Sol8 в условиях *in vitro*. Все эксперименты по трансфекции были выполнены с тремя повторами с использованием иРНК GpLuc (SEQ ID NO: 12) в качестве груза. Помимо этого, были включены отрицательные контроли (буфер, пассивное введение в клетку). В дополнение к реагентам для трансфекции полимер-липид или полимер-липидоид согласно настоящему изобретению для сравнения применяли полимер по отдельности, а также чистую иРНК GpLuc без использования реагентов для трансфекции (также обозначенную в настоящем документе R2851).

Аналогичным образом, на Фигурах 2А и 2В показано влияние составов полимер-липидоид согласно настоящему изобретению на эффективность трансфекции иРНК в клетках линии HepG2 в условиях *in vitro*. В частности, сравнивали катионизируемый 3-С12 и 3-С12-ОН и постоянно катионный 3-С12-ОН-cat. Для получения дополнительной информации см. пример 3.

На Фигуре 3 представлены результаты исследования высвобождения цитокина интерферона-альфа (ИФН- α) в моноклеарных клетках периферической крови человека (МКПК) в условиях *in vitro* после обработки с применением различных комплексов иРНК GpLuc с полимером-липидоидом или липидоидом. Для получения дополнительной информации см. пример 4.

На Фигуре 4 представлены результаты исследования методом сканирующей лазерной офтальмоскопии (SLO) субретиальной инъекции иРНК PpLuc (SEQ ID NO: 19) в глаза крысы через 24 ч после субретиальной инъекции составов полимер-липид или полимер-липидоид согласно настоящему изобретению, которые выражали как относительные световые единицы (RLU). Схему введения инъекций и дополнительную информацию см. в примере 5.

На Фигуре 5 представлены титры антител против белка НА (гемагглютинин), индуцированные после внутримышечной вакцинации мышей линии Balb/c (n=8) НА-иРНК (R2564, SEQ ID NO: 17) с использованием состава полимер-липидоид с НА-иРНК согласно настоящему изобретению или только «оголенной» НА-иРНК. Каждая точка представляет отдельное животное, и горизонтальные линии представляют медианные значения. Для получения дополнительной информации см. пример 6.

На Фигуре 6 представлены результаты исследования экспрессии GrLuc в клетках линии A549, трансфицированных конструкцией иРНК R2851 с применением не-CVCM/PB83 полимеров.

На Фигурах 7А и 7В представлены результаты исследования экспрессии белка GrLuc в клетках линии ВНК и дифференцированных клетках линии Sol8, трансфицированных конструкцией иРНК R2851 с применением не-CVCM/PB83 полимеров.

На Фигуре 7С представлены результаты исследования экспрессии белка PpLuc в клетках линии HeLa, трансфицированных конструкцией иРНК R2244 с применением не-CVCM/PB83 полимеров.

На Фигуре 8 представлены результаты исследования экспрессии белка GrLuc в клетках линии Нер G2, трансфицированных конструкцией иРНК R2851.

На Фигуре 9 представлены результаты исследования экспрессии белка PpLuc после инъекции в стекловидное тело.

На Фигуре 10 представлены результаты исследования экспрессии белка GrLuc в клетках линии A549, трансфицированных конструкцией иРНК R2851, изготовленной с различными композициями полимер/липид.

На Фигуре 11А и 11В представлены результаты исследования экспрессии белка GrLuc в клетках линии A549, трансфицированных конструкцией иРНК R2851, изготовленной с пегилированным липидом.

Подробное описание изобретения

Если не указано иное или если конкретный контекст не требует иного, значение всех технических терминов в настоящем документе обычно понятно специалисту в соответствующей области техники.

Если в контексте не указано или не требуется иное, то слова «содержат», «содержит» и «содержащий» и сходные выражения должны быть истолкованы в открытом и всеобъемлющем смысле как «включающий, но не ограничивающийся» в данном описании и формуле изобретения.

Выражения «один вариант реализации», «вариант реализации», «конкретный вариант реализации» и тому подобное означают, что конкретный признак, свойство или характеристика, или конкретная группа или комбинация признаков, свойств или характеристик, упоминаемые в комбинации с соответствующим выражением, присутствуют по меньшей мере в одном из вариантов реализации настоящего изобретения. Присутствие этих выражений в разных местах данного описания не обязательно относится к одному и тому же варианту реализации. Помимо этого, конкретные признаки, свойства или характеристики могут быть объединены любым подходящим способом в одном или нескольких вариантах реализации.

Формы единственного числа «a», «an» и «the» следует понимать как включающие множественные ссылки, если контекст не требует иного.

Проценты, применительно к числам, следует понимать как относительные касательно общего количества соответствующих предметов. В других случаях и если контекст не требует иного, проценты следует понимать как проценты по массе (масс. %).

Согласно первому аспекту настоящее изобретение относится к композиции, содержащей катионный пептид или полимер, катионное липидоидное соединение и соединение нуклеиновой кислоты.

Применительно к настоящему изобретению «композиция» относится к любому типу композиции, в которую могут быть включены указанные ингредиенты, необязательно вместе с любыми другими компонентами. Соответственно, композиция может представлять собой сухую композицию, такую как порошок или гранулы, или твердую единицу, такую как лиофилизированная форма или таблетка. Согласно другому варианту композиция может быть в жидкой форме, и каждый компонент может быть независимо включен в растворенной или диспергированной (например, суспендированной или эмульгированной) форме. Согласно одному из предпочтительных вариантов реализации композиция изготовлена в виде стерильной твердой композиции, такой как порошок или лиофилизированная форма для восстановления водным жидким носителем. Такой состав также является предпочтительным для тех вариантов композиции, которые содержат транспортируемую нуклеиновую кислоту, как описано более подробно ниже.

В настоящем документе термин «соединение» означает химическое вещество, которое представляет собой материал, состоящий из молекул, имеющих по существу одинаковую химическую структуру и свойства. В случае низкомолекулярного соединения молекулы обычно идентичны в отношении их атомного состава и структурной конфигурации. В случае макромолекулярного или полимерного соединения молекулы соединения очень сходны, но не все из них обязательно идентичны. Например, сегмент полимера, который обозначен как состоящий из 50 мономерных блоков, также может содержать отдельные молекулы, содержащие, например, 48 или 53 мономерных блока.

В настоящем документе пептид представляет собой соединение, содержащее множество аминокислотных мономеров, соединенных пептидными или амидными связями. В зависимости от размера пептида он также может быть назван олигопептидом или полипептидом. По существу, белок также является полипептидом.

Полимер применительно к настоящему изобретению представляет собой соединение, молекулы которого состоят из множества повторяющихся субъединиц. Полимер может быть основан на различных субъединицах, такой как сополимер.

Липидоидное соединение, также просто называемое липидоидом, представляет собой липидоподобное соединение, т.е. амфифильное соединение с липидоподобными физическими свойствами. Липидоидное соединение предпочтительно представляет собой соединение, которое содержит два или более катионных атомов азота и по меньшей мере два липофильных хвоста. В отличие от многих обычных катионных липидов липидоидное соединение может не содержать гидролизуемую соединяющую группу, в частности, соединяющие группы, содержащие гидролизуемые сложноэфирные, амидные или карбаматные группы. Катионные атомы азота липидоида могут быть катионизируемыми или постоянно катионными, или в соединении могут присутствовать оба типа катионных атомов азота.

Если из конкретного контекста не ясно другое значение, термин «катионный» означает, что соответствующая структура несет положительный заряд, либо постоянно, либо не постоянно, а в ответ на определенные условия, такие как pH. Соответственно,

термин «катионный» включает как «постоянно катионный», так и «катионируемый».

В настоящем документе термин «постоянно катионный» означает, что соответствующее соединение, либо группа или атом, положительно заряжено при любом значении pH или активности ионов водорода в его окружении. Обычно положительный заряд обусловлен присутствием четвертичного атома азота. Если соединение несет множество таких положительных зарядов, оно может называться постоянно поликатионным, что является подкатегорией постоянно катионного соединения.

В данном случае префикс «поли» относится к множеству атомов или групп, обладающих соответствующим свойством, в соединении. Если префикс «поли» заключен в скобки, то присутствие множества необязательно. Например, (поли)катионный означает катионный и/или поликатионный. Однако отсутствие префикса не следует интерпретировать как исключение множества. Например, поликатионное соединение также является катионным соединением и может упоминаться как таковое.

«Катионируемый» означает, что соединение, либо группа или атом, положительно заряжено при более низком pH и не заряжено при более высоком pH его окружения. В разных типах неводного окружения, в которых значение pH невозможно определить, катионируемое соединение, группа или атом также положительно заряжены при высокой концентрации ионов водорода и не заряжены при низкой концентрации или активности ионов водорода. Это зависит от индивидуальных свойств катионируемого или поликатионируемого соединения, в частности, pK_a соответствующей катионируемой группы или атома, при каком значении pH или концентрации ионов водорода указанное соединение заряжено или не заряжено. В разных видах разбавленного водного окружения доля катионируемых соединений, групп или атомов, несущих положительный заряд, может быть оценена с использованием так называемого уравнения Гендерсона-Гассельбаха, которое хорошо известно специалисту в данной области техники.

Например, если соединение или группа являются катионируемыми, предпочтительно они положительно заряжены при значении pH приблизительно от 1 до 9, предпочтительно от 4 до 9, от 5 до 8 или даже от 6 до 8, более предпочтительно при значении pH равном или ниже 9, равном или ниже 8, равном или ниже 7, наиболее предпочтительно при физиологических значениях pH, например, от приблизительно 7,3 до 7,4, т.е. в физиологических условиях, в частности, при физиологических солевых условиях клетки в условиях *in vivo*.

Если из конкретного контекста не ясно иное значение, «катионизированный» обычно означает, что катионируемая структура находится в состоянии, в котором она фактически несет положительный заряд, например, как в случае основной аминокислоты, такой как аргинин, в нейтральном физиологическом окружении.

«Мультимер» соединения, как в случае соединенного дисульфидными связями мультимера катионного соединения, содержащего по меньшей мере одну катионную группу R, следует понимать как соединение, содержащее по меньшей мере два блока первого соединения, мультимером которого оно является. Это не зависит от того, содержит ли первое соединение множество повторяющихся блоков или нет.

Группа SH означает сульфгидрильную группу.

Настоящее изобретение основано на открытии того факта, что комбинация липидоида с катионным пептидом или полимером является высокоэффективной при комплексообразовании и доставке нуклеиновых кислот в клетки, а также обладает неожиданной степенью переносимости. Более конкретно, авторы настоящего

изобретения обнаружили, что такая комбинация проявляет аддитивный эффект компонентов-носителей (т.е. липидоида и полимера или пептида), исходя из эффективности доставки ими груза в клетки, тогда как в отношении токсичности аддитивный эффект отсутствует или является парадоксально незначительным.

5 Предпочтительно катионный пептид или полимер позволяет значительно изменять содержание указанного пептида или полимера и тем самым довольно легко модулировать его биофизические/биохимические свойства, например, обеспечивая включение различных типов катионных или катионизируемых пептидов, белков или полимеров и необязательно добавление других компонентов, например, других
10 аминокислотных компонентов.

Также очень неожиданным является наблюдение, что даже небольшие количества липидоида, по отношению к количеству катионного пептида или полимера и/или по отношению к соединению нуклеиновой кислоты, способны улучшать клеточную доставку транспортируемой нуклеиновой кислоты без существенного увеличения
15 нежелательных эффектов или токсичности композиции. Настоящее изобретение может быть реализовано с применением всего лишь от приблизительно 0,1% до приблизительно 10% от обычного количества липидов, используемых в липоплексах или липидных наночастицах, которые были предложены для доставки, например, РНК и трансфекции клеток. Не желая быть связанными соответствием какой-либо теории, авторы
20 настоящего изобретения полагают, что такое низкое количество липидоида имело решающее значение для достижения высокой переносимости композиции согласно настоящему изобретению.

Катионный пептид или полимер может представлять собой любое постоянно катионное или катионизируемое соединение на основе мономерных блоков, которые
25 могут представлять собой аминокислоты или не являются аминокислотами. Катионный пептид или полимер, например, может быть выбран из тех катионных пептидов или полимеров, которые, как известно, способны образовывать комплексы с соединениями нуклеиновых кислот.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения катионный пептид
30 или полимер выбран из протамина, нуклеолина, олиго- или полилизина, олиго- или полиаргинина, проникающих в клетку пептидов, химерных CPP, транспортана, MPG-пептидов, ВИЧ-связывающих пептидов, Tat, Tat ВИЧ-1, пептидов, происходящих из Tat, членов семейства пенетратин, пенетратина, пептидов, происходящих из локуса Antennapedia, pAntp, pIsl, CPP, происходящих из антимикробных пептидов, буфорина-
35 2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, пептидов, происходящих из hCT, SAP, MAP, KALA, RpTG20, FGF, лактоферрина, гистонов, VP22, пептидов, происходящих из VP22, ВПГ, доменов белковой трансдукции, RpT620, богатых пролином пептидов, богатых аргинином пептидов, богатых лизином пептидов, Рер-1, пептидов кальцитонина, β -аминокислот, обратных полиамидов, поли-N-этил-4-винилпиридинбромид, полидиметиламиноэтилметилакрилата, полиамидоамина, сложного
40 полибетааминоэфира, модифицированных диамином сополимеров 1,4-бутандиолдиакрилата и 5-амино-1-пентанола, дендримеров полипропиламина, дендримеров на основе pAMAM, полииминов, полиэтиленimina, полипропиленimina, полиаллиламина, полиметобромид, 1,5-диметил-1,5-диазаундекаметилена, бромид
45 гексадиметрина, катионных полисахаридов, катионных полимеров на основе циклодекстрина, катионных полимеров на основе декстрана, хитозанов, полимеров на основе силанового остова, сополимеров PMOXA-PDMS, блок-сополимеров одного или более катионных блоков и одного или более нейтральных блоков.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения катионный пептид или полимер выбран из нативных пептидов. Нативный означает, что пептид вырабатывается в природе, т.е. живым организмом. Понятно, что нативный пептид также может быть химически синтезирован, тем не менее, это природный пептид.

5 Необязательно нативный пептид может быть химически модифицирован.

Нативный катионный пептид, выбранный для композиции согласно настоящему изобретению, например, может быть членом группы проникающих в клетки пептидов (CPR). Многие CPR имеют аминокислотный состав, который богат основными аминокислотами, такими как лизин или аргинин.

10 Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения проникающий в клетку пептид относится к группе не содержащих цистеин вариантов пептидов, происходящих из TAT (TAT означает «трансактиватор транскрипции»), таких как TAT или HIV₁-TAT, точки Tat-AIE, TAT₍₄₇₋₅₇₎, TAT₍₄₉₋₅₇₎, TAT₍₄₈₋₆₀₎, R9-TAT, Tat-GFP-Tat, Tat-GFP, 6His-TAT-Ainp1, 6His-TAT-GFP, 6xHis-TAT-SOD, TAT-гелонин, pTat, EGFP-
15 TAT, Tat-Dex, Tat-PCR, P42-TAT.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения проникающий в клетку пептид относится к группе пептидов, происходящих из локуса Antennapedia, также известных как семейство пенетратина или pAntp, такой как pAntp₄₃₋₅₈.

20 Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения проникающий в клетку пептид выбран из пептидов, происходящих из hCT, таких как hCT12-32, hCT15-32, hCT18-32, hCT21-32. Другая группа проникающих в клетку пептидов, возможно, представляющая интерес, представляет собой группу гистонов, таких как H2A или H4.

25 В соответствии с дополнительным вариантом реализации настоящего изобретения проникающий в клетку пептид представляет собой катионный CPR, полученный из антимикробного пептида, такой как буфорин-2, магаинин II, цекропин, андропин, морицин, цератотоксин, мелиттин, бомбинин, бревинин-1, эскулентины, CAP18, LL37, Bac715-24/BAC715-24, Bac1-7, Bac1-15, Bac1-17, Bac1-24,, Bac5-24, Bac7-24, Bac9-24,
30 Bac11-24, Bac13-24, Bac15-24, SynB1, SynB3, SynB5, дермасептин S4, абекин, апидекин, профенин или индолицидин.

Необязательно CPR является членом семейства транспортеров, не содержащим цистеин.

35 Необязательно CPR представляет собой химерный или синтетически модифицированный пептид, такой как член семейства пептидов MPG, такой как MPG-NLS, EGFP-MPG, MPG α , MPG β ; или биотинил-пенетратин, PAF26, PAF95, PAF96, CRGDK, P28, пептид RALA, RTAT-ELPBC, GST-(HE) 12EFG5-TAT, FabRev1-Tat, G3R6TAT, MAP, Pep-1, ppTG, ppTG1, ppTG20, EGFP-ppTG20; или MPG, KLA-TAT₍₄₇₋₅₇₎ или TatLK15.

40 В соответствии с другим вариантом реализации настоящего изобретения катионный пептид или полимер относится к группе, состоящей из синтетических пептидов или олиго-или полиаминокислот, которые, как известно, не встречаются в природе. Предпочтительными синтетическими пептидами являются соединения, содержащие от 2 до приблизительно 50 остатков аминокислот или более предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 30 остатков аминокислот, которые богаты
45 основными аминокислотами, такими как аргинин, лизин, гистидин и/или орнитин. Предпочтительно по меньшей мере приблизительно 50% остатков аминокислот катионного пептида представлены основными аминокислотами.

Необязательно катионный пептид полностью или преимущественно состоит из одной

конкретной основной аминокислоты, такой как, например, сегмент, содержащий от приблизительно 5 до приблизительно 30 остатков Arg, Lys, His или Orn, например:

Arg₅, Arg₆, Arg₇, Arg₈, Arg₉, Arg₁₀, Arg₁₁, Arg₁₂, Arg₁₃, Arg₁₄, Arg₁₅₋₃₀; Lys₅, Lys₆, Lys₇, Lys₈, Lys₉, Lys₁₀, Lys₁₁, Lys₁₂, Lys₁₃, Lys и, Lys₁₅₋₃₀; His₅, His₆, His₇, His₈, His₉, His₁₀, His₁₁,
 5 His₁₂, His₁₃, His₁₄, His₁₅₋₃₀; или Orn₅ Orn₆ Orn₇, Orn₈, Orn₉, Orn₁₀, Orn₁₁, Orn₁₂, Orn₁₃, Orn₁₄, Orn₁₅₋₃₀.

Другие подходящие пептиды состоят из двух или более разных основных аминокислот, как описано в примерах ниже, которые предназначены для ссылки на
 10 состав последовательности, без указания конкретного порядка, в котором встречаются остатки аминокислот:

Arg₍₄₋₂₉₎Lys₁, Arg₍₄₋₂₉₎His₁, Arg₍₄₋₂₉₎Orn₁, Lys₍₄₋₂₉₎His₁, Lys₍₄₋₂₉₎Orn₁, His₍₄₋₂₉₎Orn₁, Arg
 (3-28)Lys₂, Arg(3-28)His₂, Arg(3-28)Orn₂, Lys(3-28)His₂, Lys(3-28)Orn₂, His(3-28)Orn₂, Arg(2-27)Lys₃,
 15 Arg(2-27)His₃, Arg(2-27)Orn₃, Lys(2-27)His₃, Lys(2-27)Orn₃, His(2-27)Orn₃, Arg(1-26)Lys₄, Arg(1-
 26)His₄, Arg(1-26)Orn₄, Lys(1-26)His₄, Lys(1-26)Orn₄, His(1-26)Orn₄, Arg(3-28)Lys₁His₁, Arg(3-
 28)Lys₁Orn₁, Arg(3-28)His₁Orn₁, Arg₁Lys(3-28)His₁, Arg₁Lys(3-28)Orn₁, Lys(3-28)His₁Orn₁,
 Arg₁Lys₁His(3-28), Arg₁His(3-28)Orn₁, Lys₁His(3-28)Orn₁;

Arg(2-27)Lys₂His₁, Arg(2-27)Lys₁His₂, Arg(2-27)Lys₂Orn₁, Arg(2-27)Lys₁Orn₂, Arg(2-27)His₂Orn₁,
 20 Arg(2-27)His₁Orn₂, Arg₂Lys(2-27)His₁, Arg₁Lys(2-27)His₂, Arg₂Lys(2-27)Orn₁, Arg₁Lys(2-27)Orn₂,
 Lys(2-27)His₂Orn₁, Lys(2-27)His₁Orn₂, Arg₂Lys₁His(2-27), Arg₁Lys₂His(2-27), Arg₂His(2-27)Orn₁,
 Arg₁His(2-27)Orn₂, Lys₂His(2-27)Orn₁, Lys₁His(2-27)Orn₂;

Arg(1-26)Lys₃His₁, Arg(1-26)Lys₂His₂, Arg(1-26)Lys₁His₃, Arg(1-26)Lys₃Orn₁, Arg(1-
 25 26)Lys₂Orn₂, Arg(1-26)Lys₁Orn₃, Arg(1-26)His₃Orn₁, Arg(1-26)His₂Orn₂, Arg(1-26)His₁Orn₃, Arg₃Lys
 (1-26)His₁, Arg₂Lys(1-26)His₂, Arg₁Lys(1-26)His₃, Arg₃Lys(1-26)Orn₁, Arg₂Lys(1-26)Orn₂, Arg₁Lys
 (1-26)Orn₃, Lys(1-26)His₃Orn₁, Lys(1-26)His₂Orn₂, Lys(1-26)His₁Orn₃, Arg₃Lys₁His(1-26),
 Arg₂Lys₂His(1-26), Arg₁Lys₃His(1-26), Arg₃His(1-26)Orn₁, Arg₂His(1-26)Orn₂, Arg₁His(1-26)Orn₃,
 30 Lys₃His(1-26)Orn₁, Lys₂His(1-26)Orn₂, Lys₁His(1-26)Orn₃;

Arg(2-27)Lys₁His₁Orn₁, Arg₁Lys(2-27)His₁Orn₁, Arg₁Lys₁His(2-27)Orn₁, Arg₁Lys₁His₁Orn(2-
 27);

Arg(1-26)Lys₂His₁Orn₁, Arg(1-26)Lys₁His₂Orn₁, Arg(1-26)Lys₁His₁Orn₂, Arg₂Lys(1-26)His₁Orn₁,
 35 Arg₁Lys(1-26)His₂Orn₁, Arg₁Lys(1-26)His₁Orn₂, Arg₂Lys₁His(1-26)Orn₁, Arg₁Lys₂His(1-26)Orn₁,
 Arg₁Lys₁His(1-26)Orn₂, Arg₂Lys₁His₁Orn(1-26), Arg₁Lys₂His₁Orn(1-26), Arg₁Lys₁His₂Orn(1-26).

Также подходящим может быть включение в катионный пептид одного или более остатков гидрофильных аминокислот вместе с основными аминокислотами. Среди
 40 гидрофильных аминокислот, подходящих для этой цели, предпочтительными являются аминокислоты с незаряженной полярной боковой цепью, в частности, Thr, Ser, Asn и/или Gin. Включение таких аминокислот или последовательностей, богатых этими аминокислотами, обеспечивает более гибкое связывание с транспортируемой нуклеиновой кислотой. Это может привести к более эффективному уплотнению транспортируемой нуклеиновой кислоты и, следовательно, к лучшей защите от нуклеаз
 45 и нежелательного разуплотнения. Это также позволяет обеспечить носитель, который проявляет уменьшенный катионный заряд во всем носителе, и, в данном случае, лучше регулировать связывающие свойства, если это является желательным или необходимым.

Примеры неполных последовательностей, подходящих для включения в катионный

пептид, включают следующие: Ser-Thr, Thr-Ser, Ser-Ser, Thr-Thr, Ser-Thr-Ser, Thr-Ser-Thr, Ser-Ser-Ser, Thr-Thr-Thr, Ser-Thr-Ser-Thr, Thr-Ser-Thr-Ser, Ser-Ser-Ser-Ser, Thr-Thr-Thr-Thr, Gln-Asn, Asn-Gln, Gln-Gln, Asn-Asn, Gln-Asn-Gln, Asn-Gln-Asn, Gln-Gln-Gln, Asn-Asn-Asn, Gln-Asn-Gln-Asn, Asn-Gln-Asn-Gln, Gln-Gln-Gln-Gln, Asn-Asn-Asn-Asn, Ser-Asn, Asn-Ser, Ser-Ser, Asn-Asn, Ser-Asn-Ser, Asn-Ser-Asn, Ser-Ser-Ser, Asn-Asn-Asn, Ser-Asn-Ser-Asn, Asn-Ser-Asn-Ser, Ser-Ser-Ser-Ser или Asn-Asn-Asn-Asn и т.д. Такие последовательности могут повторяться, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 или даже более раз, или могут быть комбинированы друг с другом подходящим образом.

Необязательно последовательность, богатая гидрофильными аминокислотами, может содержать по меньшей мере один пролин, который может выполнять функцию разрушителя структуры более длинных последовательностей из Ser, Thr и Asn. Два, три или более остатков пролина также могут быть включены, в частности, в более длинные последовательности.

Помимо этого, подходящим может быть включение в катионный пептид одной или более липофильных аминокислот, в частности, Leu, Val, Ile, Ala и/или Met. Такие липофильные аминокислоты могут участвовать в образовании комплекса при комбинировании катионного пептида с транспортируемой нуклеиновой кислотой.

Применение липофильных аминокислот обеспечивает более сильное уплотнение нуклеиновой кислоты. Это может быть обусловлено специфическими взаимодействиями липофильных аминокислот и транспортируемой нуклеиновой кислоты, которые обеспечивают дополнительную устойчивость комплекса, образованного носителем (ями) и грузом. Стабилизация может быть сходна с нековалентной ассоциацией или перекрестной сшивкой цепей полимера. Этот тип взаимодействия обычно является сильным и обеспечивает значительный эффект, в частности, в водном окружении.

Примеры подходящих последовательностей включают Leu-Val, Val-Leu, Leu-Leu, Val-Val, Leu-Val-Leu, Val-Leu-Val, Leu-Leu-Leu, Val-Val-Val, Leu-Val-Leu-Val, Val-Leu-Val-Leu, Leu-Leu-Leu-Leu, Val-Val-Val-Val, Ile-Ala, Ala-Ile, Ile-Ile, Ala-Ala, Ile-Ala-Ile, Ala-Ile-Ala, Ile-Ile-Ile, Ala-Ala-Ala, Ile-Ala-Ile-Ala, Ala-Ile-Ala-Ile, Ile-Ile-Ile-Ile, Ala-Ala-Ala-Ala, Met-Ala, Ala-Met, Met-Met, Ala-Ala, Met-Ala-Met, Ala-Met-Ala, Met-Met-Met, Ala-Ala-Ala, Met-Ala-Met-Ala, Ala-Met-Ala-Met или Met-Met-Met-Met и т.д. Такие последовательности могут повторяться, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 или более раз, или могут быть комбинированы друг с другом. Необязательно последовательность, богатая липофильными аминокислотами, может содержать по меньшей мере один пролин, который может выполнять функцию разрушителя структуры более длинных последовательностей из Leu, Val, Ile, Ala и/или Met. Два, три или более остатков пролина также могут быть включены, в частности, в более длинные последовательности.

Свойства катионного пептида могут быть дополнительно модулированы путем включения в его последовательность ненативной аминокислоты или путем химической модификации пептида. Например, могут быть введены конкретные химические группы. Такие группы могут быть выбраны так, чтобы обеспечить присоединение дополнительных компонентов или лигандов, например, за счет образования амида (например, с помощью реакции с карбоновыми кислотами, сульфоновыми кислотами, аминами и т.д.), за счет присоединения по Михаэлю (например, с использованием малеинимидных групп, α,β -ненасыщенных карбониллов и т.д.), за счет клик-химии (например, с использованием азидов или алкинов), за счет реакций обмена алкена/алкина (например, с использованием алкенов или алкинов), за счет образования имида или гидразона (с использованием альдегидов или кетонов, гидразинов, гидроксилминов, аминов), за счет реакций комплексообразования (с использованием авидина, биотина,

белка G или тому подобного) или компонентов, которые обеспечивают протекание реакций замещения Sn-типа (например, с использованием галогеналканов, тиолов, спиртов, аминов, гидразинов, гидразидов, сложных эфиров сульфоновой кислоты, солей оксифосфония), или других химических групп, которые можно применять при присоединении других компонентов.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения катионный пептид или полимер выбран из природных, синтетических или полусинтетических полимеров. Предпочтительно полимер имеет молекулярную массу от приблизительно 0,5 кДа до приблизительно 20 кДа, например, от приблизительно 0,5 кДа до приблизительно 11,5 кДа, или от приблизительно 1 кДа до приблизительно 10 кДа, или от приблизительно 0,1 кДа до приблизительно 8 кДа, или от приблизительно 0,1 кДа до приблизительно 6 кДа, или от приблизительно 0,1 кДа до приблизительно 5 кДа, или от приблизительно 0,5 кДа до приблизительно 5 кДа, или от приблизительно 0,3 кДа до приблизительно 20 кДа, или от приблизительно 0,3 кДа до приблизительно 10 кДа, или от приблизительно 0,4 кДа до приблизительно 10 кДа, или от приблизительно 0,5 кДа до приблизительно 10 кДа, или от приблизительно 0,5 кДа до приблизительно 7,5 кДа, или от приблизительно 0,5 кДа до приблизительно 4 кДа, или от приблизительно 0,5 кДа до приблизительно 3 кДа, или от приблизительно 0,67 кДа до приблизительно 2,7 кДа, соответственно.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения катионный полимер представляет собой необязательно модифицированный полиакрилат, хитозан, полиэтиленмин, полиамин, сложные полиаминоэфиры или полиамидоамин или любой их сополимер.

Конкретные предпочтительные катионные полимеры включают, например, модифицированные полиаминокислоты, такие как полимеры β -аминокислот или обратные полиамиды; модифицированные полиэтилены, такие как поли-N-этил-4-винилпиридинбромид (PEVP) и т.д.; модифицированные акрилаты, такие как полидиметиламиноэтилметилакрилат (pDMAEMA) и т.д.; модифицированные амидоамины, такие как полиамидоамин (pAMAM) и т.д.; модифицированный сложный полибетааминоэфир (PBAE), такой как сополимеры 1,4-бутандиолдиакрилата и 5-амино-1-пентанола, модифицированные на концах диамином, и т.д.; дендримеры, такие как дендримеры полипропиламина или дендримеры на основе pAMAM и т.д.; полиимин (ы), такой как полиэтиленмин (ПЭИ или пЭИ), полипропиленмин и т.д.; полиаллиламин, полиметобромид 1,5-диметил-1,5-диазаундекаметилена или бромид гексаметрина.

Также предпочтительными являются катионные полисахариды, т.е. полимеры на основе сахарного остова, такие как полимеры на основе циклодекстрина, полимеры на основе декстрана, хитозан и т.д.; полимеры на основе силанового остова, такие как сополимеры PMOXA-PDMS и т.д.; а также блок-полимеры, состоящие из комбинации одного или более катионных блоков (например, выбранных из катионного полимера, упомянутого выше) и одного или более гидрофильных или гидрофобных блоков (например, полиэтиленгликоля).

Согласно одному из предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения катионный пептид или полимер представляет собой катионное соединение, содержащее по меньшей мере одну катионную группу R, имеющую по меньшей мере одну группу -SH, способную образовывать дисульфидную связь, или ее дисульфидсоединенный мультимер, причем группа R представляет собой либо полимерную группу, имеющую молекулярную массу от приблизительно 0,5 кДа до

приблизительно 30 кДа, либо пептидную группу, содержащую от приблизительно 3 до приблизительно 100 аминокислот, при этом по меньшей мере 10% от общего количества аминокислот в пептидной группе представляют собой основные аминокислоты, выбранные из аргинина (Arg), лизина (Lys), гистидина (His) и/или орнитина (Orn).

5 Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения катионная группа Р катионного соединения представляет собой пептидную группу, состоящую из 3-100 аминокислот, при этом по меньшей мере 10% от общего количества аминокислот пептидной группы представляют собой основные аминокислоты, выбранные из Arg, Lys, His и/или Orn. Примеры таких пептидов раскрыты, например, в WO 2012/013326,
10 содержание которого полностью включено в настоящий документ.

В данном случае «основная аминокислота» представляет собой аминокислоту, которая катионизирована в физиологическом окружении, или, более точно, большинство молекул которой имеют суммарный положительный заряд при относительно нейтральном рН, таком как физиологическое значение рН внеклеточных жидкостей
15 организма. Это относится к Arg, Lys, His и Orn.

В том случае, если Р представляет собой пептидную группу, «дисульфидсоединенный мультимер» Р означает пептид или белок, полученный в результате образования по меньшей мере одной дисульфидной связи между по меньшей мере двумя молекулами пептида Р. Например, две молекулы пептида Р могут быть соединены одной
20 дисульфидной связью, например, с образованием более длинной пептидной цепи; или они могут быть соединены двумя дисульфидными связями, например, с образованием циклического пептида, более длинной пептидной цепи или еще одной структуры, в зависимости от положения групп SH, которые участвуют в образовании дисульфидной связи. Дисульфидсоединенный мультимер более чем двух пептидов Р также может
25 иметь различные формы, в зависимости от природы Р и образовавшейся дисульфидной связи. Если композиция содержит два или более разных пептидов Р, мультимеры могут быть получены в результате образования дисульфидных связей между одинаковыми или разными молекулами.

Предпочтительно пептидная группа, выбранная в качестве группы Р, содержит от
30 приблизительно 3 до приблизительно 50 аминокислот и более предпочтительно от приблизительно 7 до приблизительно 30 аминокислот или от приблизительно 3 до приблизительно 25 аминокислот. Также предпочтительными являются длины в пределах диапазона от приблизительно 3 до приблизительно 20 аминокислот или от приблизительно 5 до приблизительно 20 аминокислот, или от приблизительно 7 до
35 приблизительно 30 аминокислот, или от приблизительно 6 до приблизительно 18 аминокислот, или от приблизительно 7 до приблизительно 17 аминокислот, например, от приблизительно 5 до приблизительно 15 аминокислот.

Обычно пептидная группа, выбранная в качестве группы Р, имеет молекулярную массу, которая находится в пределах диапазона от приблизительно 0,3 кДа до
40 приблизительно 50 кДа, в частности, от приблизительно 0,5 кДа до приблизительно 30 кДа, или от приблизительно 0,6 кДа до приблизительно 10 кДа, или от приблизительно 0,8 кДа до приблизительно 5 кДа, например, от приблизительно 1 кДа до приблизительно 3 кДа.

Группа (ы) SH в такой пептидной группе может быть обеспечена за счет химической
45 модификации любого из остатков аминокислот в пептидной последовательности, представляющей Р, путем включения структурного блока, который не является аминокислотой, но который содержит сульфгидрильную группу, и/или одной или более аминокислот, содержащих такую группу SH, таких как цистеин (Cys). Согласно одному

из предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна из групп SH пептидной группы, представляющей Р, обеспечена остатком Cys.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по существу все группы -SH группы Р обеспечены остатками Cys. Например, Р может содержать одну группу -SH, которая обеспечена остатком Cys, или может содержать две группы SH, обе из которых обеспечены остатками Cys.

Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения группа Р представляет собой пептидную группу, состоящую из 7-30 аминокислот, и в котором по меньшей мере одна группа -SH обеспечена остатком Cys. Также

предпочтительными в этом варианте реализации являются пептидные группы, содержащие одну или две группы SH, причем каждая из этих групп SH обеспечена остатками Cys. Помимо этого, такая пептидная группа может иметь две концевые области, например, как в случае линейной пептидной последовательности, и остаток Cys может быть расположен в одной из концевых областей или вблизи нее. Также предпочтительной является такая пептидная группа, имеющий две концевые области и по меньшей мере два остатка Cys, причем по меньшей мере один из остатков Cys расположен в каждой из концевых областей или вблизи них.

Содержание основных аминокислот в пептидной группе, выбранной в качестве Р, составляет по меньшей мере 10% от общего количества аминокислот пептидной последовательности и предпочтительно выше, например, по меньшей мере приблизительно 20%, или по меньшей мере приблизительно 30%, или по меньшей мере приблизительно 40%, или по меньшей мере приблизительно 50%, или по меньшей мере приблизительно 60%, или по меньшей мере приблизительно 70%, соответственно.

Содержание основных аминокислот также может быть выбрано с учетом длины пептида, принимая во внимание, что пептид обычно также требует включения по меньшей мере одного и более предпочтительно по меньшей мере двух остатков, имеющих группу -SH, которая способна образовывать дисульфидную связь, таких как остатки цистеина или других аминокислот, модифицированных так, чтобы иметь группу SH. Согласно одному из предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения количество основных аминокислот в пептиде в 2-5 раз меньше общего количества аминокислот в пептиде, в частности в 2-4 раза меньше общего количества аминокислот, например, в 2 или 3 раза меньше общего количества аминокислот в Р. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения пептид состоит из 2 остатков Cys и остальные аминокислоты являются только основными.

Пептидная группа, выбранная в качестве Р, может содержать центральную последовательность, которая происходит из известных пептидов или белков, которые богаты основными аминокислотами. В данном случае «происходящий» означает, что Р может содержать дополнительные аминокислоты, которые не присутствуют в известном пептиде, из которого он происходит, такие как те, которые необходимы для его способности образовывать дисульфидные связи, например, Cys. Примеры таких известных пептидов, богатых основными аминокислотами, включают протамин, нуклеолин, спермин или спермидин, олиго- или поли-L-лизин (PLL), основные полипептиды, олиго- или полиаргинин, проникающие в клетки пептиды (CPP), химерные CPP, такие как транспортан, или пептиды MPG, пептиды, связывающие ВИЧ, Tat, Tat ВИЧ-1 (ВИЧ), пептиды, происходящие из Tat, членов семейства пенетративных, например, пенетратин, пептиды, происходящие из локуса Antennapedia (в частности, из Antennapedia Drosophila), pAntp, pIsl и т.д. CPP, происходящие из антимикробных пептидов, например, буфорин-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, пептиды, происходящие из hCT, SAR, PpTG20,

FGF, лактоферрин, гистоны, пептиды, происходящие из VP22 или аналогичные пептиды, ВПГ, VP22 (Herpes simplex), MAP, KALA или домены белковой трансдукции (PTD), РpT620, богатые пролином пептиды, богатые аргинином пептиды, богатые лизином пептиды, Рер-1, L-олигомеры, пептид (ы) кальцитонина.

Согласно некоторым из предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения пептидная группа, выбранная в качестве Р, содержит центральную последовательность, которая полностью или преимущественно состоит из одной конкретной основной аминокислоты, например, сегмент, содержащий от приблизительно 5 до приблизительно 30 Arg, Lys, His или Orn, например:

Arg₅, Arge, Arg₇, Arg₈, Arg₉, Arg₁₀, Arg₁₁, Arg₁₂, Arg₁₃, Arg₁₄, Arg₁₅₋₃₀; Lys₅, Lys₆, Lys₇, Lys₈, Lys₉, Lys₁₀, Lys₁₁, Lys₁₂, Lys₁₃, Lys₁₄, Lys₁₅₋₃₀; His₅, His₆, His₇, His₈, His₉, His₁₀, His₁₁, His₁₂, His₁₃, His₁₄, His₁₅₋₃₀; или Orn₅, Orn₆, Orn₇, Orn₈, Orn₉, Orn₁₀, Orn₁₁, Orn₁₂, Orn₁₃, Orn₁₄, Orn₁₅₋₃₀.

Выражение «центральная последовательность» означает, что одна или более дополнительных аминокислот могут присутствовать в пептиде за пределами соответствующей центральной последовательности, в частности, аминокислоты, имеющие группу SH, такие как остатки цистеина. Другие подходящие центральные последовательности состоят из двух или более различных основных аминокислот, как в примерах ниже, которые предназначены для ссылки на состав последовательности, без указания конкретного порядка, в котором встречаются аминокислоты:

Arg₍₄₋₂₉₎Lys₁, Arg₍₄₋₂₉₎His₁, Arg₍₄₋₂₉₎Orn₁, Lys₍₄₋₂₉₎His₁, Lys₍₄₋₂₉₎Orn₁, His₍₄₋₂₉₎Orn₁, Arg₍₃₋₂₈₎Lys₂, Arg₍₃₋₂₈₎His₂, Arg₍₃₋₂₈₎Orn₂, Lys₍₃₋₂₈₎His₂, Lys₍₃₋₂₈₎Orn₂, His₍₃₋₂₈₎Orn₂, Arg₍₂₋₂₇₎Lys₃, Arg₍₂₋₂₇₎His₃, Arg₍₂₋₂₇₎Orn₃, Lys₍₂₋₂₇₎His₃, Lys₍₂₋₂₇₎Orn₃, His₍₂₋₂₇₎Orn₃, Arg₍₁₋₂₆₎Lys₄, Arg₍₁₋₂₆₎His₄, Arg₍₁₋₂₆₎Orn₄, Lys₍₁₋₂₆₎His₄, Lys₍₁₋₂₆₎Orn₄, His₍₁₋₂₆₎Orn₄, Arg₍₃₋₂₈₎Lys₁His₁, Arg₍₃₋₂₈₎Lys₁Orn₁, Arg₍₃₋₂₈₎His₁Orn₁, Arg₁Lys₍₃₋₂₈₎His₁, Arg₁Lys₍₃₋₂₈₎Orn₁, Lys₍₃₋₂₈₎His₁Orn₁, Arg₁Lys₁His₍₃₋₂₈₎, Arg₁His₍₃₋₂₈₎Orn₁, Lys₁His₍₃₋₂₈₎Orn₁;

Arg₍₂₋₂₇₎Lys₂His₁, Arg₍₂₋₂₇₎Lys₁His₂, Arg₍₂₋₂₇₎Lys₂Orn₁, Arg₍₂₋₂₇₎Lys₁Orn₂, Arg₍₂₋₂₇₎His₂Orn₁, Arg₍₂₋₂₇₎His₁Orn₂, Arg₂Lys₍₂₋₂₇₎His₁, Arg₁Lys₍₂₋₂₇₎His₂, Arg₂Lys₍₂₋₂₇₎Orn₁, Arg₁Lys₍₂₋₂₇₎Orn₂, Lys₍₂₋₂₇₎His₂Orn₁, Lys₍₂₋₂₇₎His₁Orn₂, Arg₂Lys₁His₍₂₋₂₇₎, Arg₁Lys₂His₍₂₋₂₇₎, Arg₂His₍₂₋₂₇₎Orn₁, Arg₁His₍₂₋₂₇₎Orn₂, Lys₂His₍₂₋₂₇₎Orn₁, Lys₁His₍₂₋₂₇₎Orn₂;

Arg₍₁₋₂₆₎Lys₃His₁, Arg₍₁₋₂₆₎Lys₂His₂, Arg₍₁₋₂₆₎Lys₁His₃, Arg₍₁₋₂₆₎Lys₃Orn₁, Arg₍₁₋₂₆₎Lys₂Orn₂, Arg₍₁₋₂₆₎Lys₁Orn₃, Arg₍₁₋₂₆₎His₃Orn₁, Arg₍₁₋₂₆₎His₂Orn₂, Arg₍₁₋₂₆₎His₁Orn₃, Arg₃Lys₍₁₋₂₆₎His₁, Arg₂Lys₍₁₋₂₆₎His₂, Arg₁Lys₍₁₋₂₆₎His₃, Arg₃Lys₍₁₋₂₆₎Orn₁, Arg₂Lys₍₁₋₂₆₎Orn₂, Arg₁Lys₍₁₋₂₆₎Orn₃, Lys₍₁₋₂₆₎His₃Orn₁, Lys₍₁₋₂₆₎His₂Orn₂, Lys₍₁₋₂₆₎His₁Orn₃, Arg₃Lys₁His₍₁₋₂₆₎, Arg₂Lys₂His₍₁₋₂₆₎, Arg₁Lys₃His₍₁₋₂₆₎, Arg₃His₍₁₋₂₆₎Orn₁, Arg₂His₍₁₋₂₆₎Orn₂, Arg₁His₍₁₋₂₆₎Orn₃, Lys₃His₍₁₋₂₆₎Orn₁, Lys₂His₍₁₋₂₆₎Orn₂, Lys₁His₍₁₋₂₆₎Orn₃;

Arg₍₂₋₂₇₎Lys₁His₁Orn₁, Arg₁Lys₍₂₋₂₇₎His₁Orn₁, Arg₁Lys₁His₍₂₋₂₇₎Orn₁, Arg₁Lys₁His₁Orn₍₂₋₂₇₎;

Arg₍₁₋₂₆₎Lys₂His₁Orn₁, Arg₍₁₋₂₆₎Lys₁His₂Orn₁, Arg₍₁₋₂₆₎Lys₁His₁Orn₂, Arg₂Lys₍₁₋₂₆₎His₁Orn₁, Arg₁Lys₍₁₋₂₆₎His₂Orn₁, Arg₁Lys₍₁₋₂₆₎His₁Orn₂, Arg₂Lys₁His₍₁₋₂₆₎Orn₁, Arg₁Lys₂His₍₁₋₂₆₎Orn₁, Arg₁Lys₁His₍₁₋₂₆₎Orn₂, Arg₂Lys₁His₁Orn₍₁₋₂₆₎, Arg₁Lys₂His₁Orn₍₁₋₂₆₎, Arg₁Lys₁His₂Orn₍₁₋₂₆₎.

Как уже упоминалось, такие центральные последовательности, а также полная пептидная последовательность такой пептидной группы Р дополнительно содержат

по меньшей мере одну группу -SH, способную образовывать дисульфидную связь. Cys является одной из предпочтительных групп в пептиде, который несет такую группу -SH. Соответственно, центральные последовательности, представленные выше, предпочтительно являются частью пептидной группы, которая дополнительно содержит по меньшей мере один Cys, такой как один или два Cys, причем один или два остатка Cys расположены в одной из концевых областей или в каждой концевой области пептида, соответственно. Такие особенно предпочтительные последовательности, выбранные в качестве группы Р, включают следующие:

Последовательности с одним концевым остатком Cys: CysArg₅, CysArg₆, CysArg₇, CysArg₈, CysArg₉, CysArg₁₀, CysArg₁₁, CysArg₁₂, CysArg₁₃, CysArg₁₄, CysArg₁₅, CysArg₁₆, CysArg₁₇, CysArg₁₈, CysArg₁₉, CysArg₂₀, CysArg₂₁₋₃₀; CysLys₅, CysLys₆, CysLys₇, CysLys₈, CysLys₉, CysLys₁₀, CysLys₁₁, CysLys₁₂, CysLys₁₃, CysLys₁₄, CysLys₁₅, CysLys₁₆, CysLys₁₇, CysLys₁₈, CysLys₁₉, CysLys₂₀, CysLys₂₁₋₃₀; CysHis₅, CysHis₆, CysHis₇, CysHis₈, CysHis₉, CysHis₁₀, CysHis₁₁, CysHis₁₂, CysHis₁₃, CysHis₁₄, CysHis₁₅, CysHis₁₆, CysHis₁₇, CysHis₁₈, CysHis₁₉, CysHis₂₀, CysHis₂₁₋₃₀; CysOrn₅, CysOrn₆, CysOrn₇, CysOrn₈, CysOrn₉, CysOrn₁₀, CysOrn₁₁, CysOrn₁₂, CysOrn₁₃, CysOrn₁₄, CysOrn₁₅, CysOrn₁₆, CysOrn₁₇, CysOrn₁₈, CysOrn₁₉, CysOrn₂₀, CysOrn₂₁₋₃₀.

Последовательности с двумя концевыми остатками Cys: CysArg₅Cys, CysArg₆Cys, CysArg₇Cys, CysArg₈Cys, CysArg₉Cys, CysArg₁₀Cys, CysArg₁₁Cys, CysArg₁₂Cys, CysArg₁₃Cys, CysArg₁₄Cys, CysArg₁₅Cys, CysArg₁₆Cys, CysArg₁₇Cys, CysArg₁₈Cys, CysArg₁₉Cys, CysArg₂₀Cys, CysArg₂₁₋₃₀Cys; CysLys₅Cys, CysLys₆Cys, CysLys₇Cys, CysLys₈Cys, CysLys₉Cys, CysLys₁₀Cys, CysLys₁₁Cys, CysLys₁₂Cys, CysLys₁₃Cys, CysLys₁₄Cys, CysLys₁₅Cys, CysLys₁₆Cys, CysLys₁₇Cys, CysLys₁₈Cys, CysLys₁₉Cys, CysLys₂₀Cys, CysLys₂₁₋₃₀Cys; CysHis₅Cys, CysHis₆Cys, CysHis₇Cys, CysHis₈Cys, CysHis₉Cys, CysHis₁₀Cys, CysHis₁₁Cys, CysHis₁₂Cys, CysHis₁₃Cys, CysHis₁₄Cys, CysHis₁₅Cys, CysHis₁₆Cys, CysHis₁₇Cys, CysHis₁₈Cys, CysHis₁₉Cys, CysHis₂₀Cys, CysHis₂₁₋₃₀Cys; CysOrn₅Cys, CysOrn₆Cys, CysOrn₇Cys, CysOrn₈Cys, CysOrn₉Cys, CysOrn₁₀Cys, CysOrn₁₁Cys, CysOrn₁₂Cys, CysOrn₁₃Cys, CysOrn₁₄Cys, CysOrn₁₅Cys, CysOrn₁₆Cys, CysOrn₁₇Cys, CysOrn₁₈Cys, CysOrn₁₉Cys, CysOrn₂₀Cys, CysOrn₂₁₋₃₀Cys.

Понятно, что в объем настоящего изобретения также включены два или более различных катионных соединений с разными пептидными группами, которые описаны выше, выбранными в качестве Р в композиции, или комбинирование пептидной группы Р с соединением Формулы I, как описано ниже.

Помимо этого, композиция может содержать катионную пептидную группу Р в комбинации с одним или более другими пептидами, которые не включены в определение Р, но которые могут быть подходящими для модуляции физических, химических или биологических свойств системы носителя или комплекса, который образуется при комбинировании композиции согласно настоящему изобретению с транспортируемым материалом, таким как нуклеиновая кислота. Другие пептидные последовательности, которые не включены в определение Р, могут быть либо частью катионного соединения, содержащего группу Р или ее дисульфидосоединенный мультимер, либо они могут быть включены в виде отдельных соединений в композицию согласно настоящему изобретению. Предпочтительно такие отдельные соединения также содержат одну или более групп SH, таких как группы, способные образовывать дисульфидную связь с

катионным соединением, содержащим катионную группу R.

Например, подходящим может быть включение пептидов, содержащих одну или более ароматических аминокислот, таких как Trp, Tyr или Phe. Понятно, что ароматические аминокислоты также могут быть включены в саму группу R. Согласно другому варианту такие ароматические аминокислоты могут быть включены в композицию в форме других пептидов, которые, однако, содержат одну или более групп SH, например, для придания способности образовывать дисульфидную связь с другим компонентом, таким как катионное соединение, содержащее катионную группу R. Таким способом ароматические аминокислоты также будут участвовать в комплексе, образованном при комбинировании композиции носителя с транспортируемой нуклеиновой кислотой.

Включение ароматических аминокислот обеспечивает дополнительное связывание носителя с транспортируемой нуклеиновой кислотой за счет взаимодействий ароматических структур аминокислоты (аминокислот) с основаниями нуклеиновой кислоты, которые могут способствовать образованию более стабильного комплекса. Это связывание отличается от взаимодействия катионных или катионизированных групп с фосфатным остовом нуклеиновой кислоты. Взаимодействие между ароматическими аминокислотами и основаниями нуклеиновой кислоты может происходить, например, за счет интеркаляций или связывания с малой или большой бороздками. Носитель не склонен к разуплотнению анионными партнерами по комплексообразованию (например, гепарином, гиалуроновой кислотой), которые обнаружены преимущественно во внеклеточном матриксе в условиях *in vivo*, и также менее подвержен воздействию соли.

Согласно некоторым конкретным вариантам реализации настоящего изобретения композиция содержит один или более пептидов, содержащих центральную последовательность, которая богата или по существу состоит из ароматических аминокислот. Ароматические аминокислоты в таком пептиде могут быть идентичными или могут отличаться друг от друга. Центральная последовательность предпочтительно фланкирована одним или более предпочтительно двумя группами, содержащими группу -SH, такими как Cys, которые придают способность образовывать дисульфидные связи.

Примеры подходящих центральных последовательностей включают Trp-Tyr, Tyr-Trp, Trp-Trp, Tyr-Tyr, Trp-Tyr-Trp, Tyr-Trp-Tyr, Trp-Trp-Trp, Tyr-Tyr-Tyr, Trp-Tyr-Trp-Tyr, Tyr-Trp-Tyr-Trp, Trp-Trp-Trp-Trp, Phe-Tyr, Tyr-Phe, Phe-Phe, Phe-Tyr-Phe, Tyr-Phe-Tyr, Phe-Phe-Phe, Phe-Tyr-Phe-Tyr, Tyr-Phe-Tyr-Phe, Phe-Phe-Phe-Phe, Phe-Trp, Trp-Phe, Phe-Phe, Phe-Trp-Phe, Trp-Phe-Trp, Phe-Trp-Phe-Trp, Trp-Phe-Trp-Phe, Tyr-Tyr-Tyr-Tyr, и т.д. Такие последовательности могут повторяться 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 или даже более раз. Их также можно комбинировать друг с другом подходящим образом.

Примеры полных пептидных последовательностей, которые также содержат концевые остатки Cys, включают, например:

Cys-Tyr, Cys-Trp, Cys-Trp-Tyr, Cys-Tyr-Trp, Cys-Trp-Trp, Cys-Tyr-Tyr, Cys-Trp-Tyr-Trp, Cys-Tyr-Trp-Tyr, Cys-Trp-Trp-Trp, Cys-Tyr-Tyr-Tyr, Cys-Trp-Tyr-Trp-Tyr, Cys-Tyr-Trp-Tyr-Trp, Cys-Trp-Trp-Trp-Trp, Cys-Tyr-Tyr-Tyr-Tyr, Cys-Phe, Cys-Phe-Tyr, Cys-Tyr-Phe, Cys-Phe-Phe, Cys-Tyr-Tyr, Cys-Phe-Tyr-Phe, Cys-Tyr-Phe-Tyr, Cys-Phe-Phe-Phe, Cys-Tyr-Tyr-Tyr, Cys-Phe-Tyr-Phe-Tyr, Cys-Tyr-Phe-Tyr-Phe, или Cys-Phe-Phe-Phe-Phe, Cys-Phe-Trp, Cys-Trp-Phe, Cys-Phe-Phe, Cys-Phe-Trp-Phe, Cys-Trp-Phe-Trp, Cys-Phe-Trp-Phe-Trp, Cys-Trp-Phe-Trp-Phe; Cys-Tyr-Cys, Cys-Trp-Cys, Cys-Trp-Tyr-Cys, Cys-Tyr-Trp-Cys, Cys-Trp-Trp-Cys, Cys-Tyr-Tyr-Cys, Cys-Trp-Tyr-Trp-Cys, Cys-Tyr-Trp-Tyr-Cys, Cys-Trp-Trp-Trp-Cys, Cys-Tyr-Tyr-Tyr-Cys, Cys-Trp-Tyr-Trp-Tyr-Cys, Cys-Tyr-Trp-Tyr-Trp-Cys, Cys-Trp-Trp-Trp-Trp-Cys, Cys-Tyr-

Tyr-Tyr-Tyr-Cys, Cys-Phe-Cys, Cys-Phe-Tyr-Cys, Cys-Tyr-Phe-Cys, Cys-Phe-Phe-Cys, Cys-Tyr-Tyr-Cys, Cys-Phe-Tyr-Phe-Cys, Cys-Tyr-Phe-Tyr-Cys, Cys-Phe-Phe-Phe-Cys, Cys-Tyr-Tyr-Tyr-Cys, Cys-Phe-Tyr-Phe-Tyr-Cys, Cys-Tyr-Phe-Tyr-Phe-Cys, или Cys-Phe-Phe-Phe-Phe-Cys, Cys-Phe-Trp-Cys, Cys-Trp-Phe-Cys, Cys-Phe-Phe-Cys, Cys-Phe-Trp-Phe-Cys, Cys-Trp-Phe-Trp-Cys, Cys-Phe-Trp-Phe-Trp-Cys, Cys-Trp-Phe-Trp-Phe-Cys и т.д. Каждый Cys также может быть заменен модифицированной аминокислотой или химическим соединением, несущим свободную группу SH. Также можно применять пептид, который представляет собой комбинации или повторы последовательностей, в частности, последовательностей с двумя концевыми остатками Cys, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 или даже более раз.

Помимо этого, такой пептид, богатый ароматическими аминокислотами, может содержать по меньшей мере один пролин, который может выполнять функцию разрушителя структуры более длинных последовательностей из Trp, Tyr и Phe. В зависимости от длины последовательности ароматических аминокислот предпочтительным может быть включение двух, трех или более остатков пролина.

Также подходящим может быть включение в композицию согласно настоящему изобретению пептида, содержащего одну или более гидрофильных аминокислот, вместе с катионным соединением, содержащим пептидную группу R. Понятно, что гидрофильные аминокислоты также могут быть включены в саму пептидную группу R. Согласно другому варианту такие аминокислоты могут быть включены в композицию в форме других пептидов, которые, аналогично упомянутому выше, также содержат одну или более групп -SH или дисульфидных связей, и могут быть способны участвовать в образовании комплекса при комбинировании композиции носителя с транспортируемой нуклеиновой кислотой так, чтобы модифицировать свойства комплекса.

Среди гидрофильных аминокислот, подходящих для этой цели, предпочтительными являются аминокислоты с незаряженной полярной боковой цепью, в частности, Thr, Ser, Asn и/или Gln. Включение таких аминокислот или последовательностей, богатых такими аминокислотами, обеспечивает более гибкое связывание с транспортируемой нуклеиновой кислотой. Это может привести к более эффективному уплотнению транспортируемой нуклеиновой кислоты и, следовательно, к лучшей защите от нуклеаз и нежелательного разуплотнения. Это также обеспечивает носитель, который проявляет уменьшенный катионный заряд во всем носителе, что в данном случае позволяет лучше регулировать связывающие свойства, если это является желательным или необходимым.

Примеры подходящих центральных последовательностей включают последовательности, основанные на идентичных или различных гидрофильных аминокислотах, такие как следующие: Ser-Thr, Thr-Ser, Ser-Ser, Thr-Thr, Ser-Thr-Ser, Thr-Ser-Thr, Ser-Ser-Ser, Thr-Thr-Thr, Ser-Thr-Ser-Thr, Thr-Ser-Thr-Ser, Ser-Ser-Ser-Ser, Thr-Thr-Thr-Thr, Gln-Asn, Asn-Gln, Gln-Gln, Asn-Asn, Gln-Asn-Gln, Asn-Gln-Asn, Gln-Gln-Gln, Asn-Asn-Asn, Gln-Asn-Gln-Asn, Asn-Gln-Asn-Gln, Gln-Gln-Gln-Gln, Asn-Asn-Asn-Asn, Ser-Asn, Asn-Ser, Ser-Ser, Asn-Asn, Ser-Asn-Ser, Asn-Ser-Asn, Ser-Ser-Ser, Asn-Asn-Asn, Ser-Asn-Ser-Asn, Asn-Ser-Asn-Ser, Ser-Ser-Ser-Ser или Asn-Asn-Asn-Asn и т.д. Аналогично вышеуказанному, такие последовательности могут повторяться, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 или даже более раз, или могут быть комбинированы друг с другом подходящим образом. Помимо этого, центральная последовательность предпочтительно фланкирована одним или двумя остатками, содержащими группу SH или образующими дисульфидную связь, такими как Cys, которые придают способность образовывать дисульфидные связи.

Примерами полных пептидных последовательностей, которые также включают такие концевые остатки Cys, являются Cys-Thr-Cys, Cys-Ser-Cys, Cys-Ser-Thr-Cys, Cys-Thr-Ser-Cys, Cys-Ser-Ser-Cys, Cys-Thr-Thr-Cys, Cys-Ser-Thr-Ser-Cys, Cys-Thr-Ser-Thr-Cys, Cys-Ser-Ser-Ser-Cys, Cys-Thr-Thr-Thr-Cys, Cys-Ser-Thr-Ser-Thr-Cys, Cys-Thr-Ser-Thr-Ser-Cys, Cys-Ser-Ser-Ser-Ser-Cys, Cys-Thr-Thr-Thr-Thr-Cys, Cys-Asn-Cys, Cys-Gln-Cys, Cys-Gln-Asn-Cys, Cys-Asn-Gln-Cys, Cys-Gln-Gln-Cys, Cys-Asn-Asn-Cys, Cys-Gln-Asn-Gln-Cys, Cys-Asn-Gln-Asn-Cys, Cys-Gln-Gln-Gln-Cys, Cys-Asn-Asn-Asn-Cys, Cys-Gln-Asn-Gln-Asn-Cys, Cys-Asn-Gln-Asn-Gln-Cys, Cys-Gln-Gln-Gln-Gln-Cys, Cys-Asn-Asn-Asn-Asn-Cys, Cys-Asn-Cys, Cys-Ser-Cys, Cys-Ser-Asn-Cys, Cys-Asn-Ser-Cys, Cys-Ser-Ser-Cys, Cys-Asn-Asn-Cys, Cys-Ser-Asn-Ser-Cys, Cys-Asn-Ser-Asn-Cys, Cys-Ser-Ser-Ser-Cys, Cys-Asn-Asn-Asn-Cys, Cys-Ser-Asn-Ser-Asn-Cys, Cys-Asn-Ser-Asn-Ser-Cys, Cys-Ser-Ser-Ser-Ser-Cys или Cys-Asn-Asn-Asn-Asn-Cys и т.д. Каждый Cys также может быть заменен модифицированной аминокислотой или химическим соединением, несущим свободную группу -SH или атом серы, участвующий в образовании дисульфидной связи. Последовательности могут повторяться, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 или даже более раз, или могут быть комбинированы друг с другом.

Необязательно последовательность, богатая гидрофильными аминокислотами, может содержать по меньшей мере один пролин, который может выполнять функцию разрушителя структуры более длинных последовательностей из Ser, Thr и Asn. Также могут быть включены два, три или более остатков пролина, в частности, в более длинные последовательности.

Также подходящим может быть включение в композицию согласно настоящему изобретению пептида, содержащего одну или более липофильных аминокислот, вместе с катионным соединением, содержащим пептидную группу Р, в частности, Leu, Val, Ile, Ala и/или Met. Такие липофильные аминокислоты также могут быть включены в саму пептидную группу Р. Согласно другому варианту они могут быть включены в композицию в форме других пептидов, которые, аналогично вышеуказанному, также содержат одну или более групп -SH или дисульфидных связей, и которые могут участвовать в образовании комплекса при комбинировании композиции носителя с транспортируемой нуклеиновой кислотой.

Применение липофильных аминокислот обеспечивает более сильное уплотнение нуклеиновой кислоты. Это может быть обусловлено специфическими взаимодействиями липофильных аминокислот и транспортируемой нуклеиновой кислоты, которые обеспечивают дополнительную устойчивость комплекса, образованного носителем (ями) и грузом. Стабилизация может быть сходна с нековалентной ассоциацией или перекрестной сшивкой цепей полимера. Этот тип взаимодействия обычно является сильным и обеспечивает значительный эффект, в частности, в водном окружении.

Примеры подходящих центральных последовательностей включают последовательности, основанные на идентичных или различных липофильных аминокислотах, такие как Leu-Val, Val-Leu, Leu-Leu, Val-Val, Leu-Val-Leu, Val-Leu-Val, Leu-Leu-Leu, Val-Val-Val, Leu-Val-Leu-Val, Val-Leu-Val-Leu, Leu-Leu-Leu-Leu, Val-Val-Val-Val, Ile-Ala, Ala-Ile, Ile-Ile, Ala-Ala, Ile-Ala-Ile, Ala-Ile-Ala, Ile-Ile-Ile, Ala-Ala-Ala, Ile-Ala-Ile-Ala, Ala-Ile-Ala-Ile, Ile-Ile-Ile-Ile, Ala-Ala-Ala-Ala, Met-Ala, Ala-Met, Met-Met, Ala-Ala, Met-Ala-Met, Ala-Met-Ala, Met-Met-Met, Ala-Ala-Ala, Met-Ala-Met-Ala, Ala-Met-Ala-Met или Met-Met-Met-Met и т.д. Такие последовательности могут повторяться, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 или более раз, или могут быть комбинированы друг с другом. Помимо этого, центральная последовательность предпочтительно фланкирована одним или двумя остатками, содержащими группу -SH или атом серы,

участвующий в образовании дисульфидной связи, такими как Cys.

Примерами полных пептидных последовательностей, которые также включают такие концевые остатки Cys, являются Cys-Val-Cys, Cys-Leu-Cys, Cys-Leu-Val-Cys, Cys-Val-Leu-Cys, Cys-Leu-Leu-Cys, Cys-Val-Val-Cys, Cys - Leu- Val-Leu- Cys, Cys-Val-Leu-Val-Cys, Cys-Leu-Leu-Leu-Cys, Cys-Val-Val-Val-Cys, Cys-Leu-Val-Leu-Val-Cys, Cys-Val-Leu-Val-Leu-Cys, Cys-Leu-Leu-Leu-Leu-Cys, Cys-Val-Val-Val-Val-Cys, Cys-Ala-Cys, Cys-Ile-Cys, Cys-Ile-Ala-Cys, Cys-Ala-Ile-Cys, Cys-Ile-Ile-Cys, Cys-Ala-Ala-Cys, Cys-Ile-Ala-Ile-Cys, Cys-Ala-Ile-Ala-Cys, Cys-Ile-Ile-Ile-Cys, Cys-Ala-Ala-Ala-Cys, Cys-Ile-Ala-Ile-Ala-Cys, Cys-Ala-Ile-Ala-Ile-Cys, Cys-Ile-Ile-Ile-Ile-Cys, или Cys-Ala-Ala-Ala-Ala-Cys, Cys-Met-Cys, Cys-Met-Ala-Cys, Cys-Ala-Met-Cys, Cys-Met-Met-Cys, Cys-Ala-Ala-Cys, Cys-Met-Ala-Met-Cys, Cys-Ala-Met-Ala-Cys, Cys-Met-Met-Met-Cys, Cys-Ala-Ala-Ala-Cys, Cys-Met-Ala-Met-Ala-Cys, Cys-Ala-Met-Ala-Met-Cys, Cys-Met-Met-Met-Met-Cys или Cys-Ala-Ala-Ala-Ala-Cys и т.д. Каждый Cys также может быть заменен модифицированной аминокислотой или химическим соединением, несущим свободную группу -SH или участвующим в образовании дисульфидной связи, происходящей из такой группы -SH. Такие последовательности могут повторяться, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 или более раз, или могут быть комбинированы друг с другом.

Необязательно последовательность, богатая липофильными аминокислотами, может содержать по меньшей мере один пролин, который может выполнять функцию разрушителя структуры более длинных последовательностей из Leu, Val, Ile, Ala и/или Met. Два, три или более остатков пролина также могут быть включены, в частности, в более длинные последовательности.

Необязательно пептидная группа Р может содержать функциональную пептидную последовательность. Согласно другому варианту или в дополнение функциональный пептид может быть включен в композицию согласно настоящему изобретению вместе с катионным соединением, содержащим пептидную группу Р, необязательно после модификации для включения одной или более групп -SH или атомов серы, участвующих в образовании дисульфидной связи. Согласно другому варианту такая функциональная пептидная последовательность также может быть присоединена к другому компоненту носителя, такому как пептид Р, за счет кислотно-лабильной связи, предпочтительно посредством боковой цепи компонента носителя, которая позволяет отделять или высвобождать функциональную пептидную последовательность при более низких значениях рН, например, при физиологических значениях рН.

Функциональный пептид или пептидная последовательность может представлять собой или может происходить из сигнального пептида или сигнальной последовательности, сигнала или последовательности локализации, сигнала или последовательности ядерной локализации (NLS), антитела, проникающего в клетки пептида (например, ТАТ) и т.д.

В данном случае сигнальный пептид, сигнал или последовательность локализации или сигнал или последовательность ядерной локализации (NLS) может применяться для направления комплекса носитель-груз к конкретным целевым клеткам (например, гепатоцитам или антиген-презентирующим клеткам) или субклеточным структурам, и может обеспечивать перенос к конкретной мишени, например, в клетку, в ядро, в эндосомальный компартмент, митохондриальный матрикс, плазматическую мембрану, аппарат Гольджи, ядро, цитоплазму и цитоскелет, эндоплазматический ретикулум и т.д. Сигнальную последовательность или сигнал ядерной локализации можно применять для транспортировки любой из нуклеиновых кислот, определенных в настоящем документе, в частности, РНК или ДНК, более предпочтительно мшРНК или пДНК,

например, в ядро. Последовательность ядерной локализации может включать, например, KDEL, DDEL, DEEL, QEDL, RDEL, GQNLSTSN, PKKKRKV, PQKKIKS, QPKKP, RKKR, RKRRRQRRRAHQ, RQARRNRRRRWRERQR, MPLTRRRPAASQALAPPTP, GAALTILV или GAALTLLG. Примером последовательности локализации для эндосомального компартмента является MDDQRDLISNNEQLP. Примером последовательности локализации для митохондриального матрикса является MLFNLRXXLNNAAFRHGHN FMVRNFRCGQPLX. Последовательности локализации для плазматической мембраны включают, например, GCVCSSNP, GQTVTTPL, GQELSQHE, GNPSYNP, GVSGSKGQ, GQTITTPPL, GQTLTTPL, GQIFSRSA, GQIHGLSP, GARASVLS и GCTLSAEE.

Последовательности локализации для эндоплазматического ретикулума и ядра включают GAQVSSQK и GAQLSRNT. Последовательности локализации для аппарата Гольджи, ядра, цитоплазмы и цитоскелета включают GNAAAACK. Последовательности локализации для цитоплазмы и цитоскелета включают GNEASYPL. Последовательности локализации для плазматической мембраны и цитоскелета включают GSSKSKPK.

Примеры секреторных сигнальных пептидных последовательностей включают классические или неклассические последовательности ГКГС (например, сигнальные последовательности молекул ГКГС I и II, например, молекулы HLA-A*0201 ГКГС класса I). Подходящие пептиды также могут включать сигнальные последовательности цитокинов или иммуноглобулинов, такие как сигнальные последовательности инвариантной цепи иммуноглобулинов или антител; сигнальные последовательности Lamp1, тапасина, Erp57, кальретикулина, кальнексина, других ассоциированных с мембраной белков или белков, ассоциированных с эндоплазматическим ретикулумом (ER) или эндосомально-лизосомальным компартментом. Особенно предпочтительными являются сигнальные последовательности молекулы HLA-A*0201 ГКГС класса I.

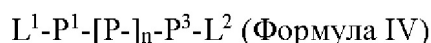
Свойства пептидной группы Р могут быть дополнительно модулированы путем включения в ее последовательность ненативной аминокислоты или путем химической модификации пептида. Например, могут быть введены конкретные химические группы. Такие группы могут быть выбраны так, чтобы обеспечить присоединение дополнительных компонентов или лигандов, например, за счет образования амида (например, с помощью реакции с карбоновыми кислотами, сульфоновыми кислотами, аминами и т.д.), за счет присоединения по Михаэлю (например, с использованием малеинимидных групп, α,β -ненасыщенных карбониллов и т.д.), за счет клик-химии (например, с использованием азидов или алкинов), за счет реакции обмена алкена/алкина (например, с использованием алкенов или алкинов), за счет образования имида или гидразона (с использованием альдегидов или кетонов, гидразинов, гидроксиламинов, аминов), за счет реакций комплексообразования (с использованием авидина, биотина, белка G или тому подобного) или компонентов, которые обеспечивают протекание реакций замещения Sn-типа (например, с использованием галогеналканов, тиолов, спиртов, аминов, гидразинов, гидразидов, сложных эфиров сульфоновой кислоты, солей оксифосфония), или других химических групп, которые можно применять при присоединении других компонентов.

Одним из конкретных преимуществ композиции согласно настоящему изобретению, содержащей катионное соединение с пептидной группой Р, является то, что такая пептидная группа может быть легко сконструирована и адаптирована к конкретным потребностям, связанным с конкретной терапевтической целью или применением. Например, количество положительного заряда, которое требуется для образования комплекса с конкретным грузом, таким как конструкция нуклеиновой кислоты, может быть оптимизировано путем изменения содержания основных аминокислот в пептидной

последовательности. В то же время длину пептида можно изменять для оптимизации его биоразлагаемости и переносимости.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что пептидные молекулы легко образуют дисульфидные связи друг с другом в условиях, которые также обеспечивают образование комплекса с транспортируемой нуклеиновой кислотой. При некоторых условиях *in vivo*, например, в обычном цитозольном окружении, в котором присутствует, например, цитозольный GSH, дисульфидные связи восстанавливаются, что приводит к образованию меньших пептидных блоков, которые легко метаболизируются большинством клеток, сначала в небольшие олигопептиды и в конечном итоге в аминокислоты. Не было обнаружено значительных токсических эффектов даже для более крупных олигопептидов, описанных выше.

Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения катионное соединение, содержащее группу Р, представляет собой соединение в соответствии с Формулой IV



в которой Р определен выше, т.е. Р представляет собой либо полимерную группу, имеющую молекулярную массу от приблизительно 0,5 кДа до приблизительно 30 кДа, либо пептидную группу, состоящую из 3-100 аминокислот, причем по меньшей мере 10% от общего количества аминокислот пептидной группы представляют собой

основные аминокислоты, выбранные из Arg, Lys, His и/или Orn. Р³ является необязательным. Р¹ и Р³ (если присутствуют) выбраны независимо, причем каждый из них представляет собой линейную или разветвленную гидрофильную полимерную цепь, выбранную из полиэтиленгликоля (ПЭГ), поли-N-(2-гидроксипропил)метакриламида, поли-2-(метакрилоилокси)этилфосфорилхолинов, полигидроксиалкил-L-аспарагина, поли-2-(метакрилоилокси)этилфосфорилхолина, гидроксиэтил крахмал а или полигидроксиалкил-L-глутамина, при этом полимерная цепь имеет молекулярную массу от приблизительно 1 кДа до приблизительно 100 кДа, и при этом каждый из Р¹ и Р³

соединен с группой Р дисульфидной связью. L¹ и L² представляют собой необязательные лиганды и независимо выбраны из RGD, пептида RGD, трансферрина, фолата, сигнального пептида или сигнальной последовательности, сигнала или последовательности локализации, сигнала или последовательности ядерной локализации (NLS), антитела, проникающего в клетки пептида, такого как WEAKLAKALAKALAK HLAALAKALKACEA, TAT, лиганда рецептора, цитокина, гормона, фактора роста, малой молекулы, углевода, маннозы, галактозы, N-ацетилгалактозамина, синтетического лиганда, низкомолекулярного агониста, ингибитора или антагониста рецептора или аналога RGD-содержащего пептидомиметика.

Помимо этого, n в Формуле IV представляет собой целое число, выбранное в диапазоне от 1 до приблизительно 50, и предпочтительно в диапазоне от 2, 3, 4 или 5 до приблизительно 10, или от 2, 3 или 4 до приблизительно 9, такое как 6 или 7; при условии, что если n больше 1, каждая группа Р соединена с другой группой Р дисульфидной связью. Также предпочтительно n выбрано из диапазона от 2 до приблизительно 20 или от приблизительно 4 до приблизительно 10, например, приблизительно 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

Любые ссылки на необязательный сегмент L₁, L₂ или Р₃ следует интерпретировать как применимые к необязательным вариантам реализации, в которых присутствует соответствующий сегмент.

Как следует из Формулы IV, соответствующие катионные соединения содержат дисульфидные связи по меньшей мере между компонентами или группами P , P^1 и P^3 , соответственно, и необязательно дополнительные дисульфидные связи в группе P и/или между P^1 и L^1 , и/или P^3 и L^3 . Дисульфидные связи происходят из групп $-SH$, которые могут происходить из таких остатков как Cys, или из химически модифицированных аминокислот, или из других остатков, которые несут группу $-SH$ в своей восстановленной форме.

Необязательно в соединении также могут присутствовать одна или более дополнительных групп $-SH$ или дисульфидных связей для того чтобы присоединить дополнительные компоненты, такие как аминокислотный компонент, например, антигенные эпитопы, антигены, антитела, проникающие в клетки пептиды (например, ТАТ), лиганды и т.д.

Дополнительные примеры соединений в соответствии с Формулой II и способы их получения раскрыты, например, в WO 2011/026641, содержание которого полностью включено в настоящий документ.

Преимущество применения соединения в соответствии с Формулой IV для реализации настоящего изобретения заключается в высокой универсальности. Помимо этого вариант реализации, основанный на Формуле II, позволяет определять длину полимерной цепи и комбинировать желательные свойства различных коротких полимеров в одном полимере, например, для эффективной упаковки нуклеиновых кислот для эффективной трансфекции нуклеиновых кислот для целей генной терапии или других вариантов терапевтического применения без потери активности, в частности, эффективной трансфекции нуклеиновой кислоты в различные клеточные линии в условиях *in vitro*, а также трансфекции в условиях *in vivo*. Молекула носителя также нетоксична для клеток и обеспечивает эффективное высвобождение своей транспортируемой нуклеиновой кислоты. В итоге она проявляет улучшенную устойчивость к агрегации благодаря обратимому добавлению гидрофильных полимерных цепей (например, ПЭГ), в частности, к концевым областям молекулы, что дополнительно придает повышенную стабильность транспортируемой нуклеиновой кислоте по отношению к средам, содержащим сыворотку, и предотвращает распознавание комплекса полимерный носитель-груз иммунной системой или другие нежелательные взаимодействия с компонентами сыворотки. «Покрытие», обеспечиваемое сегментами P^1 и P^3 , легко удаляется в восстанавливающих условиях цитозоля клетки. Также этот эффект способствует высвобождению транспортируемой нуклеиновой кислоты в цитозоле.

Как определено выше, лиганды L^1 и L^2 необязательно могут содержаться в соединении в соответствии с Формулой IV. Их можно применять, например, для направления груза, такого как нуклеиновая кислота в составе комплекса, в конкретные клетки. Они могут быть выбраны независимо друг от друга. Примеры потенциально подходящих лигандов включают RGD, трансферрин, фолат, сигнальный пептид или сигнальную последовательность, сигнал или последовательность локализации, сигнал или последовательность ядерной локализации (NLS), антитело, проникающий в клетки пептид (например, ТАТ), лиганд рецептора (например, цитокины, гормоны, факторы роста и т.д.), малые молекулы (например, углеводы, такие как манноза или галактоза, или синтетические лиганды), низкомолекулярные агонисты, ингибиторы или антагонисты рецепторов (например, аналоги RGD-содержащих пептидомиметиков) и т.д.

Некоторые из предпочтительных лигандов включают WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA (также называемый KALA) и N-

ацетилгалактозамин (GalNac). В данном случае манноза также является предпочтительной в качестве лиганда для нацеливания на антиген-презентирующие клетки, которые несут рецепторы маннозы на своих клеточных мембранах. Согласно дополнительному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения галактозу можно применять в качестве необязательного лиганда для нацеливания на гепатоциты.

Такие лиганды L^1 и L^2 могут быть присоединены к компоненту P^1 и/или P^3 за счет обратимых дисульфидных связей или за счет любого другого возможного химического присоединения, например, путем связывания 3-тиопропионовой кислоты или 2-иминотиолана (реагент Траута), за счет образования амидов (например, с использованием карбоновых кислот, сульфоновых кислот, аминов и т.д.), за счет присоединения по Михаэлю (например, с использованием малеинимидных групп, ненасыщенных карбониллов и т.д.), за счет клик-химии (например, с использованием азидов или алкинов), за счет реакций обмена алкена/алкина (например, с использованием алкенов или алкинов), за счет образования имина или гидразона (с использованием альдегидов или кетонов, гидразинов, гидроксиламинов, аминов), за счет реакций комплексообразования (с использованием авидина, биотина, белка G) или компонентов, которые обеспечивают реакции замещения S_n -типа (например, с использованием галогеналканов, тиолов, спиртов, аминов, гидразинов, гидразидов, сложных эфиров сульфоновой кислоты, солей оксифосфония) или других химических групп, которые можно применять для присоединения дополнительных компонентов.

Как определено выше, компоненты P^1 и P^3 выбраны независимо, и каждый из них представляет собой линейную или разветвленную гидрофильную полимерную цепь, содержащую по меньшей мере один атом серы, который участвует в образовании дисульфидной связи с компонентом P. Полимерная цепь каждого из P^1 и P^3 независимо выбрана из полиэтиленгликоля (ПЭГ), поли-N-(2-гидроксипропил)метакриламида, поли-2-(метакрилоилокси)этилфосфорилхолинов, полигидроксиалкил-L-аспарагина, поли-2-(метакрилоилокси)этилфосфорилхолина, гидроксиэтилкрахмала или полигидроксиалкил-L-глутамина. Каждый из P^1 и P^3 имеет молекулярную массу от приблизительно 1 кДа до приблизительно 100 кДа.

Молекулярная масса полимерной цепи P^1 и/или P^3 предпочтительно составляет от приблизительно 1 кДа до приблизительно 75 кДа или от приблизительно 5 кДа до приблизительно 50 кДа, еще более предпочтительно от приблизительно 5 кДа до приблизительно 25 кДа. В соответствии с другим предпочтительным вариантом реализации P^1 и/или P^3 представляет собой необязательно модифицированную цепь полиэтиленгликоля с массой от приблизительно 5 кДа до приблизительно 25 кДа.

Атомы серы, обеспечивающие образование дисульфидных связей, могут быть обеспечены для каждой из гидрофильных полимерных цепей P^1 и P^3 с помощью внутреннего остатка цистеина или любой другой (модифицированной) аминокислоты или группы, которая несет группу -SH в своей восстановленной форме и до включения в соединение Формулы IV.

Согласно другому варианту гидрофильные полимерные цепи P^1 и/или P^3 могут происходить из полимеров, модифицированных группой -SH, предпочтительно за счет химической реакции с соединением, несущим группу -SH, так, что каждый из гидрофильных полимеров P^1 и P^3 несет по меньшей мере одну такую группу -SH перед

включением в соединение Формулы IV. Такое соединение, несущее группу -SH, может представлять собой, например, (дополнительный) цистеин или любую дополнительную (модифицированную) аминокислоту, которая несет группу -SH.

Такое соединение также может представлять собой любое неаминное соединение или группу, которые содержат или позволяют вводить группу -SH в гидрофильные полимерные цепи P^1 и P^3 . Такие неаминные соединения могут быть присоединены к P^1 и/или P^3 за счет химических реакций или связывания соединений, например, за счет связывания 3-тиопропионовой кислоты или тиоимолана (реагента Траута), за счет образования амидов (например, с использованием карбоновых кислот, сульфоновых кислот, аминов и т.д.), за счет присоединения по Михаэлю (например, с использованием малеинимидных групп, ненасыщенных карбониллов и т.д.), за счет клик-химии (например, с использованием азидов или алкинов), за счет реакций обмена алкена/алкина (например, с использованием алкенов или алкинов), за счет образования имида или гидразона (с использованием альдегидов или кетонов, гидразинов, гидроксиламинов, аминов), за счет реакций комплексообразования (с использованием авидина, биотина, белка G) или компонентов, которые обеспечивают реакции замещения Sn-типа (например, с использованием галогеналканов, тиолов, спиртов, аминов, гидразинов, гидразидов, сложных эфиров сульфоновой кислоты, солей оксифосфония) или других химических групп, которые можно применять для присоединения других компонентов. Особенно предпочтительным производным ПЭГ в данном случае является альфа-метокси-омега-меркаптополиэтиленгликоль. В каждом случае атом серы, который участвует в образовании дисульфидной связи, например, цистеина или любой другой (модифицированной) аминокислоты или соединения, может присутствовать в концевых областях или внутри в любом положении P^1 и P^3 . Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения каждый из P^1 и P^3 содержит по меньшей мере одну дисульфидную связь в одной концевой области и по меньшей мере одну дополнительную группу SH или дисульфидную связь, которую можно применять для дополнительного присоединения дополнительных компонентов, как определено в настоящем документе, например, лиганда, аминокислотного компонента $(AA)_x$, антител, проникающих в клетку пептидов (например, ТАТ) и т.д.

В соответствии с дополнительным предпочтительным вариантом реализации настоящего изобретения каждая из гидрофильных полимерных цепей P^1 и P^3 также может содержать по меньшей мере одну дополнительную функциональную группу, которая обеспечивает присоединение дополнительных компонентов, определенных в настоящем документе, например, лиганда, аминокислотного компонента $(AA)_x$ и т.д., например, за счет образования амидов (например, с использованием карбоновых кислот, сульфоновых кислот, аминов и т.д.), за счет присоединения по Михаэлю (например, с использованием малеинимидных групп, ненасыщенных карбониллов и т.д.), за счет клик-химии (например, с использованием азидов или алкинов), за счет реакций обмена алкена/алкина (например, с использованием алкенов или алкинов), за счет образования имида или гидразона (с использованием альдегидов или кетонов, гидразинов, гидроксил аминов, аминов), за счет реакций комплексообразования (с использованием авидина, биотина, белка G) или компонентов, которые обеспечивают реакции замещения Sn-типа (например, с использованием галогеналканов, тиолов, спиртов, аминов, гидразинов, гидразидов, сложных эфиров сульфоновой кислоты, солей оксифосфония), или других химических групп, которые можно применять для присоединения дополнительных

компонентов.

Как определено выше, Р в соединении Формулы IV представляет собой полимерную группу, имеющую молекулярную массу от приблизительно 0,5 кДа до приблизительно 30 кДа, или пептидную группу, состоящую из 3-100 аминокислот, причем по меньшей мере 10% от общего количества аминокислот пептидной группы представляют собой основные аминокислоты, выбранные из Arg, Lys, His и/или Orn. Если Р представляет собой пептидную группу, то применимы аналогичные предпочтительные параметры, которые были описаны выше для Р в целом; предпочтительные параметры, относящиеся к группам -SH, также следует применять к дисульфидным связям в соединении Формулы II, которые происходят из таких групп -SH.

Например, пептидная группа, выбранная в качестве Р в соединении Формулы IV, предпочтительно содержит от приблизительно 3 до приблизительно 50 аминокислот и более предпочтительно от приблизительно 7 до приблизительно 30 аминокислот или от приблизительно 3 до приблизительно 25 аминокислот в длину. Также предпочтительными являются длины, которые находятся в пределах диапазона от приблизительно 3 до приблизительно 20 аминокислот или от приблизительно 5 до приблизительно 20 аминокислот, или от приблизительно 7 до приблизительно 30 аминокислот, или от приблизительно 6 до приблизительно 18 аминокислот, или от приблизительно 7 до приблизительно 17 аминокислот, например, от приблизительно 5 до приблизительно 15 аминокислот. Также предпочтительно пептидная группа Р в Формуле II имеет молекулярную массу, которая находится в пределах диапазона от приблизительно 0,3 кДа до приблизительно 50 кДа, в частности, от приблизительно 0,5 кДа до приблизительно 30 кДа, или от приблизительно 0,6 кДа до приблизительно 10 кДа, или от приблизительно 0,8 кДа до приблизительно 5 кДа, например, от приблизительно 1 кДа до приблизительно 3 кДа.

Помимо этого, содержание основных аминокислот в пептидной группе, выбранной в качестве Р в Формуле IV, составляет по меньшей мере 10% от общего количества аминокислот пептидной последовательности и предпочтительно выше, например, по меньшей мере приблизительно 20%, или по меньшей мере приблизительно 30%, или по меньшей мере приблизительно 40%, или по меньшей мере приблизительно 50%, или по меньшей мере приблизительно 60%, или по меньшей мере приблизительно 70%, соответственно.

Согласно некоторым из предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения пептидная группа, выбранная в качестве Р в соединении Формулы IV, содержит центральную последовательность, которая полностью или преимущественно состоит из одной конкретной основной аминокислоты, например, сегмент, содержащий от приблизительно 5 до приблизительно 30 Arg, Lys, His или Orn, и может быть фланкирована одним или двумя концевыми остатками Cys. Примеры таких предпочтительных вариантов пептидных групп Р в Формуле IV включают:

Последовательности Р с одним концевым остатком Cys: CysArg₅, CysArg₆, CysArg₇, CysArg₈, CysArg₉, CysArg₁₀, CysArg₁₁, CysArg₁₂, CysArg₁₃, CysArg₁₄, CysArg₁₅, CysArg₁₆, CysArg₁₇, CysArg₁₈, CysArg₁₉, CysArg₂₀, CysArg₂₁₋₃₀; CysLys₅, CysLys₆, CysLys₇, CysLys₈, CysLys₉, CysLys₁₀, CysLys₁₁, CysLys₁₂, CysLys₁₃, CysLys₁₄, CysLys₁₅, CysLys₁₆, CysLys₁₇, CysLys₁₈, CysLys₁₉, CysLys₂₀, CysLys₂₁₋₃₀; CysHis₅, CysHis₆, CysHis₇, CysHis₈, CysHis₉, CysHis₁₀, CysHis₁₁, CysHis₁₂, CysHis₁₃, CysHis₁₄, CysHis₁₅, CysHis₁₆, CysHis₁₇, CysHis₁₈, CysHis₁₉, CysHis₂₀, CysHis₂₁₋₃₀; CysOrn₅, CysOrn₆, CysOrn₇, CysOrn₈, CysOrn₉, CysOrn₁₀,

CysOrn₁₁, CysOrn₁₂, CysOrn₁₃, CysOrn₁₄, CysOrn₁₅, CysOrn₁₆, CysOrn₁₇, CysOrn₁₈, CysOrn₁₉, CysOrn₂₀, CysOrn₂₁₋₃₀.

Последовательности Р с двумя концевыми остатками Cys: CysArg₅Cys, CysArg₆Cys,
 5 CysArg₇Cys, CysArg₈Cys, CysArg₉Cys, CysArg₁₀Cys, CysArg₁₁Cys, CysArg₁₂Cys, CysArg₁₃Cys,
 CysArg₁₄Cys, CysArg₁₅Cys, CysArg₁₆Cys, CysArg₁₇Cys, CysArg₁₈Cys, CysArg₁₉Cys,
 CysArg₂₀Cys, CysArg₂₁₋₃₀Cys; CysLys₅Cys, CysLys₆Cys, CysLys₇Cys, CysLys₈Cys, CysLys₉Cys,
 CysLys₁₀Cys, CysLys₁₁Cys, CysLys₁₂Cys, CysLys₁₃Cys, CysLys₁₄Cys, CysLys₁₅Cys,
 10 CysLys₁₆Cys, CysLys₁₇Cys, CysLys₁₈Cys, CysLys₁₉Cys, CysLys₂₀Cys, CysLys₂₁₋₃₀Cys;
 CysHis₅Cys, CysHis₆Cys, CysHis₇Cys, CysHis₈Cys, CysHis₉Cys, CysHis₁₀Cys, CysHis₁₁Cys,
 CysHis₁₂Cys, CysHis₁₃Cys, CysHis₁₄Cys, CysHis₁₅Cys, CysHis₁₆Cys, CysHis₁₇Cys, CysHis₁₈Cys,
 CysHis₁₉Cys, CysHis₂₀Cys, CysHis₂₁₋₃₀Cys; CysOrn₅Cys, CysOrn₆Cys, CysOrn₇Cys,
 CysOrn₈Cys, CysOrn₉Cys, CysOrn₁₀Cys, CysOrn₁₁Cys, CysOrn₁₂Cys, CysOrn₁₃Cys,
 15 CysOrn₁₄Cys, CysOrn₁₅Cys, CysOrn₁₆Cys, CysOrn₁₇Cys, CysOrn₁₈Cys, CysOrn₁₉Cys,
 CysOrn₂₀Cys, CysOrn₂₁₋₃₀Cys.

Согласно другому варианту пептидные последовательности, которые можно
 применять в качестве группы Р в Формуле IV, состоят из двух или более различных
 20 основных аминокислот, как в следующих примерах, которые предназначены для ссылки
 на состав последовательности, без указания конкретного порядка, в котором
 присутствуют основные аминокислоты, в то время как остатки Cys находятся в концевом
 положении:

CysArg₍₄₋₂₉₎Lys₁, CysArg₍₄₋₂₉₎His₁, CysArg₍₄₋₂₉₎Orn₁, CysLys₍₄₋₂₉₎His₁, CysLys₍₄₋₂₉₎Orn₁,
 25 CysHis₍₄₋₂₉₎Orn₁, CysArg₍₃₋₂₈₎Lys₂, CysArg₍₃₋₂₈₎His₂, CysArg₍₃₋₂₈₎Orn₂, CysLys₍₃₋₂₈₎His₂,
 CysLys₍₃₋₂₈₎Orn₂, CysHis₍₃₋₂₈₎Orn₂, CysArg₍₂₋₂₇₎Lys₃, CysArg₍₂₋₂₇₎His₃, CysArg₍₂₋₂₇₎Orn₃,
 CysLys₍₂₋₂₇₎His₃, CysLys₍₂₋₂₇₎Orn₃, CysHis₍₂₋₂₇₎Orn₃, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₄, CysArg₍₁₋₂₆₎His₄,
 CysArg₍₁₋₂₆₎Orn₄, CysLys₍₁₋₂₆₎His₄, CysLys₍₁₋₂₆₎Orn₄, CysHis₍₁₋₂₆₎Orn₄, CysArg₍₃₋₂₈₎Lys₁His₁,
 30 CysArg₍₃₋₂₈₎Lys₁Orn₁, CysArg₍₃₋₂₈₎His₁Orn₁, CysArg₁Lys₍₃₋₂₈₎His₁, CysArg₁Lys₍₃₋₂₈₎Orn₁,
 CysLys₍₃₋₂₈₎His₁Orn₁, CysArg₁Lys₁His₍₃₋₂₈₎, CysArg₁His₍₃₋₂₈₎Orn₁, CysLys₁His₍₃₋₂₈₎Orn₁;
 CysArg₍₂₋₂₇₎Lys₂His₁, CysArg₍₂₋₂₇₎Lys₁His₂, CysArg₍₂₋₂₇₎Lys₂Orn₁, CysArg₍₂₋₂₇₎Lys₁Orn₂,
 CysArg₍₂₋₂₇₎His₂Orn₁, CysArg₍₂₋₂₇₎His₁Orn₂, CysArg₂Lys₍₂₋₂₇₎His₁, CysArg₁Lys₍₂₋₂₇₎His₂,
 35 CysArg₂Lys₍₂₋₂₇₎Orn₁, CysArg₁Lys₍₂₋₂₇₎Orn₂, CysLys₍₂₋₂₇₎His₂Orn₁, CysLys₍₂₋₂₇₎His₁Orn₂,
 CysArg₂Lys₁His₍₂₋₂₇₎, CysArg₁Lys₂His₍₂₋₂₇₎, CysArg₂His₍₂₋₂₇₎Orn₁, CysArg₁His₍₂₋₂₇₎Orn₂,
 CysLys₂His₍₂₋₂₇₎Orn₁, CysLys₁His₍₂₋₂₇₎Orn₂;
 CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₃His₁, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₂His₂, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₁His₃, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₃Orn₁,
 40 CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₂Orn₂, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₁Orn₃, CysArg₍₁₋₂₆₎His₃Orn₁, CysArg₍₁₋₂₆₎His₂Orn₂,
 CysArg₍₁₋₂₆₎His₁Orn₃, CysArg₃Lys₍₁₋₂₆₎His₁, CysArg₂Lys₍₁₋₂₆₎His₂, CysArg₁Lys₍₁₋₂₆₎His₃,
 CysArg₃Lys₍₁₋₂₆₎Orn₁, CysArg₂Lys₍₁₋₂₆₎Orn₂, CysArg₁Lys₍₁₋₂₆₎Orn₃, CysLys₍₁₋₂₆₎His₃Orn₁,
 CysLys₍₁₋₂₆₎His₂Orn₂, CysLys₍₁₋₂₆₎His₁Orn₃, CysArg₃Lys₁His₍₁₋₂₆₎, CysArg₂Lys₂His₍₁₋₂₆₎,
 45 CysArg₁Lys₃His₍₁₋₂₆₎, CysArg₃His₍₁₋₂₆₎Orn₁, CysArg₂His₍₁₋₂₆₎Orn₂, CysArg₁His₍₁₋₂₆₎Orn₃,
 CysLys₃His₍₁₋₂₆₎Orn₁, CysLys₂His₍₁₋₂₆₎Orn₂, CysLys₁His₍₁₋₂₆₎Orn₃;
 CysArg₍₂₋₂₇₎Lys₁His₁Orn₁, CysArg₁Lys₍₂₋₂₇₎His₁Orn₁, CysArg₁Lys₁His₍₂₋₂₇₎Orn₁,

CysArg₁Lys₁His₁Orn₍₂₋₂₇₎, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₂His₁Orn₁, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₁His₂Orn₁, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₁His₁Orn₂, CysArg₂Lys₍₁₋₂₆₎His₁Orn₁, CysArg₁Lys₍₁₋₂₆₎His₂Orn₁, CysArg₁Lys₍₁₋₂₆₎His₁Orn₂, CysArg₂Lys₁His₍₁₋₂₆₎Orn₁, CysArg₁Lys₂His₍₁₋₂₆₎Orn₁, CysArg₁Lys₁His₍₁₋₂₆₎Orn₂,
 5 CysArg₂Lys₁His₁Orn₍₁₋₂₆₎, CysArg₁Lys₂His₁Orn₍₁₋₂₆₎, CysArg₁Lys₁His₂Orn₍₁₋₂₆₎;

CysArg₍₄₋₂₉₎Lys₁Cys, CysArg₍₄₋₂₉₎His₁Cys, CysArg₍₄₋₂₉₎Orn₁Cys, CysLys₍₄₋₂₉₎His₁Cys, CysLys₍₄₋₂₉₎Orn₁Cys, CysHis₍₄₋₂₉₎Orn₁Cys, CysArg₍₃₋₂₈₎Lys₂Cys, CysArg₍₃₋₂₈₎His₂Cys, CysArg₍₃₋₂₈₎Orn₂Cys, CysLys₍₃₋₂₈₎His₂Cys, CysLys₍₃₋₂₈₎Orn₂Cys, CysHis₍₃₋₂₈₎Orn₂Cys, CysArg₍₂₋₂₇₎Lys₃Cys, CysArg₍₂₋₂₇₎His₃Cys, CysArg₍₂₋₂₇₎Orn₃Cys, CysLys₍₂₋₂₇₎His₃Cys, CysLys₍₂₋₂₇₎Orn₃Cys, CysHis₍₂₋₂₇₎Orn₃Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₄Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎His₄Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Orn₄Cys, CysLys₍₁₋₂₆₎His₄Cys, CysLys₍₁₋₂₆₎Orn₄Cys, CysHis₍₁₋₂₆₎Orn₄Cys, CysArg₍₃₋₂₈₎Lys₁His₁Cys, CysArg₍₃₋₂₈₎Lys₁Orn₁Cys, CysArg₍₃₋₂₈₎His₁Orn₁Cys, CysArg₁Lys₍₃₋₂₈₎His₁Cys, CysArg₁Lys₍₃₋₂₈₎Orn₁Cys, CysLys₍₃₋₂₈₎His₁Orn₁Cys, CysArg₁Lys₁His₍₃₋₂₈₎Cys, CysArg₁His₍₃₋₂₈₎Orn₁Cys, CysLys₁His₍₃₋₂₈₎Orn₁Cys;
 10 27)Lys₃Cys, CysArg₍₂₋₂₇₎His₃Cys, CysArg₍₂₋₂₇₎Orn₃Cys, CysLys₍₂₋₂₇₎His₃Cys, CysLys₍₂₋₂₇₎Orn₃Cys, CysHis₍₂₋₂₇₎Orn₃Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₄Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎His₄Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Orn₄Cys, CysLys₍₁₋₂₆₎His₄Cys, CysLys₍₁₋₂₆₎Orn₄Cys, CysHis₍₁₋₂₆₎Orn₄Cys, CysArg₍₃₋₂₈₎Lys₁His₁Cys, CysArg₍₃₋₂₈₎Lys₁Orn₁Cys, CysArg₍₃₋₂₈₎His₁Orn₁Cys, CysArg₁Lys₍₃₋₂₈₎His₁Cys, CysArg₁Lys₍₃₋₂₈₎Orn₁Cys, CysLys₍₃₋₂₈₎His₁Orn₁Cys, CysArg₁Lys₁His₍₃₋₂₈₎Cys, CysArg₁His₍₃₋₂₈₎Orn₁Cys, CysLys₁His₍₃₋₂₈₎Orn₁Cys;

CysArg₍₂₋₂₇₎Lys₂His₁Cys, CysArg₍₂₋₂₇₎Lys₁His₂Cys, CysArg₍₂₋₂₇₎Lys₂Orn₁Cys, CysArg₍₂₋₂₇₎Lys₁Orn₂Cys, CysArg₍₂₋₂₇₎His₂Orn₁Cys, CysArg₍₂₋₂₇₎His₁Orn₂Cys, CysArg₂Lys₍₂₋₂₇₎His₁Cys, CysArg₁Lys₍₂₋₂₇₎His₂Cys, CysArg₂Lys₍₂₋₂₇₎Orn₁Cys, CysArg₁Lys₍₂₋₂₇₎Orn₂Cys, CysLys₍₂₋₂₇₎His₂Orn₁Cys, CysLys₍₂₋₂₇₎His₁Orn₂Cys, CysArg₂Lys₁His₍₂₋₂₇₎Cys, CysArg₁Lys₂His₍₂₋₂₇₎Cys, CysArg₂His₍₂₋₂₇₎Orn₁Cys, CysArg₁His₍₂₋₂₇₎Orn₂Cys, CysLys₂His₍₂₋₂₇₎Orn₁Cys, CysLys₁His₍₂₋₂₇₎Orn₂Cys;
 20 27)His₂Orn₁Cys, CysLys₍₂₋₂₇₎His₁Orn₂Cys, CysArg₂Lys₁His₍₂₋₂₇₎Cys, CysArg₁Lys₂His₍₂₋₂₇₎Cys, CysArg₂His₍₂₋₂₇₎Orn₁Cys, CysArg₁His₍₂₋₂₇₎Orn₂Cys, CysLys₂His₍₂₋₂₇₎Orn₁Cys, CysLys₁His₍₂₋₂₇₎Orn₂Cys;

CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₃His₁Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₂His₂Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₁His₃Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₃Orn₁Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₂Orn₂Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₁Orn₃Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎His₃Orn₁Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎His₂Orn₂Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎His₁Orn₃Cys, CysArg₃Lys₍₁₋₂₆₎His₁Cys, CysArg₂Lys₍₁₋₂₆₎His₂Cys, CysArg₁Lys₍₁₋₂₆₎His₃Cys, CysArg₃Lys₍₁₋₂₆₎Orn₁Cys, CysArg₂Lys₍₁₋₂₆₎Orn₂Cys, CysArg₁Lys₍₁₋₂₆₎Orn₃Cys, CysLys₍₁₋₂₆₎His₃Orn₁Cys, CysLys₍₁₋₂₆₎His₂Orn₂Cys, CysLys₍₁₋₂₆₎His₁Orn₃Cys, CysArg₃Lys₁His₍₁₋₂₆₎Cys, CysArg₂Lys₂His₍₁₋₂₆₎Cys, CysArg₁Lys₃His₍₁₋₂₆₎Cys, CysArg₃His₍₁₋₂₆₎Orn₁Cys, CysArg₂His₍₁₋₂₆₎Orn₂Cys, CysArg₁His₍₁₋₂₆₎Orn₃Cys, CysLys₃His₍₁₋₂₆₎Orn₁Cys, CysLys₂His₍₁₋₂₆₎Orn₂Cys, CysLys₁His₍₁₋₂₆₎Orn₃Cys;
 25 26)Lys₃Orn₁Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₂Orn₂Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₁Orn₃Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎His₃Orn₁Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎His₂Orn₂Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎His₁Orn₃Cys, CysArg₃Lys₍₁₋₂₆₎His₁Cys, CysArg₂Lys₍₁₋₂₆₎His₂Cys, CysArg₁Lys₍₁₋₂₆₎His₃Cys, CysArg₃Lys₍₁₋₂₆₎Orn₁Cys, CysArg₂Lys₍₁₋₂₆₎Orn₂Cys, CysArg₁Lys₍₁₋₂₆₎Orn₃Cys, CysLys₍₁₋₂₆₎His₃Orn₁Cys, CysLys₍₁₋₂₆₎His₂Orn₂Cys, CysLys₍₁₋₂₆₎His₁Orn₃Cys, CysArg₃Lys₁His₍₁₋₂₆₎Cys, CysArg₂Lys₂His₍₁₋₂₆₎Cys, CysArg₁Lys₃His₍₁₋₂₆₎Cys, CysArg₃His₍₁₋₂₆₎Orn₁Cys, CysArg₂His₍₁₋₂₆₎Orn₂Cys, CysArg₁His₍₁₋₂₆₎Orn₃Cys, CysLys₃His₍₁₋₂₆₎Orn₁Cys, CysLys₂His₍₁₋₂₆₎Orn₂Cys, CysLys₁His₍₁₋₂₆₎Orn₃Cys;

CysArg₍₂₋₂₇₎Lys₁His₁Orn₁Cys, CysArg₁Lys₍₂₋₂₇₎His₁Orn₁Cys, CysArg₁Lys₁His₍₂₋₂₇₎Orn₁Cys, CysArg₁Lys₁His₁Orn₍₂₋₂₇₎Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₂His₁Orn₁Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₁His₂Orn₁Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₁His₁Orn₂Cys, CysArg₂Lys₍₁₋₂₆₎His₁Orn₁Cys, CysArg₁Lys₍₁₋₂₆₎His₂Orn₁Cys, CysArg₁Lys₍₁₋₂₆₎His₁Orn₂Cys, CysArg₂Lys₁His₍₁₋₂₆₎Orn₁Cys, CysArg₁Lys₂His₍₁₋₂₆₎Orn₁Cys, CysArg₁Lys₁His₍₁₋₂₆₎Orn₂Cys, CysArg₂Lys₁His₁Orn₍₁₋₂₆₎Cys, CysArg₁Lys₂His₁Orn₍₁₋₂₆₎Cys, CysArg₁Lys₁His₂Orn₍₁₋₂₆₎Cys.
 35 36)Lys₁His₁Orn₁Cys, CysArg₁Lys₍₂₋₂₇₎His₁Orn₁Cys, CysArg₁Lys₁His₍₂₋₂₇₎Orn₁Cys, CysArg₁Lys₁His₁Orn₍₂₋₂₇₎Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₂His₁Orn₁Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₁His₂Orn₁Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₁His₁Orn₂Cys, CysArg₂Lys₍₁₋₂₆₎His₁Orn₁Cys, CysArg₁Lys₍₁₋₂₆₎His₂Orn₁Cys, CysArg₁Lys₍₁₋₂₆₎His₁Orn₂Cys, CysArg₂Lys₁His₍₁₋₂₆₎Orn₁Cys, CysArg₁Lys₂His₍₁₋₂₆₎Orn₁Cys, CysArg₁Lys₁His₍₁₋₂₆₎Orn₂Cys, CysArg₂Lys₁His₁Orn₍₁₋₂₆₎Cys, CysArg₁Lys₂His₁Orn₍₁₋₂₆₎Cys, CysArg₁Lys₁His₂Orn₍₁₋₂₆₎Cys.

Помимо этого, пептидная группа Р в Формуле IV может содержать одну или более ароматических аминокислот, в частности, Trp, Tug или Phe, как более подробно описано выше. Необязательно пептидная последовательность, богатая ароматическими аминокислотами, может дополнительно содержать по меньшей мере один остаток пролина, который может выполнять функцию разрушителя структуры более длинных последовательностей из Trp, Tug и Phe. В зависимости от длины ароматической аминокислотной последовательности может быть предпочтительным включение двух, трех или более остатков пролина.
 45 46)His₁Orn₃Cys, CysArg₃Lys₁His₍₁₋₂₆₎Cys, CysArg₂Lys₂His₍₁₋₂₆₎Cys, CysArg₁Lys₃His₍₁₋₂₆₎Cys, CysArg₃His₍₁₋₂₆₎Orn₁Cys, CysArg₂His₍₁₋₂₆₎Orn₂Cys, CysArg₁His₍₁₋₂₆₎Orn₃Cys, CysLys₃His₍₁₋₂₆₎Orn₁Cys, CysLys₂His₍₁₋₂₆₎Orn₂Cys, CysLys₁His₍₁₋₂₆₎Orn₃Cys;

Необязательно, если группа Р в Формуле IV выбрана из пептидной последовательности, такая последовательность может дополнительно содержать одну или более гидрофильных аминокислот, в частности, выбранных из аминокислот с незаряженной полярной боковой цепью, таких как Thr, Ser, Asn и/или Gln. Приведена ссылка на более подробное описание выше, относящееся к включению таких аминокислот в Р в целом. То же самое применимо к включению липофильных аминокислот в группу Р, в частности, Leu, Val, Ile, Ala и/или Met, и к любым другим модификациям Р.

Согласно другому варианту катионное соединение в соответствии с Формулой IV может содержать группу Р, представленную полимерной группой, имеющей молекулярную массу от приблизительно 0,5 кДа до приблизительно 30 кДа. Также в этом случае варианты и предпочтительные параметры, в целом описанные выше для полимерной группы Р, следует применять в конкретном случае, когда Р является частью соединения Формулы IV.

Аналогично вышеуказанному, поскольку в этом случае Р присутствует в мультимерной форме, содержащей несколько блоков Р, и/или соединен с Р¹ и Р³ и связан дисульфидными связями, происходящими из -SH групп, Р в этом случае может больше не содержать группы -SH как таковые в его окисленной форме, представленной Формулой IV.

Как упомянуто выше, Р может представлять собой необязательно модифицированный полиакрилат, хитозан, полиэтилен имин, полиамин, сложные полиаминоэфиры или полиамидоамин или любой их сополимер.

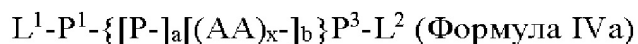
Предпочтительно полимерная группа, выбранная для Р, имеет молекулярную массу от приблизительно 0,5 кДа до приблизительно 20 кДа, например, от приблизительно 0,5 кДа до приблизительно 11,5 кДа, или от приблизительно 1 кДа до приблизительно 10 кДа, или от приблизительно 0,1 кДа до приблизительно 8 кДа, или от приблизительно 0,1 кДа до приблизительно 6 кДа, или от приблизительно 0,1 кДа до приблизительно 5 кДа, или от приблизительно 0,5 кДа до приблизительно 5 кДа, или от приблизительно 0,3 кДа до приблизительно 20 кДа, или от приблизительно 0,3 кДа до приблизительно 10 кДа, или от приблизительно 0,4 кДа до приблизительно 10 кДа, или от приблизительно 0,5 кДа до приблизительно 10 кДа, или от приблизительно 0,5 кДа до приблизительно 7,5 кДа, или от приблизительно 0,5 кДа до приблизительно 4 кДа, или от приблизительно 0,5 кДа до приблизительно 3 кДа, или от приблизительно 0,67 кДа до приблизительно 2,7 кДа, соответственно.

Предпочтительные полимерные группы, выбранные для Р, включают, например, модифицированные полиаминокислоты, такие как полимеры β-аминокислот или обратные полиамиды; модифицированные полиэтилены, такие как поли-N-этил-4-винилпиридинбромид (PEVP) и т.д.; модифицированные акрилаты, такие как полидиметиламиноэтилметилакрилат (pDMAEMA) и т.д.; модифицированные амидоамины, такие как полиамидоамин (pAMAM) и т.д.; модифицированный сложный полибетааминоэфир (PBAE), такой как сополимеры 1,4-бутандиолдиакрилата и 5-амино-1-пентанола, модифицированные на конце диамином, и т.д.; дендримеры, такие как дендримеры полипропиламина или дендримеры на основе pAMAM и т.д.; полиимин (ы), такой как полиэтиленимин (ПЭИ или пЭИ), полипропиленимин и т.д.; полиаллиламин, полиметобромид 1,5-диметил-1,5-диазаундекаметилен или бромид гексаметрина (Polybrene®).

Предпочтительными также являются катионные полисахариды, т.е. полимеры на основе сахарного остова, такие как полимеры на основе циклодекстрина, полимеры

на основе декстрана, хитозан и т.д.; полимеры на основе силанового остова, такие как сополимеры PMOXA-PDMS и т.д.; а также блок-полимеры, состоящие из комбинации одного или более катионных блоков (например, выбранных из катионного полимера, как указано выше) и одного или более гидрофильных или гидрофобных блоков (например, полиэтиленгликоля).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения катионное соединение, содержащее по меньшей мере одну катионную группу Р, представляет собой соединение в соответствии с Формулой IVa



в которой

Р, Р¹, Р³, L¹ и L² определены выше;

(AA)_x представляет собой аминокислотный (AA) компонент, где x представляет собой целое число, выбранное из диапазона от 1 до приблизительно 100;

а и b представляют собой целые числа, независимо выбранные из диапазона от 1 до приблизительно 49, так что сумма a + b находится пределах диапазона от 2 до приблизительно 50;

группы [P-] и [(AA)_x-] могут быть сгруппированы в любом порядке в подформуле {[P-]_a[(AA)_x-]_b}; и в которой

каждый из Р, Р¹, Р³ и (AA)_x соединен с каждым соседним Р, Р¹, Р³ и (AA)_x дисульфидной связью.

Аналогично вышеуказанному, варианты и предпочтительные параметры, описанные ранее для Р, Р¹, Р³, L¹ и L² в отношении Формулы IV, также применимы к этому варианту реализации по аналогии. Формула IVa отличается от Формулы IV тем, что она дополнительно содержит одну или более пептидных последовательностей (AA)_x в комбинации с одним или более группами Р в центральной области соединения.

Каждый отдельный блок (AA)_x, а также каждая аминокислота в блоке могут быть выбраны независимо. Один или более блоков (AA)_x можно применять для введения определенных неосновных аминокислот, таких как одна или более ароматических аминокислот, в частности, Trp, Tyr и/или Phe; или одной или более гидрофильных аминокислот, в частности, Thr, Ser, Asn и/или Gin; или липофильных аминокислот, в частности, Leu, Val, Ile, Ala и/или Met. В этой связи и как описано выше, включение посредством блоков (AA)_x является альтернативой введению соответствующих аминокислот в саму пептидную последовательность Р. При включении по отдельности в виде блоков (AA)_x согласно Формуле IVa каждый из таких блоков (AA)_x соединен с каждой соседней группой Р, Р¹, Р³ и (AA)_x дисульфидной связью, которая согласно одному из предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения включает концевой остаток Cys, как описано выше.

Предпочтительно количество аминокислот в группе (AA)_x составляет от приблизительно 2 до приблизительно 50 или от приблизительно 3 до приблизительно 50, и более предпочтительно от приблизительно 7 до приблизительно 30 или от приблизительно 3 до приблизительно 25. Также предпочтительными являются длины, которые находятся в пределах диапазона от приблизительно 3 до приблизительно 20 аминокислот, или от приблизительно 5 до приблизительно 20 аминокислот, или от приблизительно 7 до приблизительно 30 аминокислот, или от приблизительно 6 до

приблизительно 18 аминокислот, или от приблизительно 7 до приблизительно 17 аминокислот, например, от приблизительно 5 до приблизительно 15 аминокислот.

В том случае, если Р в Формуле IVa представляет собой пептидную группу, предпочтительно содержание катионных аминокислот в компоненте $\{[P-]_a[(AA)_{x-}]_b\}$

составляет по меньшей мере 10%, 20% или 30%, предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно по меньшей мере 50% или 60%. Необязательно оно составляет приблизительно $50 \pm 10\%$, $60 \pm 10\%$, $70 \pm 10\%$ или $80 \pm 10\%$. В данном случае содержание (т.е. количество) всех аминокислот во всем компоненте $\{[P-]_a[(AA)_{x-}]_b\}$ определяется как 100%.

В том случае, если группа Р в Формуле IVa представляет собой полимерную цепь, содержание катионных зарядов в компоненте $\{[P-]_a[(AA)_{x-}]_b\}$ при (физиологическом) рН, как определено в настоящем документе, предпочтительно составляет более 50%, например, по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90% или даже 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, или может находиться в пределах диапазона от более чем приблизительно 50% до 100%, или от приблизительно 60% до приблизительно 100%, или в пределах диапазона, образованного любыми двумя из вышеупомянутых значений, при условии, что содержание всех зарядов, например, положительных и отрицательных зарядов при (физиологическом) рН, как определено в настоящем документе, во всем компоненте $\{[P-]_a[(AA)_{x-}]_b\}$ составляет 100%.

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения катионное соединение, содержащее по меньшей мере одну катионную группу Р, представляет собой соединение в соответствии с одной из следующих Формул IVb или IVc:

$L^1 - [(AA^1)_{x1-}]_{z1} P^1 - [P-]_n - P^3 - [(AA^2)_{x2}]_{z2} - L^2$ (Формула IVb) или

$L^1 - [(AA^1)_{x1-}]_{z1} P^1 - \{[P-]_a[(AA)_{x-}]_b\} - P^3 - [(AA^2)_{x2}]_{z2} - L^2$ (Формула IVc)

в которых Р, P^1 , P^3 , $(AA)_x$, L^1 и L^2 определены выше;

$(AA^1)_{x1}$ и $(AA^2)_{x2}$ представляют собой аминокислотные (AA) компоненты, причем

аминокислоты AA^1 и AA^2 могут быть идентичны или отличаться от AA и/или друг от друга, и при этом $x1$ и $x2$ представляют собой целые числа, независимо выбранные в диапазоне от 1 до приблизительно 100;

$z1$ и $z2$ представляют собой целые числа, независимо выбранные в диапазоне от 1 до приблизительно 30;

группы $[P-]$ и $[(AA)_{x-}]$ могут быть расположены в любом порядке в подформуле $\{[P-]_a[(AA)_{x-}]_b\}$; и в которых

любой из Р, P^1 , P^3 , $(AA)_x$, $(AA^1)_{x1}$ или $(AA^2)_{x2}$ может быть соединен с соседним Р, P^1 , P^3 , $(AA)_x$, $(AA^1)_{x1}$, $(AA^2)_{x2}$, L^1 и/или L^2 дисульфидной связью.

Аналогично вышеуказанному, варианты и предпочтительные параметры, описанные ранее для Р, P^1 , P^3 , L^1 , L^2 и $(AA)_x$, а также а и b в отношении Формулы IV и Формулы IVa, также применимы по аналогии к этим вариантам реализации с применением катионных соединений в соответствии с Формулами IVb и IVc. Предпочтительные параметры, описанные ранее для x, также применимы к $x1$ и $x2$. Формула IVb отличается от Формулы VIa тем, что аминокислотный компонент $(AA)_x$ заменен аминокислотными компонентами $(AA^1)_{x1}$ и $(AA^2)_{x2}$, которые также определены как независимо выбранные

повторяющиеся блоки аминокислот, содержащие от 1 до 100 аминокислот на блок и от 1 до 30 блоков на молекулу; вместо расположения в центральной части молекулы или вблизи нее $(AA^1)_{x1}$ и $(AA^2)_{x2}$ расположены вне центральной части и между P^1 и

5 необязательным компонентом L^1 , и между P^3 и необязательным компонентом L^2 , соответственно, что обеспечивает модуляцию физических и биологических свойств молекулярной конструкции. Аминокислотные компоненты в соединении в соответствии с Формулой IVc присутствуют в центральной области молекулы, как в Формуле IVa, и в направлении двух концевых областей, как в Формуле IVb.

10 Целые числа $z1$ и $z2$ выбраны из диапазона от 1 до приблизительно 30 и более предпочтительно от приблизительно 1 до приблизительно 20, или от 1 до приблизительно 15, или от 1 до приблизительно 10, соответственно.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения композиция содержит два или более разных видов катионных пептидов и/или полимеров. В этом варианте 15 реализации каждый из катионных пептидов и/или полимеров может быть выбран индивидуально, при этом все варианты и предпочтительные параметры, упомянутые выше, применимы к каждому выбору.

Как уже упоминалось, катионное липидоидное соединение, также просто называемое липидоидом, представляет собой липидоподобное соединение, т.е. амфифильное 20 соединение с липидоподобными физическими свойствами.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения липидоид представляет собой соединение, содержащее по меньшей мере два катионных атома азота и по меньшей мере два липофильных хвоста. В настоящем документе термин «хвост» представляет собой подструктуру молекулы, представляющую собой цепь или 25 цепеподобную структуру, такую как необязательно замещенная гидрокарбильная, ацильная или ацилоксиалкильная цепь, содержащая по меньшей мере четыре и более предпочтительно по меньшей мере шесть атомов углерода. Необязательно замещенная гидрокарбильная, ацильная или ацилоксиалкильная цепь, представляющая собой липофильный хвост, может быть непосредственно соединена с катионным атомом 30 азота.

Согласно одному конкретному варианту реализации настоящего изобретения липидоид представляет собой соединение, содержащее два идентичных липофильных хвоста, каждый из которых непосредственно соединен с катионным атомом азота. Согласно другому конкретному варианту реализации настоящего изобретения липидоид 35 представляет собой соединение, содержащее три идентичных липофильных хвоста, каждый из которых непосредственно соединен с катионным атомом азота. Согласно дополнительному конкретному варианту реализации настоящего изобретения липидоид представляет собой соединение, содержащее четыре или более одинаковых липофильных хвостов, каждый из которых непосредственно соединен с катионным атомом азота. В 40 каждом из этих вариантов реализации липидоид может необязательно содержать дополнительный атом азота, с которым не соединен липофильный хвост. Такой липидоид также можно понимать как соединение, имеющее катионный остов, происходящий из олигоамина, с липофильными хвостами, прикрепленными к катионным атомам азота олигоамина или к некоторым из них.

45 Если липофильные хвосты представляют собой замещенные гидрокарбильные (например, алкильные) цепи, заместитель может, например, представлять собой метил или гидроксил.

Необязательно замещенная гидрокарбильная цепь может быть насыщенной,

например, чтобы напоминать алкил, или она может быть ненасыщенной, т.е. представлять собой алкенил или алкинил, каждый из которых необязательно содержит одну, две, три или более двойных связей и/или тройных связей углерод-углерод. В случае хвостовых структур, представляющих собой или включающих ацильную или ацилоксиалкильную группу, они также могут содержать одну, две или более двойных связей и/или тройных связей углерод-углерод в углеводородном сегменте хвоста.

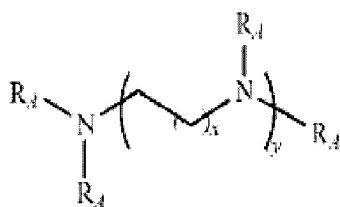
Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения липидоидное соединение не содержит гидролизуемых соединяющих групп, таких как сложноэфирные, амидные или карбаматные группы. В настоящем документе соединяющая группа представляет собой группу, которая соединяет липофильные хвосты липидоидной молекулы с гидрофильной областью, содержащей катионные атомы азота. Обычные катионные липиды, которые были предложены в качестве носителей или агентов для доставки нуклеиновых кислот в клетки и усиления трансфекции, часто, а скорее обычно, содержат такие линкеры или соединяющие группы, которые чаще всего могут быть гидролизованы и/или ферментативно расщеплены. В частности, были предложены линкеры со сложноэфирными группами, а также линкеры с амидными группами или карбаматными группами, все из которых подвержены гидролитическому и/или ферментативному расщеплению в условиях *in vivo*.

В настоящем документе термин «гидролизуемый» означает, что значительная степень гидролиза происходит в физиологической жидкости (такой как интерстициальная жидкость) в условиях *in vivo* в течение секунд, минут, часов или дней; предпочтительно соответствующее соединение или группа гидролизуется до по меньшей мере 50% спустя не более чем 7 дней или даже не более чем 2 дня.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения липидоидное соединение содержит группу ПЭГ.

Как уже упоминалось, липидоидное соединение является катионным, это означает, что оно является катионизируемым или постоянно катионным. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения липидоид является катионизируемым, т.е. он содержит один или более катионизируемых атомов азота, но не содержит постоянно катионные атомы азота. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере один из катионных атомов азота липидоида является постоянно катионным. Необязательно липидоид содержит два постоянно катионных атома азота, три постоянно катионных атома азота или даже четыре или более постоянно катионных атомов азота.

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения липидоидное соединение представляет собой соединение в соответствии с Формулой I

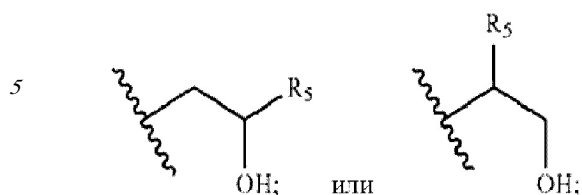


(Формула I)

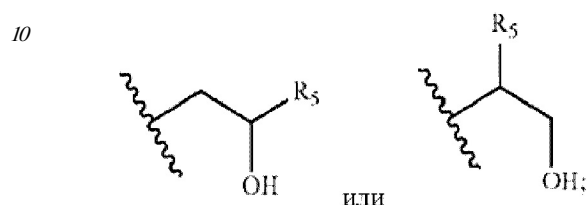
или его фармацевтически приемлемую соль.

В Формуле I в каждом случае R_A независимо является незамещенным, циклическим или ациклическим, разветвленным или неразветвленным C_{1-20} алифатическим заместителем; замещенным или незамещенным, циклическим или ациклическим,

разветвленным или неразветвленным C₁₋₂₀ гетероалифатическим заместителем;
замещенным или незамещенным арилом; замещенным или незамещенным гетероарилом;



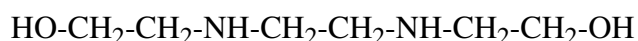
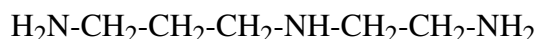
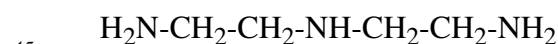
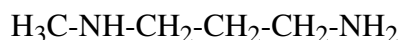
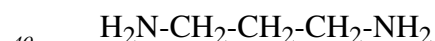
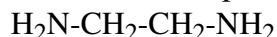
причем по меньшей мере один R_A представляет собой

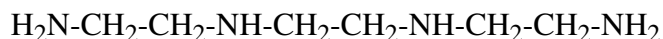


15 Помимо этого, в каждом случае R₅ независимо представляет собой незамещенный, циклический или ациклический, разветвленный или неразветвленный C₈₋₁₆ алифатический заместитель; замещенный или незамещенный арил; или замещенный или незамещенный гетероарил. Кроме того, в каждом случае x представляет собой целое число от 1 до 10, и в каждом случае y представляет собой целое число от 1 до 10. Согласно некоторым
20 вариантам реализации настоящего изобретения R_A или R₅ представляют собой или замещены группой ПЭГ.

Необязательно R₅ представляет собой C_{8-C16} алкил по меньшей мере в одном случае или даже для каждого случая. В соответствии с одним из предпочтительных вариантов
25 реализации настоящего изобретения по меньшей мере один x выбран из 1 или 2, и необязательно во всех случаях x равен 1 или 2. Помимо этого по меньшей мере один y выбран из 1 или 2, и необязательно во всех случаях y равен 1 или 2. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения во всех случаях R₅ представляет собой C_{8-C16} алкил, во всех случаях x равен 1 или 2, и во всех случаях y
30 равен 1 или 2.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения такие липидоиды могут быть получены с помощью реакции олигоамина с алифатическим соединением с концевыми эпоксидными группами при повышенных температурах, например, при
35 температуре от 80 до 95°C, в отсутствие растворителя. Такое липидоидное соединение включает гидрофильную часть, полученную в результате размыкания эпоксида амином, и гидрофобный алифатический хвост. Предпочтительно олигоамин содержит от 2 до 5 атомов азота. Предпочтительные олигоамины включают, но не ограничиваются ими:



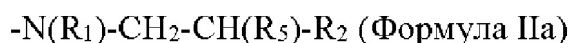


Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения липидоиды на основе олигоаминов необязательно замещены группой ПЭГ.

Предпочтительные алифатические соединения с концевыми эпоксидными группами включают, но не ограничиваются ими, 2-алкилоксираны, в которых алкил представляет собой бутил, гексил, октил, децил, додецил, тетрадецил или октадецил. Необязательно алкильная группа может дополнительно содержать алкильную боковую цепь, такую как метальная, этильная, пропильная или изопропильная боковая цепь. Помимо этого, алкильная группа 2-алкилоксирана также может содержать один или более гетероатомов, таких как кислород. Помимо этого, алифатическое соединение с концевыми эпоксидными группами может содержать одну или более двойных или тройных связей углерод-углерод.

Для дополнительных методических принципов касательно получения таких липидоидных соединений приведена ссылка на US 8969353, содержание которого полностью включено в настоящий документ.

В соответствии с дополнительным вариантом реализации настоящего изобретения липидоидное соединение содержит две или три группы Формулы Ia и/или Формулы Ib:



в которых, независимо для каждой отдельной группы Формулы Ia или Формулы Ib, R_1 выбран из водорода или C_1 - C_4 -алкила; R_2 выбран из линейной или разветвленной, насыщенной или ненасыщенной C_6 - C_{16} гидрокарбильной цепи; R_3 и R_4 выбраны из C_1 - C_4 -алкила, и R_5 представляет собой водород или гидроксил. Необязательно, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, каждая группа Формулы Ia и/или Ib по отдельности может быть замещена группой ПЭГ или может не быть замещен.

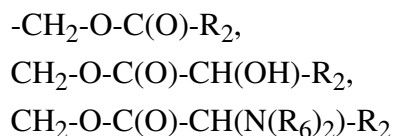
R_1 может быть одинаковым или различным для каждого случая. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения R_1 является одинаковым для каждого случая, в частности, когда R_1 представляет собой водород или метил. R_3 и R_4 также могут быть одинаковыми для каждого случая; например, во всех случаях R_3 и R_4 могут представлять собой метил.

Согласно другому дополнительному варианту реализации настоящего изобретения липидоидное соединение представляет собой соединение, содержащее три идентичных группы Формулы Ia и/или Формулы Ib, в которых R_1 представляет собой водород, R_2 представляет собой линейную или разветвленную C_6 - C_{16} алкильную цепь, R_3 и R_4 представляют собой метил, и R_5 представляет собой гидроксил. Например, соединение в соответствии с Формулой Ia может быть основано на олигоаминном остове

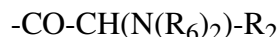


в котором для каждой из трех первичных аминогрупп один из атомов водорода замещен





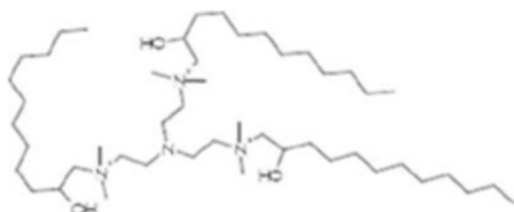
и/или



где R_2 представляет собой линейный или разветвленный C_6 - C_{16} алкил, в частности, линейный C_6 , C_8 , C_{10} или C_{12} алкил, и каждый R_6 может независимо представлять собой H или CH_3 . Соединение в соответствии с Формулой IIb может быть основано на аналогичном олигоаминном остове и аналогичном заместителе $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}_2$, но в дополнение содержит две метильные группы у каждого из атомов азота, к которым также прикреплен заместитель $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}_2$. Аналогично вышеуказанному, R_2 представляет собой линейный или разветвленный C_6 - C_{16} алкил, в частности, линейный C_6 , C_8 , C_{10} или C_{12} алкил.

Необязательно один из атомов водорода каждой из трех первичных аминогрупп замещен группой ПЭГ или является пегилированным.

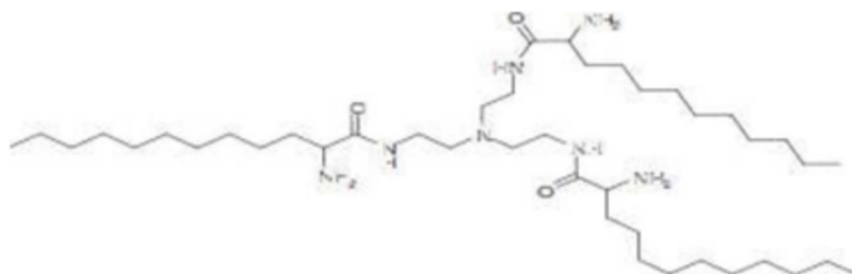
Согласно одному конкретному варианту реализации настоящего изобретения постоянно катионный липидоид представляет собой соединение, содержащее катион, изображенный в Формуле IX:



и дополнительно необязательно анион, предпочтительно анион, описанный выше. Соединение может быть получено путем сначала взаимодействия олигоамина Формулы: $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$

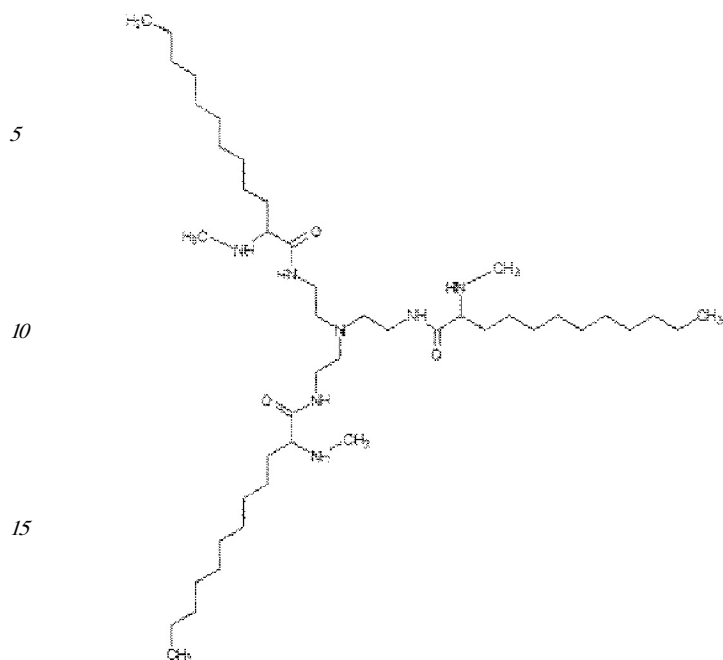
с неразветвленным насыщенным концевым C_{12} алкильным эпоксидом с последующим образованием четвертичного основания с помощью активированного метила, такого как йодистый метил. Один аспект настоящего изобретения относится к указанному соединению как таковому, включая любые его соли.

Согласно дополнительному конкретному варианту реализации настоящего изобретения липидоид представляет собой соединение в соответствии с Формулой X:

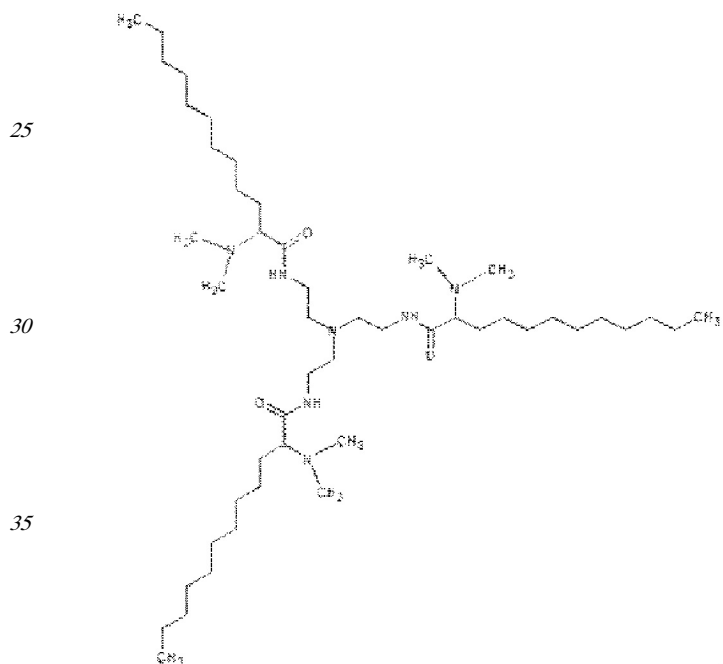


Липидоидное соединение необязательно представляет собой липидоидное соединение в соответствии с Формулой X, где каждый из первичных аминов независимо замещен один или два раза метилом. Согласно конкретному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения липидоидное соединение представляет собой

соединение в соответствии с Формулой Ха:

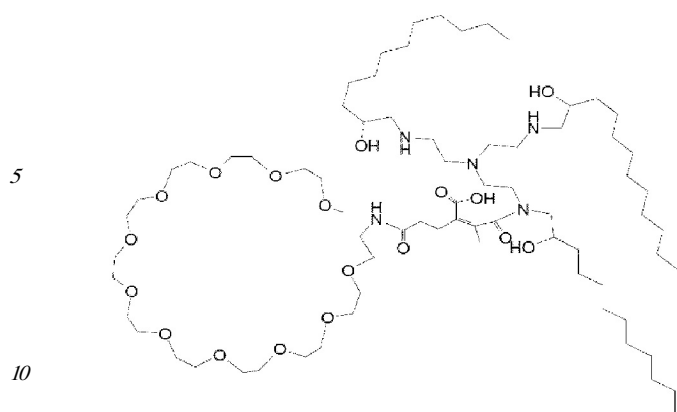


20 Согласно дополнительному особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения липидоидное соединение представляет собой соединение в соответствии с Формулой Xb:



40 Согласно конкретному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения липидоидное соединение представляет собой соединение, содержащее структуру:

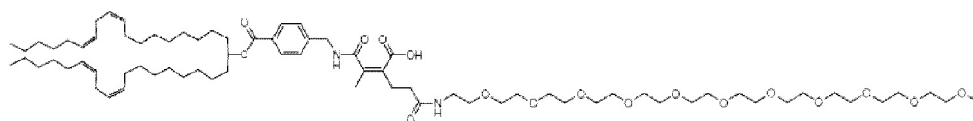
45



Согласно дополнительному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения липидоидное соединение представляет собой соединение, содержащее

15

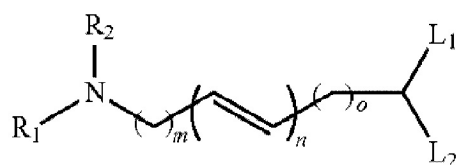
структуру:



20

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения липидоидное соединение представляет собой соединение в соответствии с Формулой III

25



(Формула III)

30

в которой каждый из R_1 и R_2 независимо выбран из группы, состоящей из водорода, необязательно замещенного, насыщенного или ненасыщенного C_1 - C_{20} гидрокарбила, и необязательно замещенного, насыщенного или ненасыщенного C_6 - C_{20} ацила. Помимо этого, каждый из L_1 и L_2 независимо выбран из необязательно замещенных, насыщенных или ненасыщенных C_1 - C_{30} гидрокарбилов; каждый из m и o независимо выбран из группы, состоящей из нуля и любого положительного целого числа; и n представляет собой любое положительное целое число. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения липидоиды в соответствии с Формулами I или II являются пегилированными. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения липидоиды в соответствии с Формулой III являются пегилированными. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения общий катионный или ионизируемый липид является пегилированным. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения количество групп этиленгликоля в ПЭГ составляет от 5 до 9, от 10 до 20, 21-30, 31-40, от 41 до 50 или более, или группа ПЭГ выбрана из ПЭГ200-ПЭГ10000. Предпочтительно группа ПЭГ выбрана из ПЭГ500-ПЭГ2000. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения применяют полимеры ПЭГ, которые являются разветвленными, Y-образными или гребенчатыми.

45

Согласно одному из предпочтительных вариантов реализации настоящего

изобретения R_1 и R_2 липидоида Формулы III представляют собой C_1 - C_{20} алкил, более предпочтительно C_1 - C_6 алкил, в частности, метил, этил, пропил или изопропил.

Например, оба из R_1 и R_2 могут представлять собой метил. Помимо этого, n

предпочтительно не превышает приблизительно 5, в частности, не превышает приблизительно 2, например, 1. Помимо этого o предпочтительно выбрано из 0 или 1, и m предпочтительно выбрано из диапазона от 1 до 6, например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения каждый из L_1 и L_2 независимо выбран из ненасыщенных C_6 - C_{22} гидрокарбилов, в частности, из C_{10} - C_{22} гидрокарбилов. Предпочтительные гидрокарбилы включают линейные омега-6 и омега-9 ненасыщенные углеводородные цепи с 14, 16, 18, 20 или 22 атомами углерода.

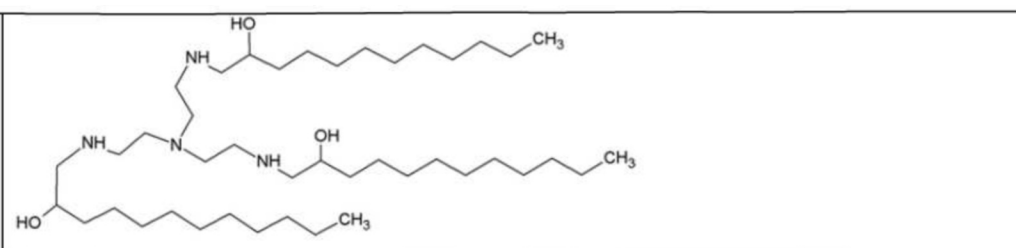
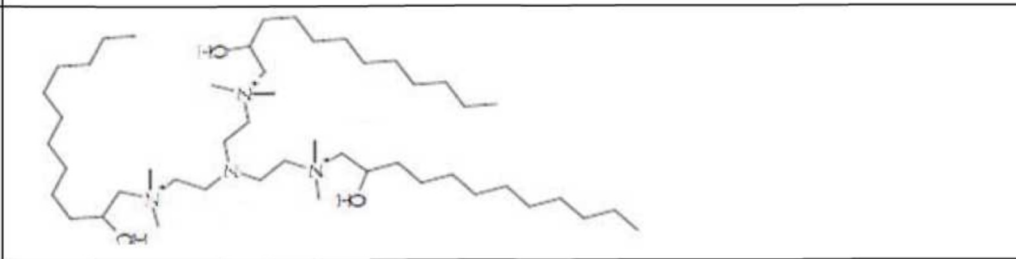
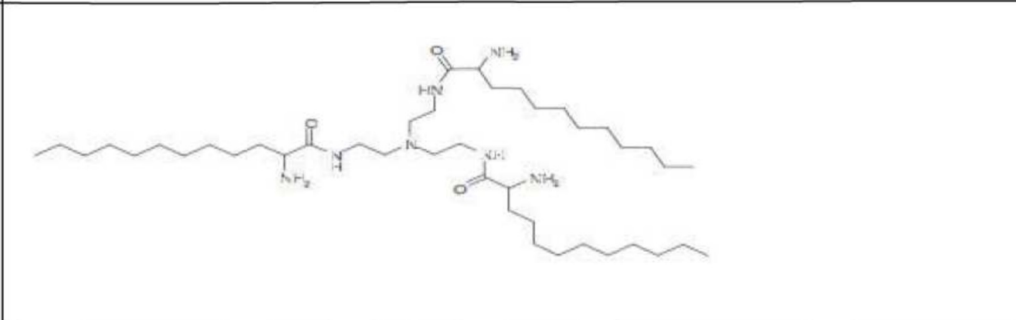
Предпочтительными также являются липидоиды Формулы III, в которой оба из R_1 и R_2 представляют собой метил, m равно 3 или 4, n равно 1, o равно 0 или 1, и L_1 и L_2 представляют собой одинаковые линейные омега-6 и омега-9 ненасыщенные углеводородные цепи с 16 или 18 атомами углерода. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере один из R_1 , R_2 , L_1 или L_2 может представлять собой группу ПЭГ или замещена группой ПЭГ.

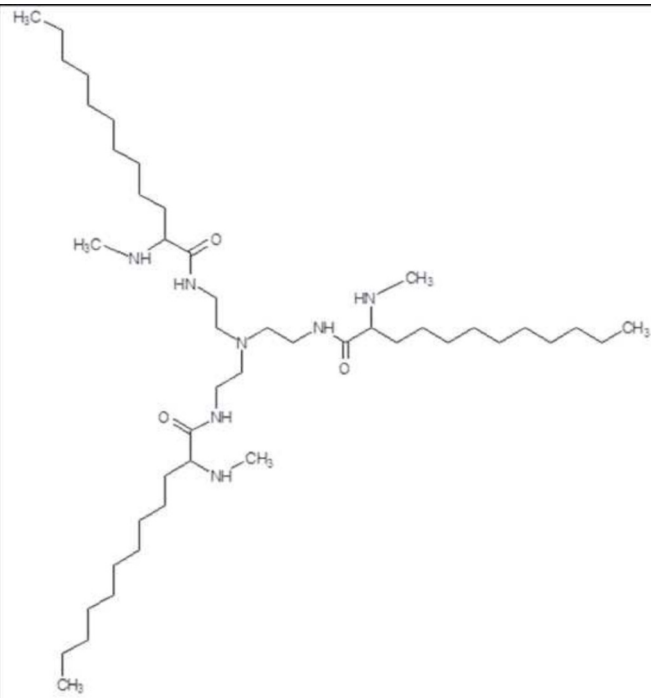
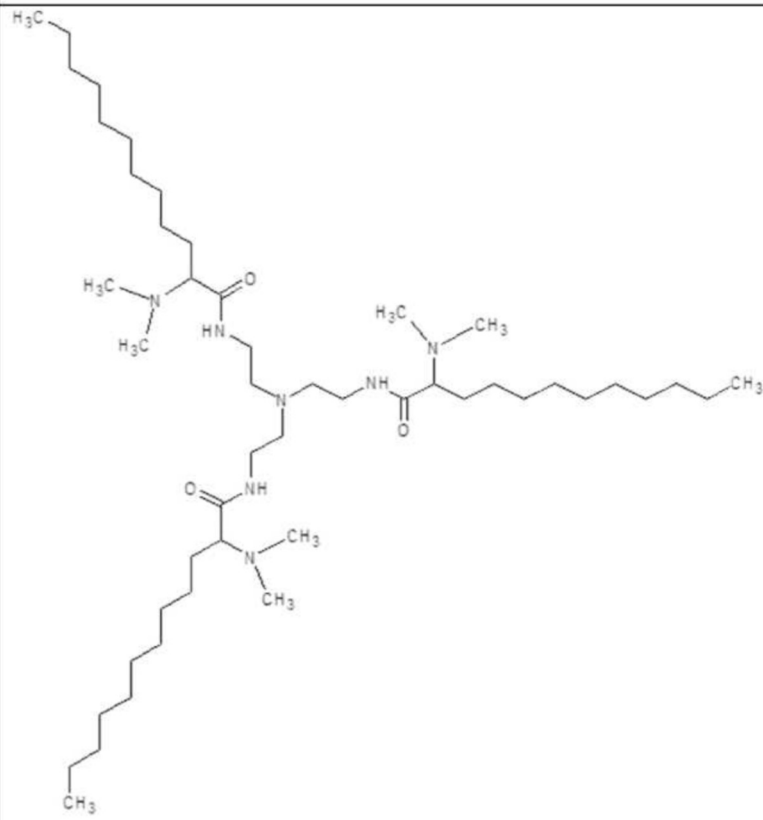
Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения липидоид представляет собой соединение в соответствии с Формулой III, определенное выше, за исключением того, что n равно 0.

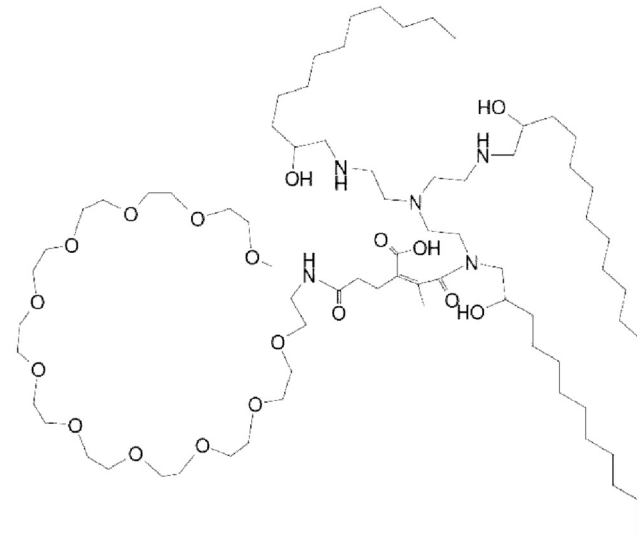
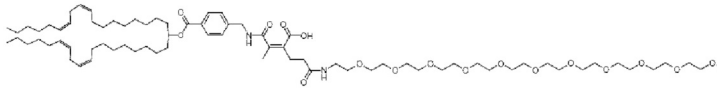
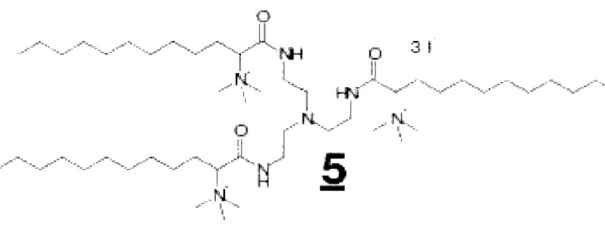
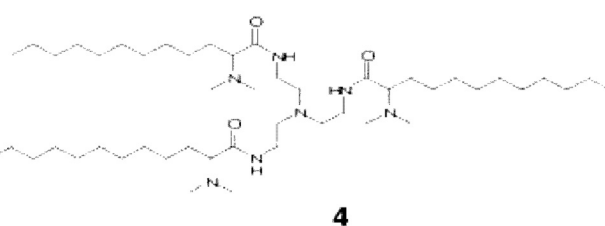
Необязательно композиция содержит два или более липидоидов, каждый из которых независимо выбран, как описано выше; или она может содержать комбинацию липидоида с другим катионным липидом.

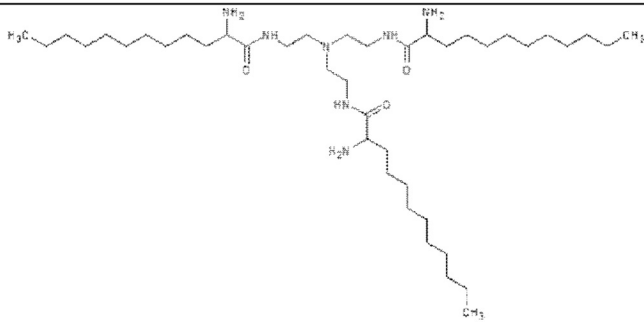
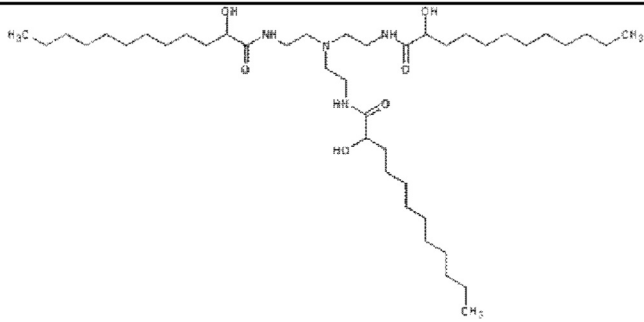
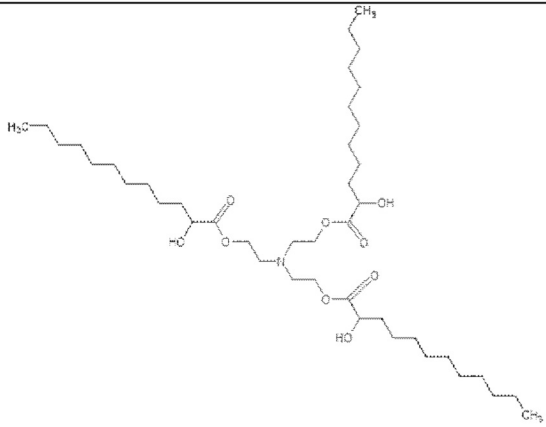
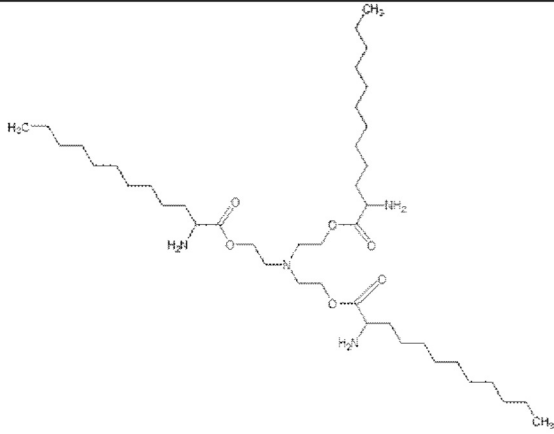
Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения композиция по существу не содержит липиды, отличные от липидоида, определенного выше; или по существу не содержит липиды, отличные от тех, которые определены в одном из пунктов формулы изобретения. Фактически, одно из конкретных преимуществ настоящего изобретения заключается в том, что оно действительно получает пользу от свойств и благоприятных эффектов липидоида в отношении эффективной доставки нуклеиновой кислоты, но без необходимости присутствия других липидов, которые не являются катионными, как определено выше, и которые часто используются для получения липоплексов или липидных наночастиц, таких как цвиттерионные фосфолипиды или стероиды, такие как холестерин, которые иногда называются вспомогательными липидами. Соответственно, согласно одному из предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения композиция не содержит нейтральные или цвиттерионные липиды; или композиция не содержит стероиды, такие как холестерин.

В настоящем изобретении применяли структуры липидоидов, представленные ниже, но не ограничивающиеся ими:

3-C12- OH	
3-C12- OH-cat	
3-C12- амид	

3-C12- амид мономети л	
3-C12- амид диметил	

Обр. ПЭГ(10)- 3-С12- ОН	
Обр. ПЭГ (10)- DLin-п- аминобен зоат	
3С12- амид- ТМА катион	
3С12- амид- ДМА	

5	3C12-амид-NH ₂	
10	3C12-амид-OH	
20	Сл.эфир 3C12-OH	
30	Сл.эфир 3C12-амин	

5	Сл.эфир 3C12- ДМА	
10	2C12- амид- ДМА	
15	3C12- лин.- амид- ДМА	
20	2C12- спермин- амид- ДМА	
25	3C12- спермин- амид - ДМА	

Биологически активный транспортируемый материал, содержащийся в композиции согласно настоящему изобретению или в наночастице(ах) согласно настоящему изобретению, как описано ниже, предпочтительно представляет собой соединение или комплекс нуклеиновой кислоты. Соединение нуклеиновой кислоты, содержащееся в композиции, может представлять собой нуклеиновую кислоту любого типа или производное нуклеиновой кислоты. Согласно некоторым из предпочтительных

вариантов реализации настоящего изобретения соединение нуклеиновой кислоты выбрано из химически модифицированной или немодифицированной ДНК, одноцепочечной или двухцепочечной ДНК, кодирующей или не кодирующей ДНК, необязательно выбрано из плазмиды, (короткого) олигодезоксинуклеотида (т.е.

5 (короткого) ДНК-олигонуклеотида), геномной ДНК, ДНК-праймеров, ДНК-зондов, иммуностимулирующей ДНК, аптамера или любой их комбинации. Согласно другому варианту или в дополнение к нему, такая молекула нуклеиновой кислоты может быть выбрана, например, из любой ПНК (пептидной нуклеиновой кислоты). Помимо этого согласно другому варианту или в дополнение к нему, а также в соответствии с особенно
10 предпочтительным вариантом реализации нуклеиновая кислота выбрана из химически модифицированной или немодифицированной РНК, одноцепочечной или двухцепочечной РНК, кодирующей или не кодирующей РНК, необязательно выбрана из информационной РНК (иРНК), (короткого) олигорибонуклеотида (т.е. (короткого) РНК-олигонуклеотида), вирусной РНК, РНК-репликона, транспортной РНК (тРНК),
15 рибосомной РНК (рРНК), иммуностимулирующей РНК (исРНК), микроРНК, малой интерферирующей РНК (миРНК), малой ядерной РНК (мяРНК), малой шпилечной РНК (мшРНК) или рибопереключателю, РНК аптамера, РНК-ловушки, антисмысловой РНК, рибозима или любой их комбинации. Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты комплекса представляет собой РНК. Более предпочтительно молекула
20 нуклеиновой кислоты комплекса представляет собой (линейную) одноцепочечную РНК, еще более предпочтительно иРНК или иммуностимулирующую РНК.

Необязательно биологически активный транспортируемый материал представляет собой комбинацию более чем одного соединения нуклеиновой кислоты.

Описанная с другой точки зрения, нуклеиновая кислота может представлять собой
25 одноцепочечное или двухцепочечное соединение или комплекс нуклеиновой кислоты. Строго говоря, двухцепочечная нуклеиновая кислота также может рассматриваться как комбинация двух соединений нуклеиновой кислоты (т.е. двух антипараллельных цепей), которые образуют комплекс нуклеиновой кислоты за счет их ассоциации с
30 помощью нековалентных связей. Однако, как и в общей специальной терминологии, двухцепочечная нуклеиновая кислота также может быть описана как одно соединение или молекула. Нуклеиновая кислота также может представлять собой частично двухцепочечную или частично одноцепочечную нуклеиновую кислоту, содержащую
две цепи, которые являются по меньшей мере частично самокомплементарными. Такие частично двухцепочечные или частично одноцепочечные молекулы нуклеиновой кислоты
35 обычно образованы более длинной и более короткой одноцепочечными молекулами нуклеиновых кислот или двумя одноцепочечными молекулами нуклеиновых кислот, которые приблизительно равны по длине, при этом одна одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты частично комплементарна другой одноцепочечной молекуле нуклеиновой кислоты и тем самым они образуют в этой области молекулу
40 двухцепочечной нуклеиновой кислоты, т.е. частично двухцепочечную или частично одноцепочечную нуклеиновую кислоту (молекулу). Предпочтительно соединение нуклеиновой кислоты представляет собой одноцепочечную нуклеиновую кислоту. Помимо этого, соединение нуклеиновой кислоты может представлять собой кольцевую или линейную нуклеиновую кислоту, предпочтительно линейную нуклеиновую кислоту.

45 Необязательно нуклеиновая кислота может представлять собой искусственную нуклеиновую кислоту. Под термином «молекула искусственной нуклеиновой кислоты» или «искусственная нуклеиновая кислота» обычно понимают молекулу нуклеиновой кислоты, например, ДНК или РНК, которая не встречается в природе. Другими словами,

следует понимать, что искусственная молекула нуклеиновой кислоты является неприродной молекулой нуклеиновой кислоты. Такая молекула нуклеиновой кислоты может быть неприродной из-за ее индивидуальной последовательности (которая не встречается в природе) и/или из-за других модификаций, например, структурных модификаций нуклеотидов, которые не встречаются в природе. Молекула искусственной нуклеиновой кислоты может быть молекулой ДНК, молекулой РНК или гибридной молекулой, содержащей части ДНК и РНК. Как правило, искусственные молекулы нуклеиновых кислот могут быть сконструированы и/или созданы методами генной инженерии, чтобы соответствовать желательной искусственной последовательности нуклеотидов (гетерологичной последовательности). В данном случае искусственная последовательность обычно представляет собой последовательность, которая может не встречаться в природе, т.е. она отличается от последовательности дикого типа по меньшей мере одним нуклеотидом. Под термином «дикий тип» можно понимать последовательность, встречающуюся в природе. Помимо этого, термин «искусственная молекула нуклеиновой кислоты» не ограничивается обозначением «одна отдельная молекула», но обычно включает группу идентичных молекул. Соответственно, он может относиться к множеству идентичных молекул, содержащихся в аликвоте.

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения последовательности (белок или, соответственно, нуклеиновая кислота), которые определены в настоящем изобретении, содержат или состоят из последовательности (белка или, соответственно, нуклеиновой кислоты), которая по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична указанной последовательности (белка или, соответственно, нуклеиновой кислоты).

Комбинация двух или более различных нуклеиновых кислот может быть подходящей, например, в случае композиции, содержащей нуклеиновую кислоту (такую как РНК), кодирующую тяжелую цепь антитела, а также нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь того же антитела. Другим примером является комбинация двух или более нуклеиновых кислот для воздействия на часть иммунной системы организма, называемая системой CRISPR/Cas (CRISPR: кластерные короткие палиндромные повторы, разделенные регулярными промежутками; Cas: связанный с CRISPR белок).

Еще одним примером является комбинация направляющей РНК (нРНК) с кодирующей нуклеиновой кислотой в композиции или наночастице согласно настоящему изобретению.

Кодирующие нуклеиновые кислоты

Нуклеиновая кислота может кодировать белок или пептид, которые могут быть выбраны, но не ограничиваются ими, например, из терапевтически активных белков или пептидов, выбранных, например, из антигенов, например, опухолевых антигенов, патогенных антигенов (например, выбранных из антигенов животных, из вирусных антигенов, из протозойных антигенов, из бактериальных антигенов), аллергенных антигенов, аутоиммунных антигенов или других антигенов, из аллергенов, из антител, из иммуностимулирующих белков или пептидов, из антигенспецифических рецепторов Т-клеток или из любого другого подходящего белка или пептида для конкретного (терапевтического) применения, причем кодирующая нуклеиновая кислота может транспортироваться в клетку, ткань или организм, и белок может впоследствии экспрессироваться в этой клетке, ткани или организме.

Бицистронная нуклеиновая кислота или РНК и мультицистронная нуклеиновая кислота или РНК: бицистронная или мультицистронная нуклеиновая кислота или РНК

обычно представляет собой нуклеиновую кислоту или РНК, предпочтительно иРНК, которая обычно может иметь две (бицистронные) или более (мультицистронные) кодирующие области. Кодирующая область в данном случае представляет собой последовательность кодонов, которая транслируется в пептид или белок.

- 5 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота является моно-, би- или мультицистронной, предпочтительно, как определено в настоящем документе. Кодирующие последовательности в би- или мультицистронной молекуле нуклеиновой кислоты предпочтительно кодируют различные белки или пептиды, определенные в настоящем документе, или их фрагмент или вариант.
- 10 Предпочтительно кодирующие последовательности, кодирующие два или более белков или пептидов, могут быть отделены в би- или мультицистронной нуклеиновой кислоте по меньшей мере одной последовательностью IRES (сайт внутренней посадки рибосомы), как определено ниже. Соответственно, термин «кодирующий два или более белков или пептидов» может означать, но не ограничивается этим, что би- или даже
- 15 мультицистронная нуклеиновая кислота может кодировать, например, по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть или более (предпочтительно различных) белков или пептидов и/или белков или пептидов или их фрагментов или вариантов в рамках определений, представленных в настоящем документе. Более предпочтительно, но не ограничиваясь этим, би- или даже мультицистронная нуклеиновая кислота может
- 20 кодировать, например, по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть или более (предпочтительно различных) белков или пептидов, определенных в настоящем документе, или их фрагментов или вариантов, определенных в настоящем документе. В данном случае так называемая последовательность IRES (сайт внутренней посадки рибосомы), определенная выше, может функционировать как единственный сайт
- 25 связывания рибосомы, однако также она может служить для обеспечения би- или даже мультицистронной нуклеиновой кислоты, определенной выше, которая кодирует несколько белков или пептидов, которые должны быть транслированы рибосомами независимо друг от друга. Примеры последовательностей IRES, которые можно применять согласно настоящему изобретению, включают последовательности из
- 30 пикорнавирусов (например, FMDV), пестивирусов (CFFV), полиовирусов (PV), вирусов энцефаломиокардита (ECMV), вирусов ящура (FMDV), вирусов гепатита С (HCV), вирусов классической чумы свиней (CSFV), вируса лейкоза мышей (MLV), вирусов иммунодефицита обезьян (SIV) или вирусов паралича сверчков (CrPV).

- В соответствии с дополнительным вариантом реализации настоящего изобретения
- 35 по меньшей мере одна кодирующая последовательность в последовательности нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению может кодировать по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь и более белков или пептидов (или их фрагментов и производных), определенных в настоящем документе, соединенных с помощью аминокислотной линкерной последовательности или без нее, причем указанная
- 40 линкерная последовательность может содержать жесткие линкеры, гибкие линкеры, расщепляемые линкеры (например, саморасщепляющиеся пептиды) или их комбинацию. В вышеуказанной последовательности белки или пептиды могут быть одинаковыми или различными или представлять их комбинацию. Конкретные комбинации белков или пептидов могут кодироваться указанной нуклеиновой кислотой, кодирующей по
- 45 меньшей мере два белка или пептида, как объяснено в настоящем документе (также называемой в настоящем документе «полиантигенные конструкции/нуклеиновая кислота»).

Следует отметить, что применительно к настоящему изобретению некоторые

комбинации кодирующих последовательностей (например, содержащие по меньшей мере два различных белка) могут быть созданы с помощью любой комбинации моно-, би- и мультицистронных нуклеиновых кислот и/или полиантигенных конструкций/ нуклеиновой кислоты для получения смеси поли- или даже многовалентных нуклеиновых кислот.

Согласно особенно предпочтительным аспектам кодируемые пептиды или белки выбраны из белков или пептидов человека, вирусов, бактерий и простейших.

а) Терапевтически активные белки

Применительно к настоящему изобретению терапевтически активные белки или пептиды могут кодироваться нуклеиновой кислотой, содержащейся в наночастице согласно настоящему изобретению. Терапевтически активные белки определены в настоящем документе как белки, которые влияют на заживление, профилактически предотвращают или терапевтически лечат заболевание, предпочтительно, определенное в настоящем документе, или представляют собой белки, в которых нуждается индивидум, например, нативный или модифицированный нативный белок, который не вырабатывается или вырабатывается лишь в недостаточных количествах в организме индивидума. Они могут быть выбраны из любого природного или синтетически сконструированного рекомбинантного или выделенного белка, известного специалисту в данной области техники. Терапевтически активные белки могут содержать, но не ограничиваются ими, белки, способные стимулировать или ингибировать передачу сигнала в клетке, например, цитокины, лимфокины, монокины, факторы роста, рецепторы, молекулы для передачи сигнала, факторы транскрипции и т.д.; антикоагулянты; антитромбины; антиаллергические белки; апоптотические факторы или связанные с апоптозом белки, терапевтические активные ферменты и любой белок, связанный с любым приобретенным заболеванием или любым наследственным заболеванием.

б) Антигены

Согласно другому варианту нуклеиновая кислота может кодировать антиген. В соответствии с настоящим изобретением термин «антиген» относится к веществу, которое распознается иммунной системой и способно запускать антигенспецифический иммунный ответ, например, путем образования антител или антигенспецифических Т-клеток в качестве части адаптивного иммунного ответа. В данном случае антигенный эпитоп, фрагмент или пептид белка означает, в частности, эпитопы В-клеток и Т-клеток, которые могут распознаваться В-клетками, антителами или Т-клетками, соответственно.

Применительно к настоящему изобретению антиген, кодируемый нуклеиновой кислотой, обычно представляет собой любой антиген, антигенный эпитоп или антигенный пептид, который соответствует определению выше, и предпочтительно представляет собой белковый и пептидный антиген, например, опухолевый антиген, аллергенный антиген, аутоиммунный собственный антиген, патогенный антиген и т.д. В частности, антиген может представлять собой антиген, происходящий из другого организма, который отличается от организма хозяина (например, субъекта-человка), такой как вирусный антиген, бактериальный антиген, грибковый антиген, протозойный антиген, животный антиген, аллергенный антиген и т.д. Аллергенные антигены, также называемые антигенами аллергии или аллергенами, обычно представляют собой антигены, которые могут вызывать аллергию у субъекта-человка.

Согласно другому варианту антиген, кодируемый нуклеиновой кислотой, может происходить из организма самого хозяина. Примеры таких антигенов включают опухолевые антигены, собственные антигены или аутоантигены, такие как

аутоиммунные собственные антигены, а также (неауто) антигены, определенные в настоящем документе, которые первоначально происходят из клеток вне организма хозяина, но которые были разложены на фрагменты или разрушены внутри организма, ткани или клетки хозяина, например, в результате разрушения протеазами или других

5 типов метаболизма.

Одним классом антигенов, также предпочтительным применительно к настоящему изобретению, является класс опухолевых антигенов. Предпочтительные опухолевые антигены включают те, которые расположены на поверхности опухолевой клетки.

Опухолевые антигены также могут представлять собой белки, которые

10 сверхэкспрессируются в опухолевых клетках по сравнению с нормальными клетками.

Помимо этого, опухолевые антигены также включают антигены, экспрессируемые в клетках, которые сами по себе не являются или которые изначально не являлись

опухолевыми клетками, но связаны с опухолью. Например, интерес также представляют антигены, которые связаны с образованием или повторным образованием кровеносных

15 сосудов, питающих опухоль, в частности, те, которые ассоциированы с

неоваскуляризацией, такие как факторы роста VEGF или bFGF. Антигены,

ассоциированные с опухолью, также включают антигены из клеток или тканей, которые обычно внедряют опухоль. Помимо этого, некоторые другие белки или пептиды могут

20 быть (сверх)экспрессированы и встречаются в повышенных концентрациях в жидкостях организма пациентов, у которых развилась опухоль. Эти вещества также называют

опухолевыми антигенами или ассоциированными с опухолью антигенами, даже если они, строго говоря, не являются антигенами, поскольку они не индуцируют иммунный

ответ.

Опухолевые антигены могут быть далее разделены на опухолеспецифичные антигены

25 (TSA) и ассоциированные с опухолью антигены (ТАА). TSA могут быть представлены только опухолевыми клетками, но не здоровыми клетками. Они обычно возникают в результате опухолеспецифической мутации. ТАА, которые являются более

распространенными, обычно вырабатываются как опухолевыми, так и здоровыми клетками. Эти антигены распознаются иммунной системой, и антиген-презентирующая

30 клетка может быть разрушена цитотоксическими Т-клетками. Помимо этого, опухолевые антигены также могут встречаться на поверхности опухоли в форме, например,

мутированного рецептора. В этом случае они также могут распознаваться антителами.

Если кодируемый антиген является аллергеном, такой антиген может быть выбран из антигенов из любого источника, например, из животных, растений, плесневых

35 грибов, грибов, бактерий и т.д. Аллергены растительного происхождения могут

представлять собой, например, аллергены из пыльцы. Аналогично вышеуказанному, нуклеиновая кислота, включенная в наночастицу, может кодировать нативный антиген

или его фрагмент или эпитоп.

с) Антитела

40 В соответствии с дополнительным вариантом реализации настоящего изобретения соединение нуклеиновой кислоты кодирует антитело или фрагмент антитела. Антитело или его фрагмент выбраны из группы, состоящей из (i) одноцепочечного антитела, (ii) фрагмента одноцепочечного антитела, (iii) многоцепочечного антитела, и (iv) фрагмента многоцепочечного антитела.

45 Обычно антитело состоит из легкой цепи и тяжелой цепи, обе из которых содержат переменные и константные домены. Легкая цепь состоит из N-концевого переменного домена, V_L , и C-концевого константного домена, C_L . Напротив, тяжелая цепь антитела IgG, например, состоит из N-концевого переменного домена, V_H , и

трех константных доменов, C_H1, C_H2 и C_H3.

Согласно одному из предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения антитело выбрано из полноразмерных антител. Такое антитело может представлять собой любое рекомбинантное или природное антитело, в частности, антитело, подходящее для терапевтических, диагностических или научных целей, или антитело, которое ассоциировано с заболеванием, таким как иммунологическое заболевание или рак. Термин «антитело» используется в самом широком смысле и конкретно включает моноклональные и поликлональные антитела (включая агонистические, антагонистические и блокирующие или нейтрализующие антитела) и молекулы антител с полиэпитопной специфичностью. Антитело может принадлежать к любому классу антител, такому как антитела IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. Помимо этого, антитело может быть сходно с антителом, вырабатываемым в результате иммунизации в организме хозяина, или его рекомбинантно сконструированным вариантом, химерным антителом, антителом человека, гуманизированным антителом, биспецифическим антителом, интртелом.

Помимо этого, соединение нуклеиновой кислоты также может кодировать фрагмент антитела, вариант, аддукт или производное антитела, такое как одноцепочечный переменный фрагмент, диатело или триатело. Фрагмент антитела предпочтительно выбран из фрагментов Fab, Fab', F(ab')₂, Fc, Facb, pFe', Fd и Fv вышеупомянутых типов антител. Обычно фрагменты антител известны в данной области техники. Например, фрагмент Fab («фрагмент, связывающий антиген») состоит из одного константного и одного переменного домена каждой из тяжелой и легкой цепей. Два переменных домена связывают эпитоп на специфических антигенах. Две цепи соединены дисульфидной связью. Например, фрагмент scFv («одноцепочечный переменный фрагмент») обычно состоит из переменных доменов легкой и тяжелой цепей. Домены соединены искусственной связью, обычно полипептидной связью, например, пептид, состоящий из 15-25 остатков глицина, пролина и/или серина.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения биологически активный транспортируемый материал содержит комбинацию по меньшей мере двух различных РНК, причем одна РНК кодирует тяжелую цепь антитела или ее фрагмент, и другая РНК кодирует соответствующую легкую цепь антитела или ее фрагмент.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения биологически активный транспортируемый материал содержит комбинацию по меньшей мере двух различных РНК, причем одна РНК кодирует переменную область тяжелой цепи антитела или ее фрагмент, и другая РНК кодирует соответствующую переменную область легкой цепи антитела или ее фрагмент.

Помимо этого, предпочтительно различные цепи антитела или фрагмента антитела кодируются мультистронной нуклеиновой кислотой, также называемой полистронной нуклеиновой кислотой. Согласно другому варианту различные виды антитела или фрагмента антитела кодируются несколькими моностронными нуклеиновыми кислотами.

В соответствии с дополнительным вариантом реализации настоящее изобретение относится к применению по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты для получения биологически активного транспортируемого материала. Если применяют более одной молекулы нуклеиновой кислоты, молекулы нуклеиновых кислот в составе комплекса могут быть разными, т.е., образуют смесь по меньшей мере двух различных (связанных в комплекс) молекул нуклеиновых кислот.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения биологически

активный транспортируемый материал содержит:

- (i) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок, связанный с CRISPR; и/или
- (ii) одну или более последовательностей направляющих РНК.

Термин «белок, связанный с CRISPR» включает, но не ограничивается ими, гибридные белки CAS9 (CRISPR-ассоциированный белок 9), CSY4, dCAS9 и dCAS9-эффекторный домен (активирующий и/или ингибирующий домен). Белок, связанный с CRISPR, может быть получен из любого числа видов, включая, но не ограничиваясь этим, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria innocua* и *Streptococcus thermophilus*.

Термин «направляющая РНК (нРНК)», также называемая «искусственная направляющая РНК», «отдельная направляющая РНК», «малая направляющая РНК» или «онРНК», описывает РНК, содержащую последовательность, содержащую обычно 20-25 нуклеотидов, которая комплементарна одной цепи 5'-НТО представляющего интерес гена, расположенной в 5'-направлении относительно сайта старта транскрипции. Описание конструкции онРНК можно найти, например, в Mali et al., 2013, Science 339: 823-826. Искусственная онРНК воздействует на представляющий интерес ген, направляя белок, связанный с CRISPR, кодируемый искусственным полинуклеотидом, чтобы обеспечить его взаимодействие с представляющим интерес геном, например, геном, транскрипцию которого желательно модулировать. Ген, представляющий интерес, выбирают в зависимости от применения.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения отдельная молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, содержащаяся в композиции или в наночастице(ах) согласно настоящему изобретению, содержит отдельную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный белок, связанный с CRISPR, и одновременно указанную(ые) направляющую(ие) РНК.

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения биологически активный транспортируемый материал содержит комбинацию более чем одной молекулы нуклеиновой кислоты. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения более чем одна молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению содержит указанную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок, связанный с CRISPR, и указанную (ые) направляющую (ие) РНК. В этом случае биологически активный транспортируемый материал содержит две различные РНК, которые экспрессируют как белок Cas9, так и специфичную в отношении мишени нРНК.

миРНК

Согласно дополнительному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения соединение нуклеиновой кислоты, включенное в наночастицу согласно настоящему изобретению, находится в форме дцРНК, предпочтительно миРНК. ДцРНК или миРНК представляет интерес, в частности, в связи с явлением РНК-интерференции. Методика РНК-интерференции (РНКи) в условиях *in vitro* основана на двухцепочечных молекулах РНК (дцРНК), которые запускают специфичное в отношении последовательности подавление экспрессии гена (Zamore (2001) Nat. Struct. Biol. 9: 746-750; Sharp (2001) Genes Dev. 5:485-490; Hannon (2002) Nature 41: 244-251). При трансфекции клеток млекопитающих длинной дцРНК активация протеинкиназы R и RnaseL вызывает неспецифические эффекты, такие как, например, интерфероновый ответ (Stark et al. (1998) Annu. Rev. Biochem. 67: 227-264; He and Katze (2002) Viral Immunol. 15: 95-119). Можно избежать возникновения таких неспецифических эффектов, применяя более короткие, например, 21-23-членные, так называемые миРНК (малые интерферирующие РНК), поскольку миРНК, которые короче 30 п. о., не запускают неспецифические

эффекты (Elbashir et al. (2001) Nature 411: 494-498).

Нуклеиновая кислота может, например, представлять собой двухцепочечную РНК (дцРНК), содержащую от приблизительно 17 до приблизительно 29 пар оснований и предпочтительно от приблизительно 19 до приблизительно 25 пар оснований в длину. ДцРНК предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, например, на 100% (в отношении нуклеотидов дцРНК) комплементарна части последовательности нуклеиновой кислоты терапевтически значимого белка или антигена, описанного выше, либо кодирующей, либо не кодирующей части, предпочтительно кодирующей части. Комплементарность на 90% означает, что при длине дцРНК, например, 20 нуклеотидов, она содержит не более 2 нуклеотидов не являющихся комплементарными соответствующему участку иРНК, кодирующей соответствующий белок. Также предпочтительной является двухцепочечная РНК, последовательность которой полностью комплементарна части нуклеиновой кислоты терапевтически значимого белка или антигена, описанного выше.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения дцРНК имеет общую Структуру 5'-(N₁₇₋₂₉)-3' и предпочтительно общую Структуру 5'-(N₁₉₋₂₅)-3' или 5'-(N₁₉₋₂₄)-3', или 5'-(N₂₁₋₂₃)-3', соответственно, где каждый N представляет собой нуклеотид, и где нуклеотидная последовательность комплементарна части иРНК, которая соответствует терапевтически значимому белку или антигену, описанному выше. По существу все участки, содержащие от 17 до 29, предпочтительно от 19 до 25 пар оснований в длину, которые встречаются в кодирующей области иРНК, могут служить в качестве последовательности-мишени для дцРНК согласно настоящему изобретению. В равной степени, дцРНК, применяемые в качестве нуклеиновой кислоты, также могут быть направлены против нуклеотидных последовательностей (терапевтически значимого) белка или антигена, описанного (в качестве активного ингредиента) в настоящем документе выше, которые расположены вне кодирующей области, в частности, в 5'-некодирующей области иРНК, например, соответственно, против некодирующих областей иРНК, имеющих регуляторную функцию. Последовательность-мишень дцРНК, применяемой в качестве нуклеиновой кислоты, соответственно, может располагаться в транслируемой и нетранслируемой области иРНК и/или в области контрольных элементов белка или антигена, описанных выше. Последовательность-мишень дцРНК, применяемой в качестве нуклеиновой кислоты, также может располагаться в перекрывающейся области нетранслируемой и транслируемой последовательностей; в частности, последовательность-мишень может содержать по меньшей мере один нуклеотид в 5'-направлении относительно старт-триплета кодирующей области иРНК.

Иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты

а) Иммуностимулирующие CpG-содержащие нуклеиновые кислоты

Согласно другому варианту реализации нуклеиновая кислота, включенная в наночастицу согласно настоящему изобретению, представляет собой иммуностимулирующую CpG-содержащую нуклеиновую кислоту, в частности, CpG-РНК или CpG-ДНК, которая предпочтительно индуцирует ответ врожденной иммунной системы. Примеры потенциально подходящих иммуностимулирующих CpG-содержащих нуклеиновых кислот включают, но не ограничиваются ими, одноцепочечную CpG-ДНК (оц CpG-ДНК), двухцепочечную CpG-ДНК (дц CpG-ДНК), одноцепочечную CpG-РНК (оц CpG-РНК) и двухцепочечную CpG-РНК (дц CpG-РНК). Предпочтительно CpG-содержащая нуклеиновая кислота представляет собой CpG-РНК, в частности, одноцепочечную CpG-РНК (оц CpG-РНК). Предпочтительная длина CpG-содержащей

нуклеиновой кислоты касательно нуклеотидов или пар оснований аналогична предпочтительной длине миРНК, описанной выше. Предпочтительно мотивы CpG являются неметилированными.

б) Иммуностимулирующая РНК (исРНК)

5 Согласно другому варианту нуклеиновая кислота, включенная в качестве биологически активного транспортируемого материала в наночастицу согласно настоящему изобретению, может быть в форме иммуностимулирующей РНК (исРНК), которая предпочтительно вызывает ответ врожденной иммунной системы.

10 Такая исРНК может представлять собой двухцепочечную РНК, одноцепочечную РНК или частично двухцепочечную РНК или короткий олигонуклеотид РНК. Согласно одному из предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения предпочтительной является одноцепочечная РНК.

15 Помимо этого, исРНК может быть кольцевой или линейной. Согласно одному из предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения применяют линейную исРНК, такую как линейная одноцепочечная РНК или длинная одноцепочечная РНК.

Помимо этого, исРНК может представлять собой кодирующую или не кодирующую РНК. В соответствии с одним из предпочтительных вариантов реализации в качестве исРНК применяют не кодирующую РНК, такую как не кодирующая одноцепочечная РНК, не кодирующая линейная РНК, не кодирующая линейная одноцепочечная РНК
20 или не кодирующая длинная линейная одноцепочечная РНК.

В соответствии с одним дополнительным предпочтительным вариантом реализации исРНК несет трифосфат на своем 5'-конце, как в случае РНК, транскрибируемой в условиях *in vitro*. Этот предпочтительный параметр применим ко всем вышеупомянутым типам линейной исРНК.

25 Аналогично вышеуказанному, исРНК, применяемая в качестве биологически активного транспортируемого материала в соответствии с настоящим изобретением, может быть выбрана из любого типа или класса РНК, будь то природная или синтетическая РНК, которая способна индуцировать ответ врожденной иммунной системы и/или которая способна усиливать или поддерживать адаптивный иммунный
30 ответ, индуцированный антигеном.

В данном случае иммунный ответ может осуществляться различными способами. Существенным фактором для подходящего адаптивного иммунного ответа является стимуляция определенных субпопуляций Т-клеток. Т-лимфоциты обычно делятся на две субпопуляции: Т-хелперные клетки 1 типа (Th1) и Т-хелперные клетки 2 типа (Th2),
35 с помощью которых иммунная система способна разрушать внутриклеточные (Th1) и внеклеточные (Th2) патогены, такие как антигены. Две популяции Th-клеток отличаются профилем вырабатываемых ими эффекторных белков (цитокинов). Соответственно, Th1-клетки содействуют клеточному иммунному ответу путем активации макрофагов и цитотоксических Т-клеток. Th2-клетки, с другой стороны, содействуют гуморальному
40 иммунному ответу путем стимуляции превращения В-клеток в плазматические клетки и за счет выработки антител (например, против антигенов). Поэтому соотношение Th1 / Th2 имеет большое значение при индукции и поддержании адаптивного иммунного ответа.

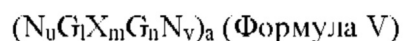
Применительно к настоящему изобретению предпочтительно соотношение Th1 /
45 Th2 для адаптивного иммунного ответа смещено в сторону клеточного ответа (Th1 - ответа), т.е. индуцируется или усиливается клеточный иммунный ответ. Например, врожденная иммунная система, которая может поддерживать адаптивный иммунный ответ, может быть активирована лигандами Toll-подобных рецепторов (TLR). TLR

представляют собой семейство высококонсервативных полипептидов рецепторов распознавания структур (PRR), которые распознают ассоциированные с патогеном молекулярные структуры (PAMP) и играют существенную роль во врожденном иммунитете у млекопитающих. В настоящее время по меньшей мере тринадцать членов семейства были идентифицированы и обозначены как Toll-подобные рецепторы TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 и TLR13. Помимо этого был идентифицирован ряд специфических лигандов TLR. Было обнаружено, что неметилованная бактериальная ДНК и ее синтетические аналоги (CpG-содержащая ДНК) являются лигандами TLR9 (Hemmi H et al. (2000) Nature 408: 740-5; Bauer S et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98, 9237-42). Помимо этого сообщалось, что лиганды некоторых TLR включают некоторые молекулы нуклеиновых кислот и что некоторые типы РНК являются иммуностимулирующими за счет способа, который может как не зависеть от последовательности, так и зависеть от последовательности, причем такие различные иммуностимулирующие РНК могут стимулировать TLR3, TLR7 или TLR8, или внутриклеточные рецепторы, такие как RIG-I, MDA-5 и другие. Lipford et al. определили, что некоторые G, U-содержащие олигорибонуклеотиды являются иммуностимулирующими и действуют через TLR7 и TLR8 (см. WO 03/086280). Как полагают, иммуностимулирующие G,U-содержащие олигорибонуклеотиды, описанные Lipford et al., могут быть получены из источников РНК, включая рибосомную РНК, транспортную РНК, информационную РНК и вирусную РНК.

Соответственно, исРНК, применяемая согласно настоящему изобретению, может включать любую последовательность РНК, известную как иммуностимулирующая, включая, но не ограничиваясь ими, последовательности РНК, представляющие и/или кодирующие лиганды TLR, такие как члены семейства TLR1-TLR13 мыши, или более предпочтительно может быть выбрана из членов семейства TLR1-TLR10 человека, в частности, TLR7 или TLR8; или лиганды для внутриклеточных рецепторов РНК, такие как RIG-I или MDA-5 (Meylan, E., Tschopp, J. (2006): Toll-like receptors and RNA helicases: Two parallel ways to trigger antiviral responses. Mol. Cell 22, 561-569).

ИсРНК может включать рибосомную РНК (рРНК), транспортную РНК (тРНК), информационную РНК (иРНК) и вирусную РНК (вРНК), но не ограничивается ими. Она может содержать до приблизительно 5000 нуклеотидов, например, от приблизительно 5 до приблизительно 5000 нуклеотидов, или от приблизительно 5 до приблизительно 1000, или от приблизительно 500 до приблизительно 5000, или от приблизительно 5 до приблизительно 500, или от приблизительно 5 до приблизительно 250, или от приблизительно 5 до приблизительно 100, или от приблизительно 5 до приблизительно 50, или от приблизительно 5 до приблизительно 30 нуклеотидов, соответственно.

Согласно дополнительному предпочтительному аспекту этого варианта реализации исРНК содержит или состоит из нуклеиновой кислоты Формулы V или VI:



в которой:

G представляет собой гуанозин (гуанин), уридин (урацил) или аналог гуанозина (гуанина) или уридина (урацила), предпочтительно гуанозин (гуанин) или его аналог;

X представляет собой гуанозин (гуанин), уридин (урацил), аденозин (аденин), тимидин (тимин), цитидин (цитозин) или аналог этих нуклеотидов (нуклеозидов), предпочтительно уридин (урацил) или его аналог;

N представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую от

приблизительно 4 до 50, предпочтительно от приблизительно 4 до 40, более предпочтительно от приблизительно 4 до 30 или от 4 до 20 нуклеиновых оснований в длину, причем каждый N независимо выбран из гуанозина (гуанина), уридина (урацила), аденозина (аденина), тимидина (тимина), цитидина (цитозина) или аналога этих нуклеотидов (нуклеозидов);

а представляет собой целое число от 1 до 20, предпочтительно от 1 до 15, наиболее предпочтительно от 1 до 10;

l представляет собой целое число от 1 до 40,

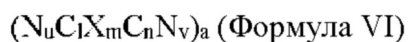
где, если l=1, G представляет собой гуанозин (гуанин) или его аналог, и если l>1, по меньшей мере 50% этих нуклеотидов (нуклеозидов) представляют собой гуанозин (гуанин) или его аналог;

m представляет собой целое число и составляет по меньшей мере 3; причем, если m=3, X представляет собой уридин (урацил) или его аналог, и если m>3, присутствуют по меньшей мере 3 последовательных уридина (урацила) или аналога уридина (урацила);

n представляет собой целое число от 1 до 40, где, если n=1, G представляет собой гуанозин (гуанин) или его аналог, и если n (1, по меньшей мере 50% этих нуклеотидов (нуклеозидов) представляют собой гуанозин (гуанин) или его аналог;

u, v независимо представляют собой целое число от 0 до 50, причем предпочтительно, если u=0, v≥1, или если v=0, u≥1;

при этом молекула нуклеиновой кислоты Формулы V содержит по меньшей мере 50 нуклеотидов, предпочтительно по меньшей мере 100 нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 150 нуклеотидов, еще более предпочтительно по меньшей мере 200 нуклеотидов и наиболее предпочтительно по меньшей мере 250 нуклеотидов в длину;



в которой:

C представляет собой цитидин (цитозин), уридин (урацил) или аналог цитидина (цитозина) или уридина (урацила), предпочтительно цитидин (цитозин) или его аналог;

X представляет собой гуанозин (гуанин), уридин (урацил), аденозин (аденин), тимидин (тимин), цитидин (цитозин) или аналог вышеупомянутых нуклеотидов (нуклеозидов), предпочтительно уридин (урацил) или его аналог;

каждый N представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую от приблизительно 4 до 50, предпочтительно от приблизительно 4 до 40, более предпочтительно от приблизительно 4 до 30 или от 4 до 20 нуклеиновых оснований в длину, причем каждый N независимо выбран из гуанозина (гуанина), уридина (урацила), аденозина (аденина), тимидина (тимина), цитидина (цитозина) или аналога этих нуклеотидов (нуклеозидов);

а представляет собой целое число от 1 до 20, предпочтительно от 1 до 15, наиболее предпочтительно от 1 до 10;

l представляет собой целое число от 1 до 40, причем, если l=1, C представляет собой цитидин (цитозин) или его аналог, и если l>1, по меньшей мере 50% этих нуклеотидов (нуклеозидов) представляют собой цитидин (цитозин) или его аналог;

m представляет собой целое число и составляет по меньшей мере 3; причем, если m=3, X представляет собой уридин (урацил) или его аналог, и если m>3, присутствуют по меньшей мере 3 последовательных уридина (урацила) или аналога уридина (урацила);

n представляет собой целое число от 1 до 40, причем, если n=1, C представляет собой цитидин (цитозин) или его аналог, и если n>1, по меньшей мере 50% этих нуклеотидов

(нуклеозидов) представляют собой цитидин (цитозин) или его аналог;

и, v независимо представляют собой целое число от 0 до 50, причем предпочтительно, если $u=0$, $v \geq 1$, или если $v=0$, $u \geq 1$;

при этом молекула нуклеиновой кислоты Формулы VI содержит по меньшей мере 50 нуклеотидов, предпочтительно по меньшей мере 100 нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 150 нуклеотидов, еще более предпочтительно по меньшей мере 200 нуклеотидов и наиболее предпочтительно по меньшей мере 250 нуклеотидов в длину.

В случае Формулы VI любое из приведенных выше определений для элементов N (т.е. N_u и N_v) и X (X_m), в частности, для центральной структуры, определенной выше, а также для целых чисел a, l, m, n, u и v, также применимо к элементам Формулы V, соответственно, причем в Формуле VI центральная структура определяется как $C_l X_m C_n$. Определение граничных элементов N_u и N_v идентично определениям, приведенным выше для N_u и N_v .

В соответствии с особенно предпочтительным аспектом этого варианта реализации молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с Формулой V может быть выбрана, например, из любой из следующих последовательностей:

UAGCGAAGCUCUUGGACCUAGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGGUGCGUUCUAG

AAGUACACG (SEQ ID NO: 1)

UAGCGAAGCUCUUGGACCUAGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGGUGCGUUCUAG

AAGUACACGAUCGCUUCGAGAACCUGGAUCCAAAAA AAAAACCACGCAA
GGAUUCUUC AUGUGC (SEQ ID NO: 2)

GGGAGAAAGCUCAAGCUUGGAGCAAUGCCCGCACAUUGAGGAAACCGAGUU

GCAUAUCUCAGAGUAUUGGCCCCCGUGUAGGUUAUUCUUGACAGACAGUGGAGC

UUAUUCACUCCCAAGGAUCCGAGUCGCAUACUACGGUACUGGUGACAGACCUAGGU

CGUCAGUUGACCAGUCCGCCACUAGACGUGAGUCCGUCAAAGCAGUUAGAUGUUA

CACUCUAUUAGAUC (SEQ ID NO: 3)

GGGAGAAAGCUCAAGCUUGGAGCAAUGCCCGCACAUUGAGGAAACCGAGUU

GCAUAUCUCAGAGUAUUGGCCCCCGUGUAGGUUAUUCUUGACAGACAGUGGAGC

UUAUUCACUCCCAAGGAUCCGAGUCGCAUACUACGGUACUGGUGACAGACCUAGGU

CGUCAGUUGACCAGUCCGCCACUAGACGUGAGUCCGUCAAAGCAGUUAGAUGUUA

CACUCUAUUAGAUCUCGGAUUACAGCUGGAAGGAGCAGGAGUAGUGUUCUUGCU

CUAAGUACCGAGUGUGCCCAAUACCCGAUCAGCUUAUUAACGAACGGCUCCUCCU

CUUAGACUGCAGCGUAAGUGCGGAUUCUGGGGAUCAAUUAACUGACUGCCUGGA

UUACCCUCGGACAUUAACCUUGUAGCACGCUGUUGCUGUAUAGGUAGACCAACGC

CCACUCGAGUAGACCAGCUCUCUUAUGUCCGGACAAUGAUAGGAGGCGCGGUCAAU

CUACUUCUGGCUAGUUAAGAAUAGGCUGCACCGACCUCUAUAAGUAGCGUGUCCU

CUAG (SEQ ID NO: 4)

GGGAGAAAGCUCAAGCUUGGAGCAAUGCCCCGACAUUGAGGAAACCGAGUT
 GCAUAUCUCAGAGUAUUGGGCCCCGUGUAGGUUAUUCUUGACAGACAGUGGAGC
 UUAUUCACUCCCAGGAUCCGAGUCGCAUACUACGGUACUGGUGACAGACCUAGGU
 5 CGUCAGUUGACCAGUCCGCCACUAGACGUGAGUCCGUCAAAGCAGUAGAUGTUA
 CACUCUAUUAGAUCUCGGAUUACAGCUGGAAGGAGCAGGAGUAGUGUUCUUGCU
 CUAAGUACCGAGUGUGCCCCAAUACCCGAUCAGCUUAUUAACGAACGGGCUCCUCCU
 CUUAGACUGCAGCGUAAGUGCGGAUUCUGGGGAUCAAAUACUGACUGCCUGGA
 10 UUAACCCUCGGACAUAUAACCUUGUAGCACGCGUGUUGCUGUAUAGGUGACCAACGC
 CCACUCGAGUAGACCAGCUCUCUAGUCCGGACAAUGAUAGGAGGCGCGGUCAAU
 CUACUUCUGGCUAGUUAAGAAUAGGCUGCACCGACCUCUAUAAGUAGCGUGUCCU
 CUAGAGCUACGCAGGUUCGCAAUAAAAGCGUUGAUAGUGUGCAUAGAACAGAC
 15 CUCUUAUUCGGUGAAACGCCAGAAUGCUAAAUTCCAAUAACUCUCCCCAAAACGC
 GUACGGCCGAAGACGCGCGCUUAUCUUGUGUACGUUCUCGCACAUGGAAGAAUCA
 GCGGGCAUGGUGGUAGGGCAAUAGGGGAGCUGGGUAGCAGCGAAAAAGGGCCCC
 UGCGCACGUAGCUUCGCUGUUCGUCUGAAACAACCCGGCAUCCGUGUAGCGAUC
 20 CCGUUAUCAGUGUUAUUCUUGUGCGCACUAAGAUAUAGGUGUAGUCGACAAUA
 ACAGCGUCUUGGCAGAUUCUGGUCACGUGCCCUAUGCCCGGGCUUGUGCCUCUCA
 GGUGCACAGCGAUACUUAAGCCUUCAAGGUACUCGACGUGGGUACCGAUUCGU
 GACACUUCCUAAGAUUAUCCACUGUGUAGCCCCGCACCGCCGACCUAAACUGG
 25 UCCAAUGUAUACGCAUUCGCUGAGCGGAUCGAUAAUAAAAGCUUGAAUU (SEQ ID
 NO: 5)

GGGAGAAAGCUCAAGCUUAUCCAAGUAGGCUUGGUCACCUGUACAACGUAGC
 30 CGGUAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGACCGUCUCAAGGUCCAAGUUAGUCUG
 CCUAUAAAGGUGCGGAUCCACAGCUGAUGAAAGACUUGUGCGGUACGGUUAUUC
 UCCCCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUAGUAAAUGCGUCUACUGAAUCCAGCGAU
 GAUGCUGGCCCAGAUC (SEQ ID NO: 6)

GGGAGAAAGCUCAAGCUUAUCCAAGUAGGCUUGGUCACCUGUACAACGUAGC
 35 CGGUAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGACCGUCUCAAGGUCCAAGUUAGUCUG
 CCUAUAAAGGUGCGGAUCCACAGCUGAUGAAAGACUUGUGCGGUACGGUUAUUC
 UCCCCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUAGUAAAUGCGUCUACUGAAUCCAGCGAU
 40 GAUGCUGGCCCAGAUCUUCGACCACAAGUGCAUUAUAGUAGUCAUCGAGGGGUCGCC
 UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGCCCAGUUCUGAGACUUCGCUAGAGACUAC
 AGUUAACAGCUGCAGUAGUAACCACUGCGGCUAUUGCAGGAAAUCCCGUUCAGGU
 45 UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCCGCUCACUAUGAUUAAGAACCAGGUGGAGUGUC
 ACUGCUCUCGAGGUCUCACGAGAGCGCUCGAUACAGUCCUUGGAAGAAUCUUUUU
 UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGUGCGACGAUCACAGAGAACUUCUAUUCAUGCAGGUC
 UGCUCUAG (SEQ ID NO: 7)

[illegible]

В соответствии с другим особенно предпочтительным вариантом реализации молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с Формулой VI может быть выбрана, например, из любой из следующих последовательностей:

UAGCGAAGCUCUUGGACCUACCUUUUUUUUUUUUUUCCCUGCGUCCUAGA
AGUACACG

(SEQ ID NO: 9)

ИЛИ

TAGCGAAGCUCUUGGACCUACCUUUUUUUUUUUUUUUCCUGCGUCCUAG
AAAGUAACACGAUCGCUUCGAGAACCUGGAUGGAAAAAAAAAAAAAAGGGACGCA
AGGAUCUUCAUGUGC

(SEQ ID NO: 10).

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения соединение нуклеиновой кислоты, применяемое в качестве биологически активного транспортируемого материала в соответствии с настоящим изобретением, находится в форме химически модифицированной нуклеиновой кислоты или представляет собой стабилизированную нуклеиновую кислоту, предпочтительно стабилизированную РНК или ДНК, такую как РНК, которая по существу устойчива к разрушению экзо- или

эндонуклеазой в условиях *in vivo*.

Химические модификации:

В настоящем документе термины «модификация (и)», «химическая (ие) модификация (и)», «модифицированный» и тому подобное в отношении нуклеиновой кислоты могут относиться к химическим модификациям, включающим модификации остова, а также модификации сахара или модификации основания. Соответствующий продукт модификации может быть назван, например, «модифицированная нуклеиновая кислота» или «химически модифицированная нуклеиновая кислота».

Модификация остова применительно к настоящему изобретению представляет собой модификацию, в которой фосфаты остова нуклеотидов, содержащихся в соединении нуклеиновой кислоты, предпочтительно иРНК, химически модифицированы.

Модификация сахара представляет собой химическую модификацию сахара нуклеотидов нуклеиновой кислоты. Помимо этого, модификация основания применительно к настоящему изобретению представляет собой химическую модификацию фрагмента основания нуклеотидов искусственной нуклеиновой кислоты, предпочтительно иРНК. В данном случае аналоги или модификации нуклеотидов предпочтительно выбраны из тех аналогов нуклеотидов, которые применимы для транскрипции и/или трансляции.

Модификации сахара:

Как уже упоминалось, фрагмент сахара нуклеозидов и нуклеотидов может быть модифицирован. Например, 2'-гидроксильная группа (ОН) может быть модифицирована или заменена рядом различных «окси» или «дезоксид» заместителей. Примеры модификаций «окси»-2'-гидроксильной группы включают, но не ограничиваются ими, алкокси или арилокси (-OR, например, R=H, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар); полиэтиленгликоли (ПЭГ), $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$;

«блокированные» нуклеиновые кислоты (LNA), в которых 2'-гидроксил связан, например, метиленовым мостиком, с 4'-углеродом этого же рибозного сахара; и аминоксильные группы (-O-амино, где аминоксильная группа, например, NRR, может представлять собой алкиламино, диалкиламино, гетероциклический, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамин, полиамино) или аминоксильные.

«Дезоксид» модификации включают водород, амино (например, NH₂; алкиламино, диалкиламино, гетероциклический, ариламино, диариламино, гетероариламино, дигетероариламино или аминоксильную); или аминоксильная группа может быть присоединена к сахару за счет линкера, причем линкер содержит один или более атомов C, N и O.

Сахарная группа также может содержать один или более атомов углерода, которые имеют противоположную стереохимическую конфигурацию, чем у соответствующего углерода в рибозе. Соответственно, искусственная нуклеиновая кислота, предпочтительно иРНК, может включать нуклеотиды, содержащие, например, арабинозу в качестве сахара.

Модификации остова:

Фосфатные группы остова соединения нуклеиновой кислоты могут быть модифицированы путем замены одного или более атомов кислорода другим заместителем. Помимо этого, модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды могут включать полную замену немодифицированного фосфатного фрагмента модифицированным фосфатом, описанным в настоящем документе. Примеры модифицированных фосфатных групп включают, но не ограничиваются ими, фосфотиоат, фосфоселенаты, боранфосфаты, сложные эфиры боранфосфата, гидрофосфонаты, фосфоамидаты, алкил- или арилфосфонаты и сложные фосфотриэфиры. Оба несоединяющих кислорода в фосфодитиоатах заменены серой.

Фосфатный линкер также может быть модифицирован путем замены соединяющего кислорода азотом (мостиковые фосфоамидаты), серой (мостиковые фосфотиоаты) и углеродом (мостиковые метиленфосфонаты).

Модификации оснований:

- 5 Необязательно модификация может относиться к фрагменту нуклеинового основания соединения нуклеиновой кислоты. Примеры нуклеиновых оснований, обнаруженных в нуклеиновой кислоте, такой как РНК, включают, но не ограничиваются ими, аденин, гуанин, цитозин и урацил. Например, нуклеозиды и нуклеотиды, описанные в настоящем документе, могут быть химически модифицированы на поверхности большой бороздки.
- 10 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химические модификации большой бороздки могут включать аминогруппу, тиольную группу, алкильную группу или галогеновую группу.

- Согласно особенно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения модификации оснований выбраны из 2-амино-6-хлорпуринрибозид-5'-
- 15 трифосфата, 2-аминопуринрибозид-5'-трифосфата; 2-аминоаденозин-5'-трифосфата, 2'-амино-2'-дезокситидинтрифосфата, 2-тиоцитидин-5'-трифосфата, 2-тиоуридин-5'-трифосфата, 2'-фтортимидин-5'-трифосфата, 2'-О-метилюридин-5'-трифосфата, 4-тиоуридин-5'-трифосфата, 5-аминоаллилцитидин-5'-трифосфата, 5-аминоаллилуридин-5'-трифосфата, 5-бромцитидин-5'-трифосфата, 5-бромурин-5'-трифосфата, 5-бром-2'-
- 20 дезокситидин-5'-трифосфата, 5-бром-2'-дезоксуридин-5'-трифосфата, 5-йодцитидин-5'-трифосфата, 5-йод-2'-дезокситидин-5'-трифосфата, 5-йодуридин-5'-трифосфата, 5-йод-2'-дезоксуридин-5'-трифосфата, 5-метилцитидин-5'-трифосфата, 5-метилуридин-5'-трифосфата, 5-пропинил-2'-дезокситидин-5'-трифосфата, 5-пропинил-2'-дезоксуридин-5'-трифосфата, 6-азацитидин-5'-трифосфата, 6-азауридин-5'-трифосфата,
- 25 6-хлорпуринрибозид-5'-трифосфата, 7-дезааденозин-5'-трифосфата, 7-дезагуанозин-5'-трифосфата, 8-азааденозин-5'-трифосфата, 8-азидоаденозин-5'-трифосфата, бензимидазолрибозид-5'-трифосфата, N1-метиладенозин-5'-трифосфата, N1-метилгуанозин-5'-трифосфата, N6-метиладенозин-5'-трифосфата, Об-метилгуанозин-5'-трифосфата, псевдоуридин-5'-трифосфата или пурамицин-5'-трифосфата, ксантозин-5'-трифосфата. Особенно предпочтительными являются нуклеотиды для модификаций оснований, выбранные из группы нуклеотидов с модифицированным основанием, состоящей из 5-метилцитидин-5'-трифосфата, 7-дезагуанозин-5'-трифосфата, 5-бромцитидин-5'-трифосфата и псевдоуридин-5'-трифосфата.

- Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения
- 35 модифицированные нуклеозиды включают пиридин-4-он-рибонуклеозид, 5-азауридин, 2-тио-5-азауридин, 2-тиоуридин, 4-тиопсевдоуридин, 2-тиопсевдоуридин, 5-гидроксиуридин, 3-метилуридин, 5-карбоксиметилуридин, 1-карбоксиметилпсевдоуридин, 5-пропинилуридин, 1-пропинилпсевдоуридин, 5-тауринметилуридин, 1-тауринометилпсевдоуридин, 5-тауринометил-2-тиоуридин, 1-тауринометил-4-тиоуридин,
- 40 5-метилуридин, 1-метилпсевдоуридин, 4-тио-1-метилпсевдоуридин, 2-тио-1-метилпсевдоуридин, 1-метил-1-дезапсевдоуридин, 2-тио-1-метил-1-дезапсевдоуридин, дигидроуридин, дигидропсевдоуридин, 2-тиодигидроуридин, 2-тиодигидропсевдоуридин, 2-метоксиуридин, 2-метокси-4-тиоуридин, 4-метоксипсевдоуридин и 4-метокси-2-тиопсевдоуридин.

- 45 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения модифицированные нуклеозиды включают 5-азацитидин, псевдоизоцитидин, 3-метилцитидин, N4-ацетилцитидин, 5-формилцитидин, N4-метилцитидин, 5-гидроксиметилцитидин, 1-метилпсевдоизоцитидин, пирролцитидин,

пирролпсевдоизоцитидин, 2-тиоцитидин, 2-тио-5-метилцитидин, 4-тиопсевдоизоцитидин, 4-тио-1-метилпсевдоизоцитидин, 4-тио-1-метил-1-дезапсевдоизоцитидин, 1-метил-1-дезапсевдоизоцитидин, зебуларин, 5-азазебуларин, 5-метилзебуларин, 5-аза-2-тиозебуларин, 2-тиозебуларин, 2-метоксицитидин, 2-метокси-5-метилцитидин, 4-метоксипсевдоизоцитидин и 4-метокси-1-метилпсевдоизоцитидин.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения модифицированные нуклеозиды включают 2-аминопурин, 2,6-диаминопурин, 7-дезааденин, 7-деза-8-азааденин, 7-деза-2-аминопурин, 7-деза-8-аза-2-аминопурин, 7-деза-2,6-диаминопурин, 7-деза-8-аза-2,6-диаминопурин, 1-метиладенозин, N6-метиладенозин, N6-изопентениладенозин, N6-(цис-гидроксиизопентенил)аденозин, 2-метилтио-N6-(цис-гидроксиизопентенил)аденозин, N-глицинилкарбамоиладенозин, N6-треонилкарбамоиладенозин, 2-метилтио-N6-треонилкарбамоиладенозин, N6,N6-диметиладенозин, 7-метиладенин, 2-метилтиоаденин и 2-метоксиаденин.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения модифицированные нуклеозиды включают инозин, 1-метиринозин, вайозин, вайбутозин, 7-дезагуанозин, 7-деза-8-азагуанозин, 6-тиогуанозин, 6-тио-7-дезагуанозин, 6-тио-7-деза-8-азагуанозин, 7-метилгуанозин, 6-тио-7-метилгуанозин, 7-метиринозин, 6-метоксигуанозин, 1-метилгуанозин, N2-метилгуанозин, N2,N2-диметилгуанозин, 8-оксогуанозин, 7-метил-8-оксогуанозин, 1-метил-6-тиогуанозин, N-метил-6-тиогуанозин и N2,N2-диметил-6-тиогуанозин.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нуклеотид может быть модифицирован на поверхности большой бороздки и может содержать замену водорода на С-5 урацила метальной группой или галогеновой группой.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения модифицированный нуклеозид представляет собой 5'-О-1-тиофосфатаденозин, 5'-О-1-тиофосфатцитидин, 5'-О-1-тиофосфатгуанозин, 5'-О-1-тиофосфатуридин или 5'-О-1-тиофосфатпсевдоуридин.

Согласно дополнительным конкретным вариантам реализации настоящего изобретения модифицированное соединение нуклеиновой кислоты, предпочтительно иРНК, может содержать модификации нуклеозидов, выбранные из 6-азацитидина, 2-тиоцитидина, α-тиоцитидина, псевдоизоцитидина, 5-аминоаллилуридина, 5-йодуридина, N1-метилпсевдоуридина, 5,6-дигидроуридина, α-тиоуридина, 4-тиоуридина, 6-азауридина, 5-гидроксиуридина, дезокситимидина, 5-метилуридина, пирролцитидина, инозина, α-тиогуанозина, 6-метилгуанозина, 5-метилцитидина, 8-оксогуанозина, 7-дезагуанозина, N1-метиладенозина, 2-амино-6-хлорпурина, N6-метил-2-аминопурина, псевдоизоцитидина, 6-хлорпурина, N6-метиладенозина, α-тиоаденозина, 8-азидоаденозина и 7-дезааденозина.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота содержит модификацию липидом. Такая модифицированная липидом нуклеиновая кислота или РНК, как определено в настоящем документе, обычно дополнительно содержит по меньшей мере один линкер, ковалентно соединенный с этой нуклеиновой кислотой или РНК, и по меньшей мере один липид, ковалентно соединенный с соответствующим линкером. Согласно другому варианту модифицированная липидом нуклеиновая кислота включает по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, определенную в настоящем документе, и по меньшей мере один (бифункциональный) липид, ковалентно соединенный (без линкера) с этой нуклеиновой кислотой. Согласно третьему варианту модифицированная липидом нуклеиновая кислота содержит молекулу нуклеиновой кислоты, определенную в настоящем документе, по меньшей мере один

линкер, ковалентно соединенный с этой РНК, и по меньшей мере один липид, ковалентно соединенный с соответствующим линкером, а также по меньшей мере один (бифункциональный) липид, ковалентно соединенный (без линкера) с этой нуклеиновой кислотой. В данном случае особенно предпочтительным является то, что модификация липидом присутствует в концевых областях линейной последовательности нуклеиновой кислоты.

В соответствии с другим предпочтительным вариантом реализации настоящего изобретения модифицированная последовательность нуклеиновой кислоты, определенная в настоящем документе, в частности, модифицированная РНК, определенная в настоящем документе, может быть модифицирована путем добавления так называемой «5»-кэп структуры, которая предпочтительно стабилизирует нуклеиновую кислоту, как описано в настоящем документе. 5'-Кэп представляет собой соединение, обычно модифицированное нуклеотидное соединение, которое обычно «кэпирует» 5'-конец зрелой РНК. Обычно 5'-кэп может быть образован модифицированным нуклеотидом, в частности, производным гуанинового нуклеотида. Предпочтительно 5'-кэп соединен с 5'-концом за счет 5'-5'-трифосфатной связи. 5'-кэп может быть метилирован, например, m7GpppN, где N представляет собой конец 5'-нуклеотида нуклеиновой кислоты, несущий 5'-кэп, обычно 5'-конец РНК. m7GpppN представляет собой 5'-кэп структуру, которая встречается в природных условиях в РНК, транскрибируемой полимеразой II, и поэтому предпочтительно не рассматривается как модификация, содержащаяся в модифицированной РНК в данном случае. Соответственно, модифицированная последовательность РНК согласно настоящему изобретению может содержать m7GpppN в виде 5'-кэпа, но дополнительно модифицированная последовательность РНК обычно содержит по меньшей мере одну дополнительную модификацию, определенную в настоящем документе.

Дополнительные примеры 5'-кэп структур включают глицерил, остаток (фрагмент) инвертированного дезоксинуклеотида с удаленным азотистым основанием, 4',5'-метиленнуклеотид, 1-бета-D-эритрофуранозилнуклеотид, 4'-тионуклеотид, карбоциклический нуклеотид, 1,5-ангидрогекситолнуклеотид, L-нуклеотиды, альфа-нуклеотид, нуклеотид с модифицированным основанием, треопентофуранозилнуклеотид, ациклический 3',4'-секонуклеотид, ациклический 3,4-дигидроксипентилнуклеотид, ациклический 3,5-дигидроксипентилнуклеотид, фрагмент 3'-3'-инвертированного нуклеотида, фрагмент 3'-3'-инвертированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием, фрагмент 3'-2'-инвертированного нуклеотида, фрагмент 3'-2'-инвертированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 1,4-бутандиолфосфат, 3'-фосфоамидат, гексилфосфат, аминоксептилфосфат, 3'-фосфат, 3'-фосфотиоат, фосфодитиоат или мостиковый или немостиковый метилфосфонатный фрагмент. В данном случае такие модифицированные 5'-кэп структуры рассматриваются как по меньшей мере одна модификация.

Особенно предпочтительными модифицированными 5'-кэп структурами являются cap1 (метилирование рибозы нуклеотида, смежного с m7G), cap2 (дополнительное метилирование рибозы 2-го нуклеотида после m7G), cap3 (дополнительное метилирование рибозы 3-го нуклеотида после m7G), cap4 (метилирование рибозы 4-го нуклеотида после m7G), ARCA (аналог кэп-структуры, обеспечивающий правильную ориентацию), модифицированный ARCA (например, модифицированный фосфотиоатом ARCA), инозин, N1-метилгуанозин, 2'-фторгуанозин, 7-дезагуанозин, 8-оксогуанозин, 2-аминогуанозин, LNA-гуанозин и 2-азидогуанозин. Соответственно, РНК согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит 5'-кэп структуру.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения 5'-кэп структура добавляется котранскрипционно с использованием кэп-аналогов, определенных в настоящем документе, в реакции транскрипции РНК в условиях *in vitro*, как определено в настоящем документе. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения 5'-кэп структура добавляется посредством ферментативного кэпирования с использованием кэпирующих ферментов (например, кэпирующих ферментов вируса осповакцины).

Необязательно может быть выбрана нуклеиновая кислота, которая представляет собой иРНК, которая по существу устойчива к разрушению экзо- или эндонуклеазами в условиях *in vivo*. Такая стабилизация может быть осуществлена, например, путем химической модификации фосфатов остова. Дополнительно можно применять модификации сахара или основания. иРНК также может быть стабилизирована против разрушения РНКазами путем добавления так называемой «5'-кэп» структуры. В этой связи особенно предпочтительными в качестве 5'-кэп структуры являются G(5')ppp(5')G или m7G(5')ppp(5')N (N представляет собой A, G, C или U). В соответствии с другим примером иРНК может содержать полиА-хвост на 3'-конце, который обычно содержит от приблизительно 10 до приблизительно 200 аденозиновых нуклеотидов, предпочтительно от приблизительно 10 до приблизительно 100 аденозиновых нуклеотидов или от приблизительно 20 до приблизительно 100 аденозиновых нуклеотидов, или даже от приблизительно 40 до приблизительно 80 аденозиновых нуклеотидов. В соответствии с дополнительным примером иРНК может содержать полиС-хвост на 3'-конце, который обычно содержит от приблизительно 10 до приблизительно 200 цитозиновых нуклеотидов, предпочтительно от приблизительно 10 до приблизительно 100 цитозиновых нуклеотидов или от приблизительно 20 до приблизительно 70 цитозиновых нуклеотидов, или от приблизительно 20 до приблизительно 60, или даже от приблизительно 10 до приблизительно 40 цитозиновых нуклеотидов.

В соответствии с другим вариантом реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению может быть модифицирована и, соответственно, стабилизирована путем модификации содержания гуанозина/цитозина (G/C) в последовательности нуклеиновой кислоты.

Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения содержание G/C кодирующей части последовательности нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению модифицировано, в частности, повышено, по сравнению с содержанием G/C кодирующей части соответствующей последовательности нуклеиновой кислоты дикого типа, т.е. немодифицированной нуклеиновой кислоты. Аминокислотная последовательность, кодируемая нуклеиновой кислотой, предпочтительно не модифицирована по сравнению с аминокислотной последовательностью, кодируемой соответствующей нуклеиновой кислотой дикого типа. Эта модификация последовательности нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению основана на том факте, что последовательность любой области нуклеиновой кислоты, в частности, последовательность любой области РНК, подлежащей трансляции, важна для эффективной трансляции данной нуклеиновой кислоты, в частности, данной РНК. Соответственно, состав нуклеиновой кислоты и последовательность различных нуклеотидов являются важными. В частности, в случае РНК, последовательности, имеющие повышенное содержание G (гуанозина)/C (цитозина), являются более стабильными, чем последовательности, имеющие повышенное содержание A (аденозина)/U (урацила). В соответствии с настоящим изобретением кодоны нуклеиновой кислоты,

соответственно, изменяются по сравнению с соответствующей нуклеиновой кислотой дикого типа, сохраняя при этом транслированную аминокислотную последовательность, так, что они включают повышенное количество нуклеотидов G/C. Поскольку одна и та же аминокислота кодируется несколькими кодонами (так называемая вырожденность генетического кода), можно определить наиболее благоприятные кодоны для придания стабильности (так называемое использование альтернативных кодонов). В зависимости от аминокислоты, которая будет кодироваться нуклеиновой кислотой, существуют различные возможности для модификации последовательности нуклеиновой кислоты по сравнению с ее последовательностью дикого типа.

Следующие модификации можно применять для молекул РНК, но также можно применять к молекулам ДНК: в случае аминокислот, которые кодируются кодонами, содержащими исключительно нуклеотиды G или C, модификация кодона не требуется. Соответственно, кодоны для Pro (CCC или CCG), Arg (CGC или CGG), Ala (GCC или GCG) и Gly (GGC или GGG) не требуют модификации, поскольку A или U не присутствуют. Напротив, кодоны, которые содержат нуклеотиды A и/или U, могут быть модифицированы путем замены другими кодонами, которые кодируют те же аминокислоты, но не содержат A и/или U. Примеры включают: кодоны для Pro могут быть модифицированы из CCU или CCA в CCC или CCG; кодоны для Arg могут быть модифицированы из CGU или CGA, или AGA, или AGG в CGC или CGG; кодоны для Ala могут быть модифицированы из GCU или GCA в GCC или GCG; кодоны для Gly могут быть модифицированы из GGU или GGA в GGC или GGG. В других случаях, несмотря на то, что нуклеотиды A или U не могут быть удалены из кодонов, однако возможно уменьшить содержание A и U с использованием кодонов, которые имеют более низкое содержание нуклеотидов A и/или U. Примеры включают: кодоны для Phe могут быть модифицированы из UUU в UUC; кодоны для Leu могут быть модифицированы из UUA, UUG, CUU или CUA в CUC или CUG; кодоны для Ser могут быть модифицированы из UCU или UCA, или AGU в UCC, UCG или AGC; кодон для Thr может быть модифицирован из UAU в UAC; кодон для Cys может быть модифицирован из UGU в UGC; кодон для His может быть модифицирован из CAU в CAC; кодон для Gln может быть модифицирован из CAA в CAG; кодоны для Ile могут быть модифицированы из AUU или AUA в AUC; кодоны для Thr могут быть модифицированы из ACU или ACA в ACC или ACG; кодон для Asn может быть модифицирован из AAU в AAC; кодон для Lys может быть модифицирован из AAA в AAG; кодоны для Val могут быть модифицированы из GUU или GUA в GUC или GUG; кодон для Asp может быть модифицирован из GAU в GAC; кодон для Glu может быть модифицирован из GAA в GAG; стоп-кодон UAA может быть модифицирован в UAG или UGA. В случае кодонов для Met (AUG) и Trp (UGG), с другой стороны, модификация последовательности невозможна. Перечисленные выше замены можно применять по отдельности или во всех возможных комбинациях для увеличения содержания G/C в последовательности РНК согласно настоящему изобретению по сравнению с соответствующей ей РНК дикого типа (т.е. исходной последовательностью). Соответственно, например, все кодоны для Thr, встречающиеся в последовательности дикого типа, могут быть модифицированы в ACC (или ACG). Однако предпочтительно, например, применяют комбинации указанных выше возможностей замены:

- замену всех кодонов, кодирующих Thr в исходной последовательности (РНК дикого типа), кодоном ACC (или ACG), и
- замену всех кодонов, первоначально кодирующих Ser, кодоном UCC (или UCG, или AGC); замену всех кодонов, кодирующих Ile в исходной последовательности,

кодоном AUC, и

- замену всех кодонов, первоначально кодирующих Lys, кодоном AAG, и
- замену всех кодонов, первоначально кодирующих Tyr, кодоном UAC; замену всех кодонов, кодирующих Val в исходной последовательности, кодоном GUC (или GUG),

5 и

- замену всех кодонов, первоначально кодирующих Glu, кодоном GAG, и
 - замену всех кодонов, первоначально кодирующих Ala, кодоном GCC (или GCG), и
 - замену всех кодонов, первоначально кодирующих Arg, кодоном CGC (или CGG);
- замену всех кодонов, кодирующих Val в исходной последовательности, кодоном GUC

10 (или GUG), и

- замену всех кодонов, первоначально кодирующих Glu, кодоном GAG, и
- замену всех кодонов, первоначально кодирующих Ala, кодоном GCC (или GCG), и
- замену всех кодонов, первоначально кодирующих Gly, кодоном GGC (или GGG),

и

15 - замену всех кодонов, первоначально кодирующих Asn, кодоном AAC; замену всех кодонов, кодирующих Val в исходной последовательности, кодоном GUC (или GUG),

и

- замену всех кодонов, первоначально кодирующих Phe, кодоном UUC, и
- замену всех кодонов, первоначально кодирующих Cys, кодоном UGC, и

20 - замену всех кодонов, первоначально кодирующих Leu, кодоном CUG (или CUC),

и

- замену всех кодонов, первоначально кодирующих Gln, кодоном CAG, и
- замену всех кодонов, первоначально кодирующих Pro, кодоном CCC (или CCG); и

т.п.

25 В соответствии с конкретным вариантом реализации по меньшей мере 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, более предпочтительно по меньшей мере 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере 80% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 90%, 95% или даже 100% заменяемых кодонов в области, кодирующей пептид или белок, определенный в настоящем документе, или его фрагмент или вариант, или в полной

30 последовательности РНК дикого типа заменены, что повышает содержание G/C в указанной последовательности. В данном случае особенно предпочтительным является повышение содержания G/C в последовательности РНК согласно настоящему изобретению, предпочтительно по меньшей мере в одной кодирующей последовательности в последовательности РНК согласно настоящему изобретению,

35 до максимального значения (т.е. до 100% заменяемых кодонов) по сравнению с последовательностью дикого типа. В соответствии с настоящим изобретением дополнительная предпочтительная модификация последовательности РНК согласно настоящему изобретению основана на обнаружении того факта, что эффективность трансляции также определяется различной частотой присутствия тРНК в клетках.

40 Соответственно, если в последовательности РНК согласно настоящему изобретению так называемые «редкие кодоны» присутствуют в повышенной степени, соответствующая модифицированная последовательность РНК транслируется в значительно меньшей степени, чем в случае, когда присутствуют кодоны, кодирующие относительно «частые» тРНК. В соответствии с настоящим изобретением в

45 модифицированной последовательности РНК согласно настоящему изобретению область, которая кодирует пептид или белок, определенный в настоящем документе, или его фрагмент или вариант, модифицирована по сравнению с соответствующей областью последовательности РНК дикого типа так, что по меньшей мере один кодон

последовательности дикого типа, который кодирует тРНК, которая встречается в клетке относительно редко, заменен кодоном, который кодирует тРНК, которая встречается в клетке относительно часто и несет ту же аминокислоту, что и относительно редкая тРНК. С помощью этой модификации последовательность РНК согласно

5 настоящему изобретению модифицируют так, чтобы вставить кодоны, для которых доступны часто встречающиеся тРНК. Другими словами, в соответствии с настоящим изобретением, с помощью такой модификации все кодоны последовательности дикого типа, которые кодируют тРНК, которая является относительно редкой в клетке, могут быть заменены в каждом случае кодоном, который кодирует тРНК, которая является

10 относительно частой в клетке и которая в каждом случае несет аналогичную аминокислоту, как и относительно редкая тРНК. Специалисту в данной области техники известно, какие тРНК встречаются в клетке относительно часто и какие, напротив, встречаются относительно редко, ср., например, Akashi, Curr. Opin. Genet. Dev. 2001, 11 (6): 660-666. Особенно предпочтительными являются кодоны, которые используют для

15 конкретной аминокислоты тРНК, которая встречается наиболее часто, например, кодон Gly, который использует тРНК, которая наиболее часто встречается в клетке (человека). В соответствии с настоящим изобретением особенно предпочтительной является связь последующего содержания G/C, которое повышено, в частности, максимально

20 повышено, в модифицированной последовательности РНК согласно настоящему изобретению, с «частыми» кодонами без модификации аминокислотной последовательности белка, кодируемой кодирующей последовательностью РНК. Этот предпочтительный вариант реализации обеспечивает особенно эффективно транслируемую и стабилизированную (модифицированную) последовательность РНК

25 согласно настоящему изобретению. Определение модифицированной последовательности РНК согласно настоящему изобретению, как описано выше (повышенное содержание G/C; обмен тРНК), можно осуществлять с использованием компьютерной программы, описанной в WO 02/098443, раскрытие которого полностью включено в настоящий документ. С помощью этой компьютерной программы

30 нуклеотидная последовательность любой желательной последовательности РНК может быть модифицирована с помощью генетического кода или его вырожденного характера так, чтобы получить максимальное содержание G/C, в комбинации с использованием кодонов, которые кодируют тРНК с максимальной частотой встречаемости в клетке, при этом аминокислотная последовательность, кодируемая модифицированной

35 последовательностью РНК, предпочтительно не модифицирована по сравнению с немодифицированной последовательностью. Согласно другому варианту также возможно модифицировать только содержание G/C или только использование кодонов по сравнению с исходной последовательностью. Исходный код в Visual Basic 6.0 (используемая среда разработки: Microsoft Visual Studio Enterprise 6.0 с пакетом обновления 3) также описан в WO 02/098443. Согласно дополнительному

40 предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения содержание A/U в окружении сайта связывания рибосомы последовательности РНК согласно настоящему изобретению повышено по сравнению с содержанием A/U в окружении сайта связывания рибосомы соответствующей ей РНК дикого типа. Такая модификация (повышенное

45 содержание A/U вокруг сайта связывания рибосомы) повышает эффективность связывания рибосомы с РНК. Эффективное связывание рибосом с сайтом связывания рибосом (например, в последовательности Козак), в свою очередь, повышает эффективность трансляции РНК. В соответствии с дополнительным вариантом реализации настоящего изобретения последовательность РНК согласно настоящему

изобретению может быть модифицирована относительно потенциально дестабилизирующих элементов последовательности. В частности, кодирующая последовательность и/или 5'- и/или 3'-нетранслируемая область этой последовательности РНК может быть модифицирована по сравнению с соответствующей РНК дикого типа так, что она не содержит элементы дестабилизирующей последовательности, и кодируемая аминокислотная последовательность модифицированной последовательности РНК предпочтительно не модифицирована по сравнению с соответствующей ей РНК дикого типа. Известно, что, например, в последовательностях эукариотических РНК присутствуют дестабилизирующие последовательность элементы (DSE), с которыми связываются сигнальные белки и регулируют ферментативное разрушение РНК в условиях *in vivo*. Для дополнительной стабилизации модифицированной последовательности РНК, необязательно в области, которая кодирует по меньшей мере один пептид или белок, определенный в настоящем документе, или его фрагмент или вариант, одна или более таких модификаций по сравнению с соответствующей областью РНК дикого типа могут быть выполнены так, чтобы в ней отсутствовали или по существу отсутствовали дестабилизирующие последовательность элементы. В соответствии с настоящим изобретением DSE, присутствующие в нетранслируемых областях (3'- и/или 5'-НТО), также могут быть удалены из последовательности РНК согласно настоящему изобретению с помощью таких модификаций. Такие дестабилизирующие последовательности включают, например, AU-обогащенные последовательности (AURES), которые встречаются в 3'-НТО областях многочисленных нестабильных РНК (Caput et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986, 83: 1670-1674). Соответственно, последовательность РНК согласно настоящему изобретению предпочтительно модифицирована по сравнению с соответствующей РНК дикого типа так, что последовательность РНК согласно настоящему изобретению не содержит такие дестабилизирующие последовательности. Это также применимо к тем мотивам последовательностей, которые распознаются возможными эндонуклеазами, например, последовательности GAACAAG, которая содержится в сегменте 3'-НТО гена, кодирующего рецептор трансферрина (Binder et al., EMBO J. 1994, 13: 1969-1980). Эти мотивы последовательностей также предпочтительно удалены в последовательности РНК согласно настоящему изобретению.

В соответствии с другим предпочтительным вариантом реализации иРНК, применяемая согласно настоящему изобретению, имеет модифицированное содержание G/C, предпочтительно в своей кодирующей области, это означает, что содержание G/C модифицировано, в частности, повышено, по сравнению с содержанием G/C в кодирующей области соответствующей ей иРНК дикого типа, предпочтительно без изменения кодируемой аминокислотной последовательности. Например, содержание G/C в кодирующей области может быть повышено по меньшей мере на 7% или по меньшей мере на 15%, или по меньшей мере на 20% по сравнению с содержанием в иРНК дикого типа, которая кодирует антиген, антигенный белок или антигенный пептид, описанный в настоящем документе, или его фрагмент или вариант. В соответствии с конкретным вариантом реализации настоящего изобретения по меньшей мере 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80%, например, 90% или более, 95% или более, или даже 100% заменяемых кодонов в кодирующей области или во всей последовательности заменены для повышения содержания G/C. В данном случае 100% замена означает, что по существу все заменяемые кодоны кодирующей области заменены, что является одним из предпочтительных вариантов реализации настоящего

изобретения. Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения применяют иРНК, в которой кодирующая область модифицирована так, что по меньшей мере один кодон последовательности дикого типа, который кодирует тРНК, которая является относительно редкой в клетке, заменен кодоном, который кодирует тРНК, которая встречается в клетке относительно часто, но кодирует ту же аминокислоту, что и относительно редкая тРНК. тРНК, которые встречаются в клетке относительно редко или часто, известны специалисту в данной области техники; ср., например, Akashi, Curr. Opin. Genet. Dev. 2001, 11(6): 660-666. Наиболее часто встречающиеся тРНК для конкретной аминокислоты являются особенно предпочтительными.

В соответствии с другим вариантом реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению может быть модифицирована и, соответственно, стабилизирована путем адаптации последовательностей к частоте использования кодонов у человека.

В соответствии с настоящим изобретением дополнительная предпочтительная модификация последовательности нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению основана на обнаружении того факта, что кодоны, кодирующие одну и ту же аминокислоту, обычно встречаются с разной частотой. В соответствии с настоящим изобретением кодирующая последовательность, определенная в данном документе, в модифицированной последовательности нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению предпочтительно модифицирована, по сравнению с соответствующей кодирующей последовательностью соответствующей нуклеиновой кислоты дикого типа, так, что частота кодонов, кодирующих одну и ту же аминокислоту, соответствует природной частоте этого кодона в соответствии с частотой использования кодонов у человека, например, как показано в таблице В.

Например, в случае аминокислоты аланина (Ala), присутствующей в аминокислотной последовательности, кодируемой по меньшей мере одной кодирующей последовательностью в последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, кодирующая последовательность дикого типа предпочтительно адаптирована так, что кодон «GCC» применяется с частотой 0,40, кодон «GCT» применяется с частотой 0,28, кодон «GCA» применяется с частотой 0,22 и кодон «GCG» применяется с частотой 0,10 и т.д. (см. таблицу В).

Таблица: Таблица частоты использования кодонов человека

Аминокислота	Кодон	Доля	/1000
Ala	GCG	0,10	7,4
Ala	GCA	0,22	15,8
Ala	GCT	0,28	18,5
Ala	GCC*	0,40	27,7
Cys	TGT	0,42	10,6
Cys	TGC*	0,58	12,6
Asp	GAT	0,44	21,8
Asp	GAC*	0,56	25,1
Glu	GAG*	0,59	39,6
Glu	GAA	0,41	29,0
Phe	TTT	0,43	17,6
Phe	TTC*	0,57	20,3
Gly	GGG	0,23	16,5
Gly	GGA	0,26	16,5
Gly	GGT	0,18	10,8
Gly	GGC*	0,33	22,2
His	CAT	0,41	10,9
His	CAC*	0,59	15,1
Ile	ATA	0,14	7,5
Ile	ATT	0,35	16,0
Ile	ATC*	0,52	20,8
Lys	AAG*	0,60	31,9
Lys	AAA	0,40	24,4

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Аминокислота	Кодон	Доля	/1000
Leu	TTG	0,12	12,9
Leu	TTA	0,06	7,7
Leu	CTG*	0,43	39,6
Leu	CTA	0,07	7,2
Leu	CTT	0,12	13,2
Leu	CTC	0,20	19,6
Met	ATG*	1	22,0
Asn	AAT	0,44	17,0
Asn	AAC*	0,56	19,1
Pro	CCG	0,11	6,9
Pro	CCA	0,27	16,9
Pro	CCT	0,29	17,5
Pro	CCC*	0,33	19,8
Gln	CAG*	0,73	34,2
Gln	CAA	0,27	12,3
Arg	AGG	0,22	12,0
Arg	AGA*	0,21	12,1
Arg	CGG	0,19	11,4
Arg	CGA	0,10	6,2
Arg	CGT	0,09	4,5
Arg	CGC	0,19	10,4
Ser	AGT	0,14	12,1
Ser	AGC*	0,25	19,5
Ser	TCG	0,06	4,4
Ser	TCA	0,15	12,2
Ser	TCT	0,18	15,2
Ser	TCC	0,23	17,7
Thr	ACG	0,12	6,1
Thr	ACA	0,27	15,1
Thr	ACT	0,23	13,1
Thr	ACC*	0,38	18,9
Val	GTG*	0,48	28,1
Val	GTA	0,10	7,1

Аминокислота	Кодон	Доля	/1000
Val	GTT	0,17	11,0
Val	GTC	0,25	14,5
Trp	TGG*	1	13,2
Tyr	TAT	0,42	12,2
Tyr	TAC*	0,58	15,3
Стоп	TGA*	0,61	1,6
Стоп	TAG	0,17	0,8
Стоп	TAA	0,22	1,0

*: наиболее частый кодон

Как описано выше, в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно все кодоны последовательности дикого типа, которые кодируют тРНК, которая является относительно редкой в клетке, заменены кодоном, который кодирует тРНК, которая является относительно частой в клетке и которая, в каждом случае, несет ту же аминокислоту, что и относительно редкая тРНК. Соответственно, особенно предпочтительно для каждой кодируемой аминокислоты применяют наиболее частые кодоны (см. таблицу В, наиболее частые кодоны отмечены звездочками). Такая процедура оптимизации повышает индекс адаптации кодонов (CAI) и, в конечном итоге, повышает CAI до максимума. Применительно к настоящему изобретению последовательности с повышенным или максимальным CAI обычно называют «оптимизированными по кодонам» последовательностями и/или последовательностями с повышенным и/или максимальным CAI. В соответствии с предпочтительным вариантом реализации последовательность нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность, причем указанная кодирующая последовательность/последовательность оптимизирована по кодонам, как описано в настоящем документе. Более предпочтительно индекс адаптации кодонов (CAI) по меньшей мере одной кодирующей последовательности составляет по меньшей мере 0,5, по меньшей мере 0,8, по меньшей мере 0,9 или по меньшей мере 0,95. Наиболее предпочтительно индекс адаптации кодонов (CAI) по меньшей мере одной кодирующей последовательности составляет 1.

Например, в случае аминокислоты аланина (Ala), присутствующей в аминокислотной последовательности, кодируемой по меньшей мере одной кодирующей последовательностью в последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, кодирующая последовательность дикого типа адаптирована так, что для указанной аминокислоты всегда применяют наиболее частый кодон у человека «GCC». или в случае аминокислоты цистеина (Cys) последовательность дикого типа адаптирована так, что для указанной аминокислоты всегда применяют наиболее частый кодон у человека «TGC» и т.п.

В соответствии с другим вариантом реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению может быть модифицирована путем модификации, предпочтительно повышения, содержания цитозина (C) в последовательности нуклеиновой кислоты, предпочтительно кодирующей последовательности в последовательности нуклеиновой кислоты, более предпочтительно кодирующей последовательности в последовательности РНК.

Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения

содержание С кодирующей последовательности в последовательности нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению модифицировано, предпочтительно повышено по сравнению с содержанием С кодирующей последовательности соответствующей нуклеиновой кислоты дикого типа, т.е. немодифицированной нуклеиновой кислоты. Аминокислотная последовательность, кодируемая по меньшей мере одной кодирующей последовательностью в последовательности нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, предпочтительно не модифицирована по сравнению с аминокислотной последовательностью, кодируемой соответствующей нуклеиновой кислотой дикого типа.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения модифицированная нуклеиновая кислота, в частности, модифицированная последовательность РНК, модифицирована так, что достигнуто по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% или по меньшей мере 90% от теоретически возможного максимального содержания цитозина или даже максимального содержания цитозина.

Согласно дополнительным предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или даже 100% кодонов целевой нуклеиновой кислоты, в частности, модифицированной последовательности РНК дикого типа, которые являются «оптимизируемыми по содержанию цитозина», заменены кодонами с более высоким содержанием цитозина, чем те, которые присутствуют в последовательности дикого типа.

Согласно дополнительному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения некоторые из кодонов кодирующей последовательности дикого типа могут быть дополнительно модифицированы так, что кодон для относительно редкой тРНК в клетке заменен кодоном для относительно частой тРНК в клетке, при условии, что замененный кодон для относительно частой тРНК несет ту же аминокислоту, что и относительно редкая тРНК исходного кодона дикого типа. Предпочтительно все из кодонов для относительно редкой тРНК заменены кодоном для относительно частой тРНК в клетке, за исключением кодонов, кодирующих аминокислоты, которые кодируются исключительно кодонами, не содержащими цитозин, или за исключением глутамина (Gln), который кодируется двумя кодонами, каждый из которых содержит одинаковое количество цитозинов.

Согласно дополнительному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения модифицированная целевая нуклеиновая кислота, предпочтительно РНК, модифицирована так, что по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% от теоретически возможного максимального содержания цитозина или даже максимального содержания цитозина достигнуто с помощью кодонов, которые кодируют относительно частые тРНК в клетке, при этом аминокислотная последовательность остается неизменной.

Вследствие природной вырожденности генетического кода конкретная аминокислота может кодироваться более чем одним кодоном. Соответственно, 18 из 20 природных аминокислот кодируются более чем одним кодоном (за исключением Тгур и Met), например, 2 кодонами (например, Cys, Asp, Glu), тремя кодонами (например, Ile), 4 кодонами (например, Ala, Gly, Pro) или 6 кодонами (например, Leu, Arg, Ser). Однако не все кодоны, кодирующие одну и ту же аминокислоту, используются с одинаковой частотой в условиях *in vivo*. Типичный профиль использования кодонов установлен для каждого отдельного организма.

Применительно к настоящему изобретению термин «кодон, оптимизируемый по

содержанию цитозина» относится к кодонам, которые имеют более низкое содержание цитозинов, чем другие кодоны, кодирующие ту же аминокислоту. Соответственно, любой кодон дикого типа, который может быть заменен другим кодоном, кодирующим ту же аминокислоту и имеющим большее количество цитозинов в этом кодоне, считается оптимизируемым по цитозину (оптимизируемым по С). Любая такая замена С-оптимизируемого кодона дикого типа конкретным С-оптимизированным кодоном в кодирующей последовательности дикого типа повышает общее содержание С в ней и указывает на С-обогащенную модифицированную последовательность нуклеиновой кислоты. В соответствии с предпочтительным вариантом реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, в частности, последовательность РНК согласно настоящему изобретению, предпочтительно по меньшей мере одна кодирующая последовательность в последовательности нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению содержит или состоит из С-максимизированной последовательности РНК, содержащей С-оптимизированные кодоны для всех потенциально С-оптимизируемых кодонов. Соответственно, 100% или все теоретически заменяемые С-оптимизируемые кодоны предпочтительно заменены С-оптимизированными кодонами по всей длине кодирующей последовательности.

В данном случае кодоны, оптимизируемые по содержанию цитозина, представляют собой кодоны, которые содержат меньшее количество цитозинов, чем другие кодоны, кодирующие ту же аминокислоту.

Любой из кодонов GCG, GCA, GCU, кодирующих аминокислоту Ala, может быть заменен кодоном GCC, кодирующим ту же аминокислоту, и/или

кодон UGU, который кодирует Cys, может быть заменен кодоном UGC, кодирующим ту же аминокислоту, и/или

кодон GAU, который кодирует Asp, может быть заменен кодоном GAC, кодирующим ту же аминокислоту, и/или

кодон UUU, кодирующий Phe, может быть заменен кодоном UUC, кодирующим ту же аминокислоту, и/или

любой из кодонов GGG, GGA, GGU, кодирующих Gly, может быть заменен кодоном GGC, кодирующим ту же аминокислоту, и/или

кодон CAU, кодирующий His, может быть заменен кодоном CAC, кодирующим ту же аминокислоту, и/или

любой из кодонов AUA, AUU, кодирующих Ile, может быть заменен кодоном AUC, и/или

любой из кодонов UUG, UUA, CUG, CUA, CUU, кодирующих Leu, может быть заменен кодоном CUC, кодирующим ту же аминокислоту, и/или

кодон AAU, который кодирует Asn, может быть заменен кодоном AAC, кодирующим ту же аминокислоту, и/или

любой из кодонов CCG, CCA, CCU, кодирующих Pro, может быть заменен кодоном CCC, кодирующим ту же аминокислоту, и/или

любой из кодонов AGG, AGA, CGG, CGA, CGU, кодирующих Arg, может быть заменен кодоном CGC, кодирующим ту же аминокислоту, и/или

любой из кодонов AGU, AGC, UCG, UCA, UCU, кодирующих Ser, может быть заменен кодоном UCC, кодирующим ту же аминокислоту, и/или

любой из кодонов ACG, ACA, ACU, кодирующих Thr, может быть заменен кодоном ACC, кодирующим ту же аминокислоту, и/или

любой из кодонов GUG, GUA, GUU, кодирующих Val, может быть заменен кодоном GUC, кодирующим ту же аминокислоту, и/или

кодон UAU, кодирующий Туг, может быть заменен кодоном UAC, кодирующим ту же аминокислоту.

В любом из вышеперечисленных случаев количество цитозинов увеличивается на 1 на замененный кодон. Замена всех кодонов, не оптимизированных по С (соответствующих С-оптимизируемым кодоном), кодирующей последовательности приводит к получению С-максимизированной кодирующей последовательности. Применительно к настоящему изобретению по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% кодонов, не оптимизированных по С, в по меньшей мере одной кодирующей последовательности в последовательности РНК согласно настоящему изобретению заменены С-оптимизированными кодонами.

Может быть предпочтительным, чтобы для некоторых аминокислот процент С-оптимизируемых кодонов, замененных С-оптимизированными кодонами, составлял менее 70%, тогда как для других аминокислот процент замененных кодонов превышал 70%, чтобы общий процент С-оптимизации соответствовал по меньшей мере 70% от всех С-оптимизируемых кодонов кодирующей последовательности дикого типа.

Предпочтительно в С-оптимизированной последовательности РНК согласно настоящему изобретению по меньшей мере 50% С-оптимизируемых кодонов дикого типа для любой конкретной аминокислоты заменены С-оптимизированными кодонами, например, любая модифицированная С-обогащенная последовательность РНК предпочтительно содержит по меньшей мере 50% и предпочтительно по меньшей мере 60% С-оптимизированных кодонов в положениях С-оптимизируемых кодонов дикого типа, кодирующих любую из вышеупомянутых аминокислот Ala, Cys, Asp, Phe, Gly, His, He, Leu, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val и Туг.

В данном случае кодоны, кодирующие аминокислоты, которые не являются оптимизируемыми по содержанию цитозина и которые, однако, кодируются по меньшей мере двумя кодонами, можно применять без какого-либо дополнительного процесса отбора. Однако кодон последовательности дикого типа, который кодирует относительно редкую тРНК в клетке, например клетке человека, может быть заменен кодоном, который кодирует относительно частую тРНК в клетке, причем оба этих кодона кодируют одну и ту же аминокислоту. Соответственно, относительно редкий кодон GAA, кодирующий Glu, может быть заменен относительно частым кодоном GAG, кодирующим ту же аминокислоту, и/или относительно редкий кодон AAA, кодирующий Lys, может быть заменен относительно частым кодоном AAG, кодирующим ту же аминокислоту, и/или

относительно редкий кодон CAA, кодирующий Gln, может быть заменен относительно частым кодоном CAG, кодирующим ту же аминокислоту.

В данном случае аминокислоты Met (AUG) и Trp (UGG), каждая из которых кодируется только одним кодоном, остаются неизменными. Стоп-кодона не оптимизированы по содержанию цитозина, однако относительно редкие стоп-кодона амбер и охра (UAA и UAG) могут быть заменены относительно частым стоп-кодоном опал (UGA).

Одиночные замены, перечисленные выше, можно применять по отдельности, а также во всех возможных комбинациях для оптимизации содержания цитозина модифицированной последовательности нуклеиновой кислоты по сравнению с последовательностью нуклеиновой кислоты дикого типа.

Соответственно, по меньшей мере одна кодирующая последовательность, определенная в настоящем документе, может быть изменена по сравнению с кодирующей последовательностью соответствующей нуклеиновой кислоты дикого типа так, что

кодон аминокислоты, кодируемой по меньшей мере двумя или более кодонами, один из которых содержит один дополнительный цитозин, может быть заменен С-оптимизированным кодоном, содержащим один дополнительный цитозин, причем аминокислота предпочтительно не изменена по сравнению с последовательностью

5 дикого типа.

В соответствии с дополнительным предпочтительным вариантом реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, в частности, последовательность РНК согласно настоящему изобретению, может содержать полиА-хвост на 3'-конце, который обычно содержит от приблизительно 10 до 200 аденозиновых нуклеотидов, предпочтительно от приблизительно 10 до 100 аденозиновых нуклеотидов,

10 более предпочтительно от приблизительно 40 до 80 аденозиновых нуклеотидов или еще более предпочтительно от приблизительно 50 до 70 аденозиновых нуклеотидов.

Предпочтительно последовательность полиА в последовательности РНК согласно настоящему изобретению получена с матрицы ДНК посредством РНК-транскрипции в условиях *in vitro*. Согласно другому варианту последовательность полиА также может быть получена в условиях *in vitro* с помощью обычных способов химического синтеза без необходимости транскрипции с ДНК-предшественника. Помимо этого последовательности полиА или полиА-хвосты могут быть получены с помощью ферментативного полиаденилирования РНК согласно настоящему изобретению с

20 использованием коммерчески доступных наборов для полиаденилирования и соответствующих протоколов, известных в данной области техники.

Согласно другому варианту РНК, описанная в настоящем документе, необязательно содержит сигнал полиаденилирования, который определен в настоящем документе как сигнал, который передает полиаденилирование (транскрибированной) РНК с помощью

25 специфических белковых факторов (например, фактора специфичности расщепления и полиаденилирования (CPSF), фактора стимуляции расщепления (CstF)), факторов расщепления I и II (CF I и CF II), полиА-полимеразы (РАР)). В данном случае предпочтительным является консенсусный сигнал полиаденилирования, содержащий консенсусную последовательность NN(U/T)ANA. Согласно особенно предпочтительному

30 аспекту сигнал полиаденилирования содержит одну из следующих последовательностей: AA(U/T)AAA или A(U/T)(U/T)AAA (при этом уридин обычно присутствует в РНК, и тимидин обычно присутствует в ДНК).

В соответствии с дополнительным предпочтительным вариантом реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, в частности, последовательность РНК согласно настоящему изобретению, может содержать полиС-хвост на 3'-конце, который обычно содержит от приблизительно 10 до 200 цитозиновых нуклеотидов, предпочтительно от приблизительно 10 до 100 цитозиновых нуклеотидов,

35 более предпочтительно от приблизительно 20 до 70 цитозиновых нуклеотидов или еще более предпочтительно от приблизительно 20 до 60 или даже от 10 до 40 цитозиновых нуклеотидов. Предпочтительно последовательность полиС в последовательности РНК согласно настоящему изобретению получена с матрицы ДНК посредством РНК-транскрипции в условиях *in vitro*.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, в частности, последовательность РНК

45 согласно настоящему изобретению, содержит по меньшей мере один элемент 5'- или 3'-НТО. В данном случае элемент НТО содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая происходит из 5'- или 3'-НТО любого природного гена или которая происходит из фрагмента, гомолога или варианта 5'- или 3'-НТО гена.

Предпочтительно элемент 5'- или 3'-НТО, применяемый в соответствии с настоящим изобретением, является гетерологичным в отношении по меньшей мере одной кодирующей последовательности в последовательности РНК согласно настоящему изобретению. Даже если предпочтительными являются элементы 5' или 3'-НТО, 5

происходящие из природных генов, элементы НТО, полученные с помощью синтетических способов, также можно применять согласно настоящему изобретению. Термин «элемент 3'-НТО» обычно относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая происходит из 3'-НТО или из варианта 3'-НТО. Элемент 3'-НТО применительно 10 к настоящему изобретению может представлять собой 3'-НТО молекулы нуклеиновой кислоты, в частности, РНК или ДНК, предпочтительно иРНК. Соответственно, применительно к настоящему изобретению предпочтительно элемент 3'-НТО может представлять собой 3'-НТО РНК, предпочтительно иРНК, или он может представлять собой матрицу для транскрипции 3'-НТО РНК. Соответственно, элемент 3'-НТО 15 предпочтительно представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая соответствует 3'-НТО РНК, предпочтительно 3'-НТО иРНК, такой как иРНК, полученную путем транскрипции генетически модифицированной векторной конструкции. Предпочтительно элемент 3'-НТО выполняет функцию 3'-НТО или кодирует последовательность, которая выполняет функцию 3'-НТО.

Предпочтительно по меньшей мере один элемент 3'-НТО содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, происходящей из 3'-НТО гена хордового животного, предпочтительно гена позвоночного животного, более предпочтительно 20 гена млекопитающего, наиболее предпочтительно гена человека, или из варианта 3'-НТО гена хордового животного, предпочтительно гена позвоночного животного, более предпочтительно гена млекопитающего, наиболее предпочтительно гена человека. 25

Предпочтительно последовательность нуклеиновой кислоты, в частности, последовательность РНК согласно настоящему изобретению содержит элемент 3'-НТО, который может происходить из гена, который относится к РНК с увеличенным периодом полужизни (что обеспечивает стабильную РНК), например, элемент 3'-НТО, 30 определенный и описанный ниже. Предпочтительно элемент 3'-НТО представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, происходящую из 3'-НТО гена, который предпочтительно кодирует стабильную РНК, или из гомолога, фрагмента или варианта указанного гена.

Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения 35 элемент 3'-НТО содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая происходит из 3'-НТО гена, выбранного из группы, состоящей из гена альбумина, гена альфа-глобина, гена бета-глобина, гена тирозингидроксилазы, гена липоксигеназы и гена коллагена-альфа а, такого как ген коллагена-альфа 1 (I), или из варианта 3'-НТО гена, выбранного из группы, состоящей из гена альбумина, гена 40 альфа-глобина, гена бета-глобина, гена тирозингидроксилазы, гена липоксигеназы и гена коллагена-альфа, такого как ген коллагена-альфа 1 (I) в соответствии с SEQ ID NO: 1369-1390 в заявке на патент WO 2013/143700, раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки, или из его гомолога, фрагмента или варианта. Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения 45 элемент 3'-НТО содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая происходит из 3'-НТО гена альбумина, предпочтительно гена альбумина позвоночного животного, более предпочтительно гена альбумина млекопитающего, наиболее предпочтительно гена альбумина человека.

В данном случае особенно предпочтительно последовательность РНК согласно настоящему изобретению содержит элемент 3'-НТО, содержащий соответствующую последовательность РНК, происходящую из нуклеиновых кислот в соответствии с SEQ ID NO: 1369-1390 в заявке на патент W02013/143700, или их фрагмента, гомолога или

варианта. Согласно другому особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения элемент 3'-НТО содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая происходит из 3'-НТО гена альфа- или бета-глобина, предпочтительно гена альфа- или бета-глобина позвоночного животного, более предпочтительно гена альфа- или бета-глобина млекопитающего, наиболее предпочтительно гена альфа- или бета-глобина человека.

Термин «последовательность нуклеиновой кислоты, которая происходит из 3'-НТО гена[...]» предпочтительно относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая основана на последовательности 3'-НТО гена [...] или ее части, такой как 3'-НТО гена альбумина, гена альфа-глобина, гена бета-глобина, гена тирозингидроксилазы, гена липоксигеназы или гена коллагена-альфа, такого как ген коллагена-альфа 1 (I), предпочтительно гена альбумина или его части. Этот термин включает последовательности, соответствующие полной последовательности 3'-НТО, т.е. полноразмерной последовательности 3'-НТО гена, и последовательности, соответствующие фрагменту последовательности 3'-НТО гена, такого как ген альбумина, ген альфа-глобина, ген бета-глобина, ген тирозингидроксилазы, ген липоксигеназы или ген коллагена-альфа, такой как ген коллагена-альфа 1 (I), предпочтительно гена альбумина.

Термин «последовательность нуклеиновой кислоты, которая происходит из варианта 3'-НТО гена [...]», предпочтительно относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая основана на варианте последовательности 3'-НТО гена, например, на варианте 3'-НТО гена альбумина, гена альфа-глобина, гена бета-глобина, гена тирозингидроксилазы, гена липоксигеназы или гена коллагена-альфа, такого как ген коллагена-альфа 1 (I), или его части, как описано выше. Этот термин включает последовательности, соответствующие полной последовательности варианта 3'-НТО гена, т.е. полноразмерной последовательности варианта 3'-НТО гена, и последовательности, соответствующие фрагменту варианта последовательности 3'-НТО гена. Фрагмент в данном случае предпочтительно состоит из непрерывного участка нуклеотидов, соответствующего непрерывному участку нуклеотидов в полноразмерном варианте 3'-НТО, который представляет по меньшей мере 20%, предпочтительно по меньшей мере 30%, более предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно по меньшей мере 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере 60%, еще более предпочтительно по меньшей мере 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере 80% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 90% полноразмерного варианта 3'-НТО. Такой фрагмент варианта, применительно к настоящему изобретению, предпочтительно представляет собой функциональный фрагмент варианта, описанного в настоящем документе.

В соответствии с предпочтительным вариантом реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, в частности, последовательность РНК согласно настоящему изобретению, содержит 5'-кэп структуру и/или по меньшей мере один элемент 3'-нетранслируемой области (элемент 3'-НТО), предпочтительно, определенные в настоящем документе. Более предпочтительно РНК дополнительно содержит элемент 5'-НТО, определенный в настоящем документе.

Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения последовательность РНК содержит, предпочтительно в направлении от 5'- к 3'-концу:

а.) 5'-кэп структуру, предпочтительно m7GpppN;

5 б.) по меньшей мере одну кодирующую последовательность, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, происходящий из представляющего интерес белка или представляющего интерес пептида или его фрагмента или варианта, или ее фрагмент или вариант;

10 в.) элемент 3'-НТО, содержащий или состоящий из последовательности нуклеиновой кислоты, которая происходит из гена альфа-глобина, его гомолога, фрагмента или варианта;

д.) необязательно последовательность полиА, предпочтительно содержащую 64 аденозина;

е.) необязательно последовательность полиС, предпочтительно содержащую 30 цитозинов.

15 Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты, в частности, последовательность РНК, содержит по меньшей мере один элемент 5'-нетранслируемой области (элемент 5'-НТО). Предпочтительно по меньшей мере один элемент 5'-НТО содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая происходит
20 из 5'-НТО гена TOP или которая происходит из фрагмента, гомолога или варианта 5'-НТО гена TOP.

Особенно предпочтительно элемент 5'-НТО не содержит мотив TOP или 5'-TOP, определенный выше.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения
25 последовательность нуклеиновой кислоты элемента 5'-НТО, которая происходит из 5'-НТО гена TOP, заканчивается на своем 3'-конце нуклеотидом, расположенным в положении 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 в 5'-направлении относительно старт-кодона (например, A(U/T)G) гена или РНК, из которой она происходит. Соответственно, элемент 5'-НТО не содержит какую-либо часть кодирующей белок последовательности.
30 Соответственно, предпочтительно единственная кодирующая белок часть по меньшей мере одной последовательности нуклеиновой кислоты, в частности, последовательности РНК, обеспечена кодирующей последовательностью.

Последовательность нуклеиновой кислоты, происходящая из 5'-НТО гена TOP, предпочтительно происходит из эукариотического гена TOP, предпочтительно гена
35 TOP растения или животного, более предпочтительно гена TOP хордового животного, еще более предпочтительно гена TOP позвоночного животного, наиболее предпочтительно гена TOP млекопитающего, такого как ген TOP человека.

Например, элемент 5'-НТО предпочтительно выбран из элементов 5'-НТО, содержащих или состоящих из последовательности нуклеиновой кислоты, которая
40 происходит из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 и SEQ ID NO: 1422 в заявке на патент WO2013/143700, раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки, из гомологов SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 и SEQ ID NO: 1422 в заявке на патент WO 2013/143700, из их варианта или
45 предпочтительно из соответствующей последовательности РНК. Термин «гомологи SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 и SEQ ID NO: 1422 в заявке на патент WO 2013/143700» относится к последовательностям других видов, отличных от Homo sapiens, которые гомологичны последовательностям в соответствии с SEQ ID NO:

1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 и SEQ ID NO: 1422 в заявке на патент WO2013/143700.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения элемент 5'-НТО последовательности нуклеиновой кислоты, в частности, последовательности РНК согласно настоящему изобретению, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая происходит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая располагается от положения нуклеотида 5 (т.е. нуклеотида, который расположен в положении 5 в последовательности) до положения нуклеотида непосредственно в 5'-направлении от старт-кодона (расположенного на 3'-конце последовательности), например, до положения нуклеотида непосредственно в 5'-направлении от последовательности ATG, последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 и SEQ ID NO: 1422 в заявке на патент WO 2013/143700, из гомологов SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 и SEQ ID NO: 1422 в заявке на патент WO 2013/143700, из их варианта или соответствующей последовательности РНК. Особенно предпочтительно элемент 5'-НТО происходит из последовательности нуклеиновой кислоты, располагающейся от положения нуклеотида непосредственно в 3'-направлении от 5'-ТОР до положения нуклеотида непосредственно в 5'-направлении от старт-кодона (расположенного на 3'-конце последовательности), например, до положения нуклеотида непосредственно в 5'-направлении от последовательности ATG последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 и SEQ ID NO: 1422 в заявке на патент WO 2013/143700, из гомологов SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 и SEQ ID NO: 1422 в заявке на патент WO 2013/143700, из их варианта или соответствующей последовательности РНК.

Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения элемент 5'-НТО содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая происходит из 5'-НТО гена TOP, кодирующего рибосомный белок, или из варианта 5'-НТО гена TOP, кодирующего рибосомный белок. Например, элемент 5'-НТО содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая происходит из 5'-НТО последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с любой из SEQ ID NO: 67, 170, 193, 244, 259, 554, 650, 675, 700, 721, 913, 1016, 1063, 1120, 1138 и 1284-1360 в заявке на патент WO 2013/143700, соответствующей последовательности РНК, ее гомолога или варианта, как описано в настоящем документе, предпочтительно не содержащего мотив 5'-ТОР. Как описано выше, последовательность, располагающаяся от положения 5 до нуклеотида, расположенного непосредственно в 5'-направлении от ATG (который расположен на 3'-конце последовательностей), соответствует 5'-НТО указанных последовательностей.

Предпочтительно элемент 5'-НТО содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая происходит из 5'-НТО гена TOP, кодирующего белок большой субъединицы рибосомы (RPL), или из гомолога или варианта 5'-НТО гена TOP, кодирующего белок большой субъединицы рибосомы (RPL). Например, элемент 5'-НТО содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая происходит из 5'-НТО последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с любой из SEQ ID NO: 67, 259, 1284-1318, 1344, 1346, 1348-1354, 1357, 1358, 1421 и 1422 в заявке на патент WO 2013/143700, соответствующей последовательности РНК, ее гомолога или ее варианта, описанных в настоящем документе, предпочтительно не содержащего мотив 5'-ТОР.

Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения

элемент 5'-НТО содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая происходит из 5'-НТО гена белка большой субъединицы рибосомы 32, предпочтительно из гена белка большой субъединицы рибосомы 32 (L32) позвоночного животного, более предпочтительно из гена белка большой субъединицы рибосомы 32 (L32) млекопитающего, наиболее предпочтительно из гена белка большой субъединицы рибосомы 32 (L32) человека, или из варианта 5'-НТО гена белка большой субъединицы рибосомы 32, предпочтительно из гена белка большой субъединицы рибосомы 32 (L32) позвоночного животного, более предпочтительно из гена белка большой субъединицы рибосомы 32 (L32) млекопитающего, наиболее предпочтительно из гена белка большой субъединицы рибосомы 32 (L32) человека, причем предпочтительно элемент 5'-НТО не содержит 5'-ТОР указанного гена.

Соответственно, в особенно предпочтительном варианте реализации элемент 5'-НТО содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере приблизительно на 40%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 50%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 60%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 70%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 13 (5'-НТО белка большой субъединицы рибосомы 32 человека, в которой отсутствует 5'-концевой олигопиримидиновый тракт: GGCGCTGCCTACGGAGGTGGCAGCCATCTCCTTCTCG GCATC; соответствующей SEQ ID NO: 1368 в заявке на патент WO 2013/143700) или предпочтительно соответствующей последовательности РНК, или в котором по меньшей мере один элемент 5'-НТО содержит или состоит из фрагмента последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере приблизительно на 40%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 50%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 60%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 70%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты из описанных выше последовательностей, причем предпочтительно фрагмент описан выше, т.е. представляет собой непрерывный участок нуклеотидов, представляющий по меньшей мере 20% и т.д. от полноразмерной 5'-НТО. Предпочтительно фрагмент содержит по меньшей мере приблизительно 20 нуклеотидов или более, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 30 нуклеотидов или более, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 40 нуклеотидов или более в длину. Предпочтительно фрагмент представляет собой функциональный фрагмент, описанный в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность РНК согласно настоящему изобретению содержит элемент 5'-НТО, который содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая происходит из 5'-НТО гена TOP позвоночного животного, такого как млекопитающее, например, гена TOP человека, выбранного из RPSA, RPS2, RPS3, RPS3A, RPS4, RPS5, RPS6, RPS7, RPS8, RPS9, RPS10, RPS11, RPS12, RPS13, RPS14, RPS15, RPS15A, RPS16, RPS17, RPS18, RPS19, RPS20, RPS21, RPS23, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27, RPS27A, RPS28, RPS29, RPS30, RPL3, RPL4, RPL5, RPL6, RPL7, RPL7A, RPL8, RPL9, RPL10, RPL10A,

RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL18A, RPL19, RPL21, RPL22, RPL23, RPL23A, RPL24, RPL26, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL32, RPL34, RPL35, RPL35A, RPL36, RPL36A, RPL37, RPL37A, RPL38, RPL39, RPL40, RPL41, RPLP0, RPLP1, RPLP2, RPLP3, RPLP0, RPLP1, RPLP2, EEF1A1, EEF1B2, EEF1D, EEF1G, EEF2, EIF3E, EIF3F, EIF3H, EIF2S3, EIF3C, EIF3K, EIF3EIP, EIF4A2, PABPC1, HNRNPA1, TPT1, TUBB1, UBA52, NPM1, ATP5G2, GNB2L1, NME2, UQCRB или из его варианта или гомолога, причем предпочтительно элемент 5'-НТО не содержит мотив TOP или 5'-TOP указанных генов, и при этом необязательно 5'-конец элемента 5'-НТО начинается с нуклеотида, расположенного в положении 1 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 в 3'-направлении от 5'-концевого олигопиримидинового тракта (TOP), и при этом также необязательно элемент 5'-НТО, происходящий из 5'-НТО гена TOP, заканчивается на своем 3'-конце нуклеотидом, расположенным в положении 1, 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 в 5'-направлении от старт-кодона A(U/T)G) гена, из которого он происходит.

Согласно дополнительным особенно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения элемент 5'-НТО содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая происходит из 5'-НТО гена белка большой субъединицы рибосомы 32 (RPL32), гена белка большой субъединицы рибосомы 35 (RPL35), гена белка большой субъединицы рибосомы 21 (RPL21), гена альфа-субъединицы 1 митохондриального комплекса F1, обладающего АТФ-синтазной и

H⁺-транспортирующей активностью; из сердечной мышцы (ATP5A1), гена 17-бета-гидроксистероиддегидрогеназы 4 (HSD17B4), андроген-индуцируемого гена 1 (AIG1), гена субъединицы VIc цитохром С-оксидазы (COX6C) или гена N-ацилсфингозинамидгидролазы (кислой церамидазы) 1 (ASAH1) или из их варианта, предпочтительно из гена белка большой субъединицы рибосомы 32 (RPL32) позвоночного животного, гена белка большой субъединицы рибосомы 35 (RPL35) позвоночного животного, гена белка большой субъединицы рибосомы 21 (RPL21) позвоночного животного, гена альфа-субъединицы 1 митохондриального комплекса F1, обладающего АТФ-синтазной и H⁺-транспортирующей активностью, из сердечной мышцы (ATP5A1) позвоночного животного, гена 17-бета-гидроксистероиддегидрогеназы 4 (HSD17B4) позвоночного животного, андроген-индуцируемого гена 1 (AIG1) позвоночного животного, гена субъединицы VIc цитохром С-оксидазы (COX6C) позвоночного животного или гена N-ацилсфингозинамидгидролазы (кислой церамидазы) 1 (ASAH1) позвоночного животного или его варианта, более предпочтительно из гена белка большой субъединицы рибосомы 32 (RPL32) млекопитающего, гена белка большой субъединицы рибосомы 35 (RPL35) млекопитающего, гена белка большой субъединицы рибосомы 21 (RPL21) млекопитающего, гена альфа-субъединицы 1 митохондриального комплекса F1, обладающего АТФ-синтазной и H⁺-транспортирующей активностью, из сердечной мышцы (ATP5A1) млекопитающего, гена 17-бета-гидроксистероиддегидрогеназы 4 (HSD17B4) млекопитающего, андроген-индуцируемого гена 1 (AIG1) млекопитающего, гена субъединицы VIc цитохром С-оксидазы (COX6C) млекопитающего или гена N-ацилсфингозинамидгидролазы (кислой церамидазы) 1 (ASAH1) млекопитающего или его варианта, наиболее предпочтительно из гена белка большой субъединицы рибосомы 32 (RPL32) человека, гена белка большой субъединицы рибосомы 35 (RPL35) человека, гена белка большой субъединицы рибосомы 21 (RPL21) человека, гена альфа-субъединицы 1 митохондриального комплекса F1, обладающего АТФ-синтазной и H⁺-транспортирующей активностью, из сердечной мышцы (ATP5A1) человека, гена

17-бета-гидроксистероиддегидрогеназы 4 (HSD17B4) человека, андроген-индуцируемого гена 1 (AIG1) человека, гена субъединицы VIc цитохром С-оксидазы (COX6C) человека или гена N-ацилсфингозинамидгидролазы (кислой церамидазы) 1 (ASAN1) человека или его варианта, при этом предпочтительно элемент 5'-НТО не содержит 5'-ТОР

указанного гена.

Соответственно, в особенно предпочтительном варианте реализации элемент 5'-НТО содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере приблизительно на 40%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 50%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 60%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 70%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 1412-1420 в заявке на патент WO 2013/143700, или соответствующей последовательности РНК, или в котором по меньшей мере один элемент 5'-НТО содержит или состоит из фрагмента последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере приблизительно на 40%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 50%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 60%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 70%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 1412-1420 в заявке на патент WO 2013/143700, при этом предпочтительно фрагмент описан выше, т.е. представляет собой непрерывный участок нуклеотидов, представляющий по меньшей мере 20% и т.д. от полноразмерной 5'-НТО. Предпочтительно фрагмент содержит по меньшей мере приблизительно 20 нуклеотидов или более, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 30 нуклеотидов или более, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 40 нуклеотидов или более в длину. Предпочтительно фрагмент представляет собой функциональный фрагмент, описанный в настоящем документе.

Соответственно, в особенно предпочтительном варианте реализации элемент 5'-НТО содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере приблизительно на 40%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 50%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 60%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 70%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 14 (5'-НТО ATP5A1, в которой отсутствует 5'-концевой олигопиримидиновый тракт: GCGGCTCG GCCATTTTGTCCCAGTCAGTCCGGAGGCTGCGGCTGCAGAAGTACCGCCTGCGGAG TAACTGCAAAG; соответствующей SEQ ID NO: 1414 в заявке на патент WO 2013/143700) или предпочтительно соответствующей последовательности РНК, или в котором по меньшей мере один элемент 5'-НТО содержит или состоит из фрагмента последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере приблизительно на 40%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 50%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 60%, предпочтительно по меньшей мере

приблизительно на 70%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, описанной выше, при этом предпочтительно фрагмент описан выше, т.е. представляет собой непрерывный участок нуклеотидов, представляющий по меньшей мере 20% и т.д. от полноразмерной 5'-НТО. Предпочтительно фрагмент содержит по меньшей мере приблизительно 20 нуклеотидов или более, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 30 нуклеотидов или более, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 40 нуклеотидов или более в длину. Предпочтительно фрагмент представляет собой функциональный фрагмент, описанный в настоящем документе.

Предпочтительно по меньшей мере один элемент 5'-НТО и по меньшей мере один элемент 3'-НТО действуют синергически для увеличения выработки белка с по меньшей мере одной последовательности РНК, как описано выше.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом реализации настоящего изобретения последовательность РНК согласно настоящему изобретению содержит, предпочтительно в направлении от 5'- к 3'-концу:

а.) 5'-кэп структуру, предпочтительно m7GpppN;

б.) элемент 5'-НТО, который содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая происходит из 5'-НТО гена TOP, его гомолога, фрагмента или варианта;

с.) по меньшей мере одну кодирующую последовательность, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, происходящий из представляющего интерес белка или представляющего интерес пептида, или его фрагмента или варианта;

д.) элемент 3'-НТО, содержащий или состоящий из последовательности нуклеиновой кислоты, которая происходит из гена, обеспечивающего стабильную РНК, его гомолога, фрагмента или варианта;

е.) необязательно последовательность полиА, предпочтительно содержащую 64 аденозина; и

ф.) необязательно последовательность полиС, предпочтительно содержащую 30 цитозинов.

Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, в частности, последовательность РНК, применяемая в соответствии с настоящим изобретением, содержит гистоновую последовательность/структуру «петля-на-стебле». Такие гистоновые последовательности «петля-на-стебле» предпочтительно выбраны из гистоновых последовательностей «петля-на-стебле», описанных в WO 2012/019780, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Гистоновая последовательность «петля-на-стебле», подходящая для применения в настоящем изобретении, предпочтительно выбрана по меньшей мере из одной из следующих Формул VII или VIII:

Формула VII (последовательность «петля-на-стебле» без элементов, граничащих со «стеблем»):



5

стебель1

петля

стебель2

Формула VIII (последовательность «петля-на-стебле» с элементами, граничащими со «стеблем»):

10



15

стебель 1

стебель 1

петля

стебель 2

стебель 2

граничный элемент

граничный элемент

в которой:

граничные элементы стебель1 или стебель2 N_{1-6} представляют собой непрерывную последовательность из 1-6, предпочтительно 2-6, более предпочтительно 2-5, еще более предпочтительно 3-5, наиболее предпочтительно 4-5 или 5 N, где каждый N независимо выбран из нуклеотида, выбранного из A, U, T, G и C или аналогов этих нуклеотидов; стебель1 $[N_{0-2}GN_{3-5}]$ обратен комплементарен или частично обратен комплементарен элементу стебель2 и представляет собой непрерывную последовательность из 5-7 нуклеотидов;

25

где N_{0-2} представляет собой непрерывную последовательность из 0-2, предпочтительно 0-1, более предпочтительно 1 N, где каждый N независимо выбран из нуклеотида, выбранного из A, U, T, G и C или аналогов этих нуклеотидов;

где N_{3-5} представляет собой непрерывную последовательность из 3-5,

30

предпочтительно 4-5, более предпочтительно 4 N, где каждый N независимо выбран из нуклеотида, выбранного из A, U, T, G и C или аналогов этих нуклеотидов; и

где G представляет собой гуанозин или его аналог и может быть необязательно заменен цитидином или его аналогом, при условии, что комплементарный ему нуклеотид цитидин в стебле2 заменен гуанозином;

35

последовательность петли $[N_{0-4}(U/T)N_{0-4}]$ расположена между элементами стебель1 и стебель2 и представляет собой непрерывную последовательность из 3-5 нуклеотидов, более предпочтительно 4 нуклеотидов;

где каждый N_{0-4} не зависит от другой непрерывной последовательности из 0-4,

40

предпочтительно 1-3, более предпочтительно 1-2 N, где каждый N независимо выбран из нуклеотида, выбранного из A, U, T G и C или аналогов этих нуклеотидов; и

где U/T представляет собой уридин или необязательно тимидин;

стебель2 $[N_{3-5}CN_{0-2}]$ обратен комплементарен или частично обратен комплементарен элементу стебель1 и представляет собой непрерывную последовательность из 5-7 нуклеотидов;

45

где N_{3-5} представляет собой непрерывную последовательность из 3-5, предпочтительно 4-5, более предпочтительно 4 N, где каждый N независимо выбран из нуклеотида, выбранного из A, U, T, G и C или аналогов этих нуклеотидов;

где N_{0-2} представляет собой непрерывную последовательность из 0-2,

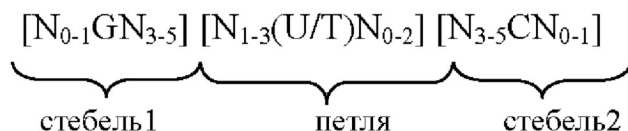
предпочтительно из 0-1, более предпочтительно 1 N, где каждый N независимо выбран из нуклеотида, выбранного из A, U, T, G или C или аналогов этих нуклеотидов; и

где C представляет собой цитидин или его аналог и может быть необязательно заменен гуанозином или его аналогом, при условии, что комплементарный ему нуклеозид гуанозин в стебле1 заменен цитидином;

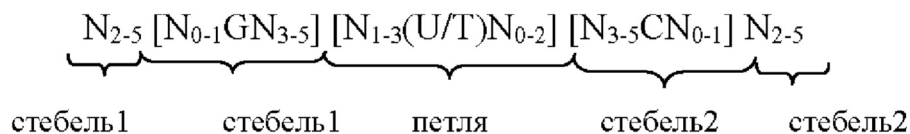
при этом стебель1 и стебель2 способны к спариванию оснований друг с другом с образованием обратно комплементарной последовательности, в которой спаривание оснований может происходить между стебелем1 и стебелем2, например, путем спаривания оснований по Уотсону-Крику нуклеотидов A и U/T или G и C или путем спаривания оснований не по Уотсону-Крику, например, путем неоднозначного спаривания оснований, спаривания оснований, обратного спариванию по Уотсону-Крику, спаривания оснований по Хугстину, спаривания оснований, обратного спариванию по Хугстину, или они способны к спариванию оснований друг с другом с образованием частично обратно комплементарной последовательности, при этом может происходить неполное спаривание оснований между стебелем1 и стебелем2, поскольку одно или несколько оснований в одном из стеблей не имеют комплементарного основания в обратно комплементарной последовательности другого стебля.

В соответствии с дополнительным предпочтительным вариантом реализации последовательность нуклеиновой кислоты, в частности, последовательность РНК может содержать по меньшей мере одну последовательность гистоновой структуры «петля-на-стебле» в соответствии с по меньшей мере одной из следующих конкретных Формул VIIa или VIIIa:

Формула VIIa (последовательность «петля-на-стебле» без элементов, граничащих со стеблем):



Формула VIIIa (последовательность «петля-на-стебле» с элементами, граничащими со стеблем):



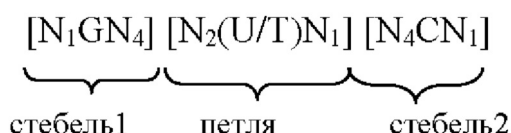
граничный элемент

граничный элемент

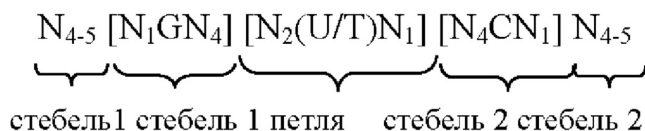
в которой N, C, G, T и U определены выше.

В соответствии с дополнительным еще более особенно предпочтительным вариантом реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна нуклеиновая кислота, предпочтительно по меньшей мере одна РНК может содержать по меньшей мере одну последовательность гистоновой структуры «петля-на-стебле» в соответствии с по меньшей мере одной из следующих конкретных Формул VIIb или VIIIb:

Формула VIIb (последовательность «петля-на-стебле» без элементов, граничащих со стеблем):



5 Формула VIIIb (последовательность «петля-на-стебле» с элементами, граничащими со стеблем):



граничный элемент

граничный элемент

в которой N, C, G, T и U определены выше.

Особенно предпочтительная последовательность гистоновой структуры «петля-на-стебле» представляет собой последовательность CAAAGGCTCTTTTCAGAGCCACCA (в соответствии с SEQ ID NO: 15) или более предпочтительно соответствующую последовательность РНК CAAAGGCUCUUUCAGAGCCACCA (в соответствии с SEQ ID NO: 16).

Любую из вышеуказанных модификаций можно применять к последовательности нуклеиновой кислоты, в частности, к последовательности ДНК и/или РНК согласно настоящему изобретению, а также к любой ДНК или РНК, которая применяется согласно настоящему изобретению, и можно комбинировать, если это целесообразно или необходимо, друг с другом в любой комбинации, при условии, что эти комбинации модификаций не влияют друг на друга в соответствующей последовательности нуклеиновой кислоты. Специалист в данной области техники сможет сделать свой выбор соответствующим способом.

Последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, в частности, последовательность РНК в соответствии с настоящим изобретением, которая содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность, определенную в настоящем документе, предпочтительно может содержать 5'-НТО и/или 3'-НТО, предпочтительно содержащую по меньшей мере одну гистоновую структуру «петля-на-стебле». 3'-НТО последовательности РНК в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно содержит также последовательность полиА и/или полиС, определенную в настоящем документе. Отдельные элементы 3'-НТО могут встречаться в ней в любом порядке от 5'-конца к 3'-концу вдоль последовательности РНК согласно настоящему изобретению. Помимо этого, могут содержаться и другие элементы, описанные в настоящем документе, такие как стабилизирующая последовательность, определенная в настоящем документе (например, происходящая из НТО гена глобина), последовательности IRES и т.д. Каждый из элементов также может повторяться в последовательности РНК согласно настоящему изобретению по меньшей мере один раз (особенно в ди- или мультицистронных конструкциях), предпочтительно два или более раз. В качестве примера, отдельные элементы могут присутствовать в последовательности нуклеиновой кислоты, в частности, в последовательности РНК согласно настоящему изобретению, в следующем порядке:

5'-кодирующая последовательность-гистоновая структура «петля-на-стебле»-последовательность полиА/С-3'; или

5'-кодирующая последовательность полиА/С-гистоновая структура «петля-на-стебле»-3'; или

5'-кодирующая последовательность гистоно́вая структура «петля-на-стебле» сигнал полиаденилирования-3'; или

5'-кодирующая последовательность-сигнал полиаденилирования-гистоно́вая структура «петля-на-стебле»-3'; или

5'-кодирующая последовательность гистоно́вая структура «петля-на-стебле»-гистоно́вая структура «петля-на-стебле» - последовательность полиА/С-3'; или

5'-кодирующая последовательность-гистоно́вая структура «петля-на-стебле»-гистоно́вая структура «петля-на-стебле» сигнал полиаденилирования-3'; или

5'-кодирующая последовательность-стабилизирующая последовательность-последовательность полиА/С-гистоно́вая структура «петля-на-стебле»-3'; или

5'-кодирующая последовательность-стабилизирующая последовательность-последовательность полиА/С последовательность полиА/С гистоно́вая структура «петля-на-стебле»-3'; и т.п.

В соответствии с дополнительным вариантом реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, применяемая в настоящем изобретении, в частности, последовательность РНК, предпочтительно содержит по меньшей мере один из следующих структурных элементов: элемент 5'- и/или 3'-нетранслируемой области (элемент НТО), в частности, элемент 5'-НТО, который предпочтительно содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая происходит из 5'-НТО гена ТОР или из его фрагмента, гомолога или варианта, или элемент 5'- и/или 3'-НТО, который предпочтительно может происходить из гена, который обеспечивает стабильную РНК, или из его гомолога, фрагмента или варианта; гистоно́вую структуру «петля-на-стебле», предпочтительно гистоно́вую структуру «петля-на-стебле» в своей 3'-нетранслируемой области; 5'-кэп структуру; хвост полиА; или последовательность полиС.

Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, в частности, последовательность РНК содержит, предпочтительно в направлении от 5'- к 3'-концу:

- a.) 5'-кэп структуру, предпочтительно m7GpppN;
- b.) по меньшей мере одну кодирующую последовательность, кодирующую по меньшей мере один представляющий интерес антигенный пептид или представляющий интерес белок или его фрагмент или вариант,
- c.) элемент 3'-НТО, содержащий или состоящий из последовательности нуклеиновой кислоты, которая происходит из гена альфа-глобина, его гомолога, фрагмента или варианта;
- d.) необязательно последовательность полиА, предпочтительно содержащую 64 аденозина;
- e.) необязательно последовательность полиС, предпочтительно содержащую 30 цитозинов; и
- f.) необязательно гистоно́вую структуру «петля-на-стебле», предпочтительно содержащую последовательность РНК в соответствии с SEQ ID NO: 16.

В соответствии с другим особенно предпочтительным вариантом реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, в частности, последовательность РНК, применяемая в соответствии с настоящим изобретением, содержит, предпочтительно в направлении от 5'- к 3'-концу:

- a.) 5'-кэп структуру, предпочтительно m7GpppN;
- b.) элемент 5'-НТО, который содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая происходит из 5'-НТО гена ТОР, его гомолога, фрагмента

или варианта;

с.) по меньшей мере одну кодирующую последовательность, кодирующую по меньшей мере один представляющий интерес антигенный пептид или представляющий интерес белок или его фрагмент или вариант;

5 d.) элемент 3'-НТО, содержащий или состоящий из последовательности нуклеиновой кислоты, которая происходит из гена, обеспечивающего стабильную РНК;

е.) необязательно последовательность полиА, предпочтительно содержащую 64 аденозина;

10 f.) необязательно последовательность полиС, предпочтительно содержащую 30 цитозинов; и

необязательно гистоновую структуру «петля-на-стебле», предпочтительно содержащую последовательность РНК в соответствии с SEQ ID NO: 16.

Нуклеиновые кислоты, применяемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены любым способом, известным в данной области техники, включая 15 синтетические способы, такие как, например, твердофазный синтез, а также способы в условиях *in vitro*, такие как реакции транскрипции в условиях *in vitro* или реакции в условиях *in vivo*, такие как наработка ДНК-плазмид в бактериях в условиях *in vivo*.

В соответствии с другим предпочтительным вариантом реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота находится в форме кодирующей нуклеиновой кислоты, 20 предпочтительно иРНК, которая дополнительно или согласно другому варианту кодирует секреторный сигнальный пептид. Такие сигнальные пептиды обычно содержат приблизительно от 15 до 30 аминокислот и предпочтительно расположены на N-конце кодируемого пептида, но не ограничиваясь этим. Сигнальные пептиды, определенные в настоящем документе, предпочтительно позволяют транспортировать кодируемый 25 белок или пептид в конкретную область клетки или в конкретный клеточный компартмент, например, на поверхность клетки, в эндоплазматический ретикулум (ER) или в эндосомально-лизосомальный компартмент.

Белки или пептиды, кодируемые нуклеиновой кислотой, могут представлять собой фрагменты или варианты природных белков. Такие фрагменты или варианты обычно 30 могут содержать последовательность, которая идентична полноразмерной последовательностью дикого типа одного из вышеупомянутых белков или пептидов или последовательностям их кодирующих последовательностей нуклеиновых кислот по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, предпочтительно по меньшей мере на 70%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, в равной мере более 35 предпочтительно по меньшей мере на 85%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 95% или даже на 97%, либо на уровне нуклеиновой кислоты, либо на уровне аминокислот.

«Фрагменты» белков или пептидов применительно к настоящему изобретению могут содержать последовательность белка или пептида, определенную в настоящем 40 документе, которая, в отношении ее аминокислотной последовательности или кодирующей ее последовательности нуклеиновой кислоты, усечена на N-конце, С-конце и/или внутри последовательности, по сравнению с аминокислотной последовательностью нативного белка или кодирующей ее последовательностью нуклеиновой кислоты. Такое усечение может происходить либо на уровне аминокислотной последовательности, 45 либо на уровне нуклеиновой кислоты. Соответственно, идентичность последовательности в отношении такого фрагмента может относиться ко всему белку или пептиду или ко всей кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты. То же самое применимо к нуклеиновым кислотам.

Такие фрагменты белков или пептидов могут содержать последовательность, содержащую от приблизительно 6 до приблизительно 20 или более аминокислот, которая включает фрагменты, процессированные и представленные молекулами ГКГС класса I, предпочтительно содержащие от приблизительно 8 до приблизительно 10 аминокислот, например, 8, 9 или 10 (или даже 6, 7, 11 или 12 аминокислот) в длину, а также фрагменты, процессированные и представленные молекулами ГКГС класса II, предпочтительно содержащие приблизительно 13 или более аминокислот, например, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или даже более аминокислот в длину, причем указанные фрагменты могут быть выбраны из любой части аминокислотной последовательности. Эти фрагменты обычно распознаются Т-клетками в форме комплекса, состоящего из пептидного фрагмента и молекулы ГКГС, т.е. фрагменты обычно не распознаются в своей нативной форме.

Фрагменты белков или пептидов также могут содержать эпитопы таких белков или пептидов. Эпитопы (также называемые «антигенные детерминанты») применительно к настоящему изобретению обычно представляют собой фрагменты, расположенные на внешней поверхности нативных белков или пептидов, предпочтительно содержащие от 5 до 15 аминокислот, более предпочтительно содержащие от 5 до 12 аминокислот, от 6 до 9 аминокислот, которые могут распознаваться антителами или рецепторами В-клеток в своей нативной форме. Такие эпитопы также могут быть выбраны из любого из вариантов таких белков или пептидов, упомянутых в настоящем документе. В данном случае антигенные детерминанты могут представлять собой конформационные или прерывистые эпитопы, которые состоят из сегментов белков или пептидов, которые являются прерывистыми в аминокислотной последовательности белков или пептидов, но объединяются в трехмерную структуру или непрерывные или линейные эпитопы, которые состоят из одной полипептидной цепи.

«Варианты» белков или пептидов, определенных в настоящем документе, могут кодироваться нуклеиновой кислотой, при этом нуклеотиды, кодирующие белок или пептид, заменены так, что кодируемая аминокислотная последовательность изменена. Это приводит к получению белка или пептида с одной или более мутациями, например, с одной или более замененными, вставленными и/или удаленными аминокислотами. Предпочтительно эти фрагменты и/или варианты имеют одинаковую биологическую функцию или специфическую активность по сравнению с полноразмерным нативным белком, например, его специфическое антигенное свойство.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения массовое соотношение катионного пептида или полимера и соединения нуклеиновой кислоты составляет по меньшей мере приблизительно 1. Например, оно может находиться в пределах диапазона от приблизительно 1 до приблизительно 20 или от приблизительно 1 до приблизительно 15, например, приблизительно 2 ± 1 , 3 ± 1 , 4 ± 1 , 5 ± 1 , 6 ± 1 , 7 ± 1 , 8 ± 1 , 9 ± 1 , 10 ± 1 , 11 ± 1 , 12 ± 1 , 13 ± 1 , 14 ± 1 .

При выражении в нмоль катионного липидоида на мкг соединения нуклеиновой кислоты это количество предпочтительно не превышает приблизительно 40 нмоль/мкг. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения это соотношение составляет не более приблизительно 15 нмоль/мкг и, в частности, не более 10 нмоль/мкг. Согласно некоторым конкретным вариантам реализации настоящего изобретения количество даже намного ниже, например, приблизительно 2 нмоль/мкг или менее, или приблизительно 1,5 нмоль/мкг или менее, или даже приблизительно 1 нмоль/мкг или менее, например, находится в пределах диапазона от приблизительно 0,05 до приблизительно 2 нмоль/мкг, или от приблизительно 0,1 до приблизительно 1,5 нмоль/мкг, или от приблизительно 0,25 до приблизительно 1,0 нмоль/мкг, или от

приблизительно 0,3 до приблизительно 0,8 нмоль/мкг, например, приблизительно 0,4 нмоль/мкг, соответственно.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения массовое соотношение катионного пептида или полимера и соединения нуклеиновой кислоты составляет по меньшей мере приблизительно 1, и/или соотношение липидоида и соединения нуклеиновой кислоты составляет не более приблизительно 15 нмоль/мкг.

Количество липидоида является не только относительно низким по отношению к транспортируемой нуклеиновой кислоте, но также по отношению к катионному пептиду или полимеру. В целом предпочтительно массовое соотношение липидоида и катионного пептида или полимера не превышает приблизительно 1:10, или не превышает приблизительно 1:20, или 1:30, или 1:40, соответственно. Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения соответствующее соотношение не превышает приблизительно 1:50 и/или соотношение липидоида и нуклеиновой кислоты не превышает приблизительно 2 нмоль/мкг.

Композиция также может характеризоваться соотношением N/P, которое в соответствии с настоящим изобретением определяется как молярное соотношение атомов азота («N») основных групп катионного пептида или полимера и фосфатных групп («P») соединения нуклеиновой кислоты, которое применяют в качестве груза; если из контекста не ясно, что подразумевается другое соотношение N/P. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения соотношение N/P составляет от приблизительно 0,1 до приблизительно 20, или от приблизительно 0,2 до приблизительно 15, или от приблизительно 2 до приблизительно 15, или от приблизительно 2 до приблизительно 12.

Соотношение N/P может быть рассчитано на основании того, что, например, 1 мкг РНК обычно содержит приблизительно 3 нмоль остатков фосфата, при условии, что РНК проявляет статистическое распределение оснований. Значение «N» пептида или полимера может быть рассчитано на основании его молекулярной массы или его средней молекулярной массы, если пептид или полимер имеет распределение молекулярных масс, и относительного содержания катионных или катионизируемых групп. Согласно дополнительному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения соотношение N/P находится в пределах диапазона от приблизительно 0,2 до приблизительно 15, или в пределах диапазона от приблизительно 0,2 до приблизительно 13, или от приблизительно 0,3 до приблизительно 12, или от приблизительно 0,5 до приблизительно 10, или от приблизительно 0,6 до приблизительно 8, соответственно.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения соотношение N/P выбрано в пределах диапазона от приблизительно 2 до приблизительно 15 или от приблизительно 2 до приблизительно 12. Композиция в соответствии с настоящим изобретением, которая проявляет такое соотношение N/P, является особенно подходящей для применения, включающего внутривенное введение композиции.

Как уже упоминалось выше, количество липидоида в композиции согласно настоящему изобретению, а также в наночастице(ах) обычно значительно ниже, чем в обычных носителях на основе липидов для нуклеиновых кислот в качестве груза.

Теоретически, количество липидоида также может быть выражено как соотношение N/P. В этом случае «N» представляет моли основных групп липидоида, тогда как «P» относится к фосфатным группам нуклеиновой кислоты, которую применяют в качестве груза. В композициях согласно настоящему изобретению, и, соответственно, также в наночастицах согласно настоящему изобретению такое связанное с липидоидом соотношение N/P предпочтительно не превышает приблизительно 3, в частности, не

превышает приблизительно 2. Также предпочтительными являются связанные с липидоидом соотношения N/P, которые находятся в пределах диапазона 1 или менее, например, от приблизительно 0,01 до приблизительно 1, или от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,8, или от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,6, или от

5 приблизительно 0,1 до приблизительно 0,5, соответственно.

Композиция согласно настоящему изобретению может содержать дополнительные компоненты, такие как один или более неактивных ингредиентов, вспомогательных агентов или вспомогательных веществ. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения композиция содержит одно или более соединений, независимо

10 выбранных из нацеливающих агентов, проникающих в клетки агентов и агентов, обеспечивающих малозаметность.

В настоящем документе нацеливающий агент представляет собой соединение, которое имеет аффинность в отношении мишени, такой как мишень, расположенная на поверхности клетки-мишени или вблизи нее, или внутриклеточная мишень. Например,

15 нацеливающий агент может представлять собой антитело, фрагмент антитела или низкомолекулярный агент, имеющий аффинность в отношении представляющей интерес мишени. Необязательно такой агент может быть включен в катионный пептид или полимер. В других случаях такой агент может быть включен в композицию в качестве дополнительного компонента без ковалентного присоединения к любому из соединений-носителей.

То же самое применимо к необязательному агенту, проникающему в клетку, и/или агенту, обеспечивающему малозаметность. В настоящем документе агенты, проникающие в клетки, включают проникающие в клетку пептиды (СРР), а также любые другие соединения с аналогичной биологической или биомиметической функцией,

25 т.е. для облегчения поглощения груза в клетки. Агент, обеспечивающий малозаметность, применительно к настоящему изобретению, означает соединение или материал, который, при присоединении к молекуле или частице груза, обеспечивает более длительный период времени циркуляции в кровотоке субъекта, которому его вводят с помощью инъекции, например, с помощью внутривенной инъекции или инфузии. Примером агента,

30 обеспечивающего малозаметность, является пегилированный липид, липидный домен которого способен функционировать в качестве якоря в наночастице, например, за счет взаимодействия с гидрофобной группой липидоида, тогда как его полиэтиленгликолевый (ПЭГ) домен может придавать свойства «малозаметности», это означает, что транспортируемый материал проявляет пониженное взаимодействие с

35 иммунной системой субъекта при циркуляции в кровотоке, что обычно связано с более длительным периодом полужизни в крови, а также сниженной иммуногенностью и антигенностью.

Примеры подходящих пегилированных липидов включают 1-монометоксиполиэтиленгликоль-2,3-димиристоилглицерин (ПЭГ-ДМГ), N-[

40 (метоксиполиэтиленгликоль)₂₀₀₀карбамоил]-1,2-димиристилоксипропил-3-амин (ПЭГ-К-ДМА) или 1,2-диацил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-метоксиполиэтиленгликоль; в случае последнего ацил может означать, например, миристоил, пальмитоил, стеароил или олеоил, и полиэтиленгликоль обычно представляет собой полиэтиленгликоль-350-полиэтиленгликоль-5000, в частности, полиэтиленгликоль-750, полиэтиленгликоль-

45 1000, полиэтиленгликоль-2000 и полиэтиленгликоль-3000.

В композиции согласно настоящему изобретению компоненты, т.е. катионный пептид или полимер, липидоид и соединение нуклеиновой кислоты, могут быть включены в одну или более наночастиц. Другими словами, композиция может содержать одну или

более наночастиц, содержащих катионный пептид или полимер, липидоид и соединение нуклеиновой кислоты. Согласно другому варианту композиция может содержать одну или более наночастиц, содержащих по меньшей мере катионный пептид или полимер и соединение нуклеиновой кислоты. В таких вариантах реализации каждый из
5 компонентов может быть выбран, как описано выше, включая все варианты и предпочтительные параметры в отношении указанных признаков.

Обычно такие наночастицы образуются, когда катионный пептид или полимер и также необязательно липидоид комбинируют с соединением нуклеиновой кислоты, которые могут совместно образовывать комплекс носитель-груз, как более подробно
10 описано ниже. Однако также возможно, что два компонента, т.е. полимер или пептид и соединение нуклеиновой кислоты, взаимодействуют так, что образуют коллоидные структуры, которые напоминают наночастицы, тогда как липидоид не включен или не полностью включен в такой комплекс или наночастицу.

В настоящем документе «наночастица» представляет собой субмикронную частицу, имеющую любую структуру или морфологию. Субмикронные частицы также могут называться коллоидами или коллоидными. В отношении материала, на котором основана наночастица, а также структуры или морфологии наночастица может быть классифицирована, например, как нанокапсула, везикула, липосома, липидная наночастица, мицелла, сшитая мицелла, липоплекс, полиплекс, смешанный или
20 гибридный комплекс, чтобы упомянуть лишь некоторые из возможных обозначений конкретных типов наночастиц.

В соответствии с этим аспектом настоящее изобретение также относится к определенной выше наночастице как таковой, а также к множеству таких наночастиц, в частности, множеству предпочтительных наночастиц, как более подробно описано
25 ниже.

Согласно одному из предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения наночастица содержит комплекс, образованный соединением нуклеиновой кислоты и катионным пептидом или полимером и/или липидоидом. Согласно
30 дополнительному конкретному варианту реализации настоящего изобретения наночастица по существу состоит из этих компонентов (a), (b) и (c). Согласно другому конкретному варианту реализации настоящего изобретения наночастица по существу состоит из (a) одного или более катионных пептидов и/или полимеров; (b) одного или более липидоидов; (c) одного или более соединений нуклеиновых кислот; и
35 необязательно (d) одного или более соединений, независимо выбранных из нацеливающих агентов, проникающих в клетки агентов и агентов, обеспечивающих малозаметность. Аналогично вышеуказанному, для этих вариантов реализации также полностью применимы варианты и предпочтительные параметры, которые были описаны выше в отношении отдельного компонента.

Согласно одному из предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения наночастица(-ы) согласно настоящему изобретению содержит комплекс катионного пептида или полимера и катионного липидоида; или комплекс катионного пептида или полимера и/или катионного липидоида с соединением нуклеиновой кислоты. Другими словами, наночастицы могут содержать комплекс или даже по существу представлять комплекс, причем указанный комплекс может состоять из любых двух
45 элементов или всех трех элементов:

- (a) катионного пептида или полимера;
- (b) катионного липидоида; и/или
- (c) соединения нуклеиновой кислоты.

В настоящем документе «комплекс» представляет собой ассоциацию молекул в более крупные блоки, удерживаемые вместе силами, которые слабее ковалентных химических связей. Такой комплекс также может называться ассоциативным комплексом. Силы, с помощью которых комплекс удерживается вместе, часто представляют собой водородные связи, также известные как водородные мостики, дисперсионные взаимодействия и/или дипольное притяжение. Комплекс, включающий липид или липидоид и нуклеиновую кислоту, часто называется липоплексом, и комплекс полимера и нуклеиновой кислотой называется полиплексом.

В присутствии как катионного пептида или полимера, так и липидоида, как предусмотрено в настоящем изобретении, нуклеиновая кислота может образовывать гибридный комплекс, одновременно имеющий характеристики липоплекса и полиплекса. Не желая быть связанными соответствием какой-либо теории, авторы настоящего изобретения полагают, что такие гибридные комплексы, если они образуются в композиции или наночастице согласно настоящему изобретению, могут быть особенно стабильными, поскольку они сочетают в себе различные типы взаимодействий между грузом и различными типами носителей, включая разные домены или области молекул груза. С другой стороны, также считается возможным, что образование комплекса соединения нуклеиновой кислоты при реализации настоящего изобретения прежде всего достигается за счет катионного пептида или белка, в частности, если применяют лишь относительно небольшие количества липидоида, и что присутствие липидоида особенно влияет на судьбу комплекса после его поглощения живой клеткой. В любом случае, настоящее изобретение не ограничено какой-либо теорией, и любой комплекс, образованный из двух или более компонентов, определенных в настоящем документе, следует понимать как комплекс в соответствии с настоящим изобретением.

Согласно одному из предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения наночастица согласно настоящему изобретению по существу состоит из комплекса груз-носитель, как определено выше. В данном конкретном случае выражение «по существу состоит из» не следует понимать как исключение присутствия незначительных количеств вспомогательных материалов в наночастицах, таких как растворители, сорастворители, поверхностно-активные вещества, агенты для поддержания изотоничности и т.п.

Согласно другому варианту по меньшей мере приблизительно 50% (масс./масс.) наночастиц в композиции согласно настоящему изобретению состоят из катионного пептида или полимера, липидоида и биологически активного транспортируемого материала, или по меньшей мере 60% (масс./масс.), по меньшей мере 70% (масс./масс.), по меньшей мере 80% (масс./масс.), по меньшей мере 85% (масс./масс.), по меньшей мере 90% (масс./масс.) или по меньшей мере 95% (масс./масс.), соответственно.

Применительно к настоящему изобретению «биологически активный транспортируемый материал» обычно относится к соединению, или смеси или комбинации соединений, которое предназначено для доставки субъекту или в орган, ткань или клетку субъекта с помощью состава, носителя, вектора или наполнителя для достижения желательного биологического эффекта, такого как фармакологический эффект, включая любой тип профилактического, терапевтического, диагностического или облегчающего эффекта. Доставка биологически активного транспортируемого материала является целью введения продукта, содержащего такой материал, тогда как состав или носитель, вектор или наполнитель, которые в некоторых случаях также могут рассматриваться как биологически активные, преимущественно являются

средством доставки транспортируемого материала. Если другие значения не следуют из контекста, выражения «биологически активный транспортируемый материал», «биологически активное соединение», «транспортируемый материал», «груз» и тому подобные используют как синонимы. Композиция согласно настоящему изобретению, а также наночастицы согласно настоящему изобретению содержат в качестве транспортируемого биологически активного материала по меньшей мере одно соединение нуклеиновой кислоты или материал на основе нуклеиновой кислоты. Необязательно один или более других активных ингредиентов, которые могут как являться соединением нуклеиновой кислоты, так и не являться им, могут присутствовать и также образовывать часть груза.

В настоящем документе термин «носитель» или «наполнитель» обычно может означать любое соединение, конструкцию или материал, являющийся частью состава, который способствует, обеспечивает или улучшает доставку биологически активного соединения или материала. Он может быть по существу биологически инертным или биологически активным в том смысле, что он в значительной степени взаимодействует с тканями, клетками или субклеточными компонентами субъекта и, например, усиливает поглощение биологически активного транспортируемого материала. Применительно к настоящему изобретению термины также могут быть применимы к липидоиду, катионному пептиду или полимеру или к их комбинации или смеси.

«Состав» в отношении биологически активного соединения, которое включено в него и вводится с помощью состава, представляет собой любой продукт, который является фармацевтически приемлемым в отношении его композиции и способа изготовления, который содержит по меньшей мере одно биологически активное соединение и одно вспомогательное вещество, носитель, наполнитель или другой вспомогательный материал.

Как уже упоминалось, композиция согласно настоящему изобретению может содержать дополнительные компоненты, такие как одно или более соединений, независимо выбранных из нацеливающих агентов, проникающих в клетки агентов и агентов, обеспечивающих малозаметность, как описано выше. Любой из этих дополнительных компонентов может быть необязательно включен в наночастицу (ы).

В настоящем документе нацеливающий агент представляет собой соединение, которое имеет аффинность в отношении мишени, такой как мишень, расположенная на поверхности клетки-мишени или вблизи нее, или внутриклеточная мишень. Например, нацеливающий агент может представлять собой антитело, фрагмент антитела или низкомолекулярный агент, имеющий аффинность в отношении представляющей интерес мишени. Как обсуждалось в отношении соединения с группой Р или его дисульфидсоединенным мультимером, такой агент необязательно может быть включен в такое соединение. В других случаях такой агент может быть включен в наночастицу в качестве дополнительного компонента без ковалентного присоединения к любому из соединений-носителей.

То же самое применимо к необязательному агенту, проникающему в клетку, и/или агенту, обеспечивающему малозаметность. В настоящем документе агент, проникающий в клетку, включает проникающие в клетку пептиды (СРР), определенные выше, а также любые другие соединения с аналогичной биологической или биомиметической функцией, т.е. для облегчения поглощения груза в клетки. Агент, обеспечивающий малозаметность, применительно к настоящему изобретению, означает соединение или материал, который при включении в наночастицу, содержащую катионный липидоид, соединение, содержащее группу Р или его дисульфидсоединенный мультимер, и транспортируемую

нуклеиновую кислоту, обеспечивает более длительный период времени циркуляции наночастиц в кровотоке субъекта, которому вводят наночастицы, например, с помощью внутривенной инъекции или инфузии. Примером агента, обеспечивающего малозаметность, является пегилированный липид, липидный домен которого способен функционировать в качестве якоря в наночастице, например, за счет взаимодействия с гидрофобной группой липидоида, тогда как его полиэтиленгликолевый (ПЭГ) домен может придавать свойства «малозаметности» наночастице, это означает, что наночастица проявляет пониженное взаимодействие с иммунной системой субъекта при циркуляции в кровотоке, что обычно связано с более длительным периодом полужизни наночастицы из крови, а также с пониженной иммуногенностью и антигенностью.

Примеры подходящих пегилированных липидов включают 1-монометоксиполиэтиленгликоль-2,3-димиристоилглицерин (ПЭГ-ДМГ), N-[(метоксиполиэтиленгликоль)₂₀₀₀]карбамоил]-1,2-димиристилоксипропил-3-амин (ПЭГ-К-ДМА) или 1,2-диацил-sn-глицеро-3-фосфэтаноламин-N-[(метоксиполиэтиленгликоль)]; в случае последнего ацил может означать, например, миристоил, пальмитоил, стеароил или олеоил, и полиэтиленгликоль обычно представляет собой полиэтиленгликоль-350-полиэтиленгликоль-5000, в частности, полиэтиленгликоль-750, полиэтиленгликоль-1000, полиэтиленгликоль-2000 и полиэтиленгликоль-3000.

Другие нейтральные липиды обычно необязательно должны быть включены в композицию или в наночастицу (ы) согласно настоящему изобретению. Это является дополнительным преимуществом настоящего изобретения, в отличие от большинства известных систем липидных носителей, подходящих для комплексообразования и доставки транспортируемой нуклеиновой кислоты, которые требуют включения так называемого вспомогательного липида, обычно даже в значительных количествах. В настоящем документе вспомогательные липиды представляют собой некатионные или некатионируемые (кроме цвиттерионных) фосфолипиды или стероиды, которые могут способствовать стабильности липидных наночастиц в комбинации с нуклеиновыми кислотами. Соответственно, согласно одному из предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения наночастица, а также композиция согласно настоящему изобретению не содержат такие вспомогательные липиды.

Наночастицы имеют гидродинамический диаметр, определенный методом динамического рассеяния лазерного излучения, который не превышает приблизительно 1000 нм. Более предпочтительно их гидродинамический диаметр не превышает приблизительно 800 нм, например, находится в пределах диапазона от приблизительно 30 нм до приблизительно 800 нм. Согласно другим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения гидродинамический диаметр находится в пределах диапазона от приблизительно 50 нм до приблизительно 300 нм или от приблизительно 60 нм до приблизительно 250 нм, или от приблизительно 60 нм до приблизительно 150 нм, или от приблизительно 60 нм до приблизительно 120 нм, соответственно. Несмотря на то, что указанные значения диаметра отдельных наночастиц являются предпочтительными, это не исключает присутствия в композиции согласно настоящему изобретению наночастиц другого диаметра. Однако настоящее изобретение предпочтительно реализовано с применением композиций, в которых многие или даже большинство наночастиц имеют указанные диаметры.

Помимо этого, композиция в соответствии с настоящим изобретением, которая содержит множество таких наночастиц, также может характеризоваться средним гидродинамическим диаметром, определенным методом динамического рассеяния

лазерного излучения, который также предпочтительно не превышает 800 нм, например, находится в пределах диапазона от приблизительно 30 нм до приблизительно 800 нм. В отношении гидродинамического диаметра «среднее» следует понимать как Z-среднее, также известное как среднее значение кумулянтов. Понятно, что измерение с помощью метода динамического рассеяния лазерного излучения также следует проводить с соответствующим диспергатором и в соответствующем разведении в соответствии с рекомендациями производителя используемого аналитического оборудования. Особенно предпочтительным является средний гидродинамический диаметр, который находится в пределах диапазона от приблизительно 50 нм до приблизительно 300 нм или от приблизительно 60 нм до приблизительно 250 нм, от приблизительно 60 нм до приблизительно 150 нм, или от приблизительно 60 нм до приблизительно 120 нм, соответственно.

Наночастицы могут быть дополнительно охарактеризованы на основании их электрокинетического потенциала, который может быть выражен с помощью дзета-потенциала. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения значение дзета-потенциала находится в пределах диапазона от приблизительно 0 мВ до приблизительно 50 мВ или от приблизительно 0 мВ до приблизительно 10 мВ, соответственно. Согласно другим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения дзета-потенциал является положительным, т.е. выше 0 мВ, но не выше 50 мВ, или 40 мВ, или 30 мВ, или 20 мВ, или 10 мВ, соответственно.

Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения значение дзета-потенциала находится в пределах диапазона от приблизительно 0 мВ до приблизительно -50 мВ или от приблизительно 0 мВ до приблизительно -10 мВ, соответственно. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения дзета-потенциал является отрицательным, т.е. ниже 0 мВ, но не ниже -50 мВ, или -40 мВ, или -30 мВ, или -20 мВ, или -10 мВ, соответственно.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения значение дзета-потенциала находится в пределах диапазона от 0 мВ до -50 мВ для частиц, имеющих соотношение N/P менее 1 (особенно подходящих для местного введения). Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения значение дзета-потенциала находится в пределах диапазона от 0 мВ до +50 мВ для частиц, имеющих соотношение N/P более 1 (особенно подходящих для внутривенного или другого внутрисосудистого применения).

Количество катионного соединения, содержащего катионную группу Р или ее дисульфидсоединенный мультимер, следует выбирать с учетом количества транспортируемой нуклеиновой кислоты. Согласно одному из предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения эти количества выбраны так, чтобы получить соотношение N/P в пределах диапазона от приблизительно 0,1 до приблизительно 20. В данном случае соотношение N/P определяется как молярное соотношение атомов азота («N») основных азотсодержащих групп соединения, содержащего группу Р или ее дисульфидсоединенный мультимер, и фосфатных групп («Р») нуклеиновой кислоты, которую применяют в качестве груза. Соотношение N/P может быть рассчитано на основании того, что, например, 1 мкг РНК обычно содержит приблизительно 3 нмоль остатков фосфата, при условии, что РНК проявляет статистическое распределение оснований. Значение «N» пептида или полимера может быть рассчитано на основании его молекулярной массы или его средней молекулярной массы в том случае, если пептид или полимер имеет распределение молекулярных масс, и относительного содержания катионных или катионизируемых групп. Согласно

дополнительному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения соотношение N/P находится в пределах диапазона от приблизительно 0,2 до приблизительно 15, или в пределах диапазона от приблизительно 0,2 до приблизительно 13, или от приблизительно 0,3 до приблизительно 12, или от приблизительно 0,5 до приблизительно 10, или от приблизительно 0,6 до приблизительно 8, соответственно.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения соотношение N/P выбрано в пределах диапазона от приблизительно 2 до приблизительно 15 или от приблизительно 2 до приблизительно 12. Композиция согласно настоящему изобретению, которая имеет такое соотношение N/P, является особенно подходящей для применения, включающего внутривенное введение композиции.

Как уже упоминалось выше, количество катионного липидоида в композиции согласно настоящему изобретению, а также в наночастице (ах) обычно значительно ниже, чем в обычных носителях на основе липидоида для нуклеиновых кислот в качестве груза. Настоящее изобретение может быть осуществлено с применением всего лишь от приблизительно 0,1% до приблизительно 10% от обычного количества липидоидов, применяемых в липоплексах или липидоидных наночастицах, которые были предложены для доставки, например, РНК и трансфекции клеток. Не желая быть связанными соответствием какой-либо теории, авторы настоящего изобретения полагают, что такое низкое количество липидоида имело существенное значение для достижения высокой переносимости композиции согласно настоящему изобретению.

Количество липидоида также может быть выражено как соотношение N/P. В этом случае «N» представляет моли основных групп катионного липидоида, тогда как «Р» относится к фосфатным группам нуклеиновой кислоты, которая применяется в качестве груза. В композициях согласно настоящему изобретению и, соответственно, также в наночастицах согласно настоящему изобретению, такое соотношение N/P, связанное с липидоидом, предпочтительно не выше приблизительно 3, в частности, не выше приблизительно 2. Также предпочтительными являются соотношения N/P, связанные с липидоидом, которые находятся в пределах диапазона от приблизительно 0,016 до приблизительно 0,650, или от приблизительно 0,032 до приблизительно 0,484, или от приблизительно 0,080 до приблизительно 0,323, или от приблизительно 0,968 до приблизительно 0,258, например, приблизительно 0,129, соответственно.

Количество катионного липидоида является относительно низким не только по отношению к грузу, но также по отношению к пептидному или полимерному носителю, т.е. к количеству соединения, содержащего группу Р или ее мультимер. Обычно предпочтительно массовое соотношение катионного липидоида и соединения, содержащего группу Р или ее дисульфидсоединенный мультимер, не превышает приблизительно 1:10, или не превышает приблизительно 1:20, или 1:30, или 1:40, соответственно. Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения соответствующее соотношение не превышает приблизительно 1:50.

Наночастицы могут быть получены способом, включающим этап комбинирования (i) одного или более катионных пептидов и/или полимеров; (b) одного или более липидоидов, определенных выше, необязательно растворенных в соответствующем растворителе (например, этаноле, ДМСО); и (iii) одного или более соединений нуклеиновых кислот, причем комбинирование проводят в присутствии водосодержащей жидкости, такой, чтобы обеспечить образование наночастиц или множества наночастиц. Для того чтобы обеспечить хорошее смешивание различных агентов, липидоид можно смешивать с катионным партнером по комплексообразованию перед смешиванием с нуклеиновой кислотой. Смешивание можно проводить с помощью подходящего

смесительного устройства (например, комбинирования ламинарного потока с использованием клапана Т- или Y-типа; устройства для микрофлюидизации или путем простого добавления к перемешиваемому раствору).

Композицию, наночастицы или композицию, содержащую наночастицы согласно настоящему изобретению, которая содержит катионный пептид или полимер, липидоид, соединение нуклеиновой кислоты в качестве груза и/или один или более неактивных ингредиентов, и, в частности, композицию, которая содержит наночастицы, описанные выше, предпочтительно изготавливают и обрабатывают так, чтобы она была подходящей для введения субъекту, в частности, животному или человеку.

Предпочтительно композиция является стерильной.

В этом отношении композицию также можно назвать фармацевтической композицией. Это общее предпочтение, которое может быть применено к любому из вариантов и предпочтительных параметров, описанных в настоящем документе, в отношении компонентов и других признаков композиции или наночастиц. Другими словами, настоящее изобретение также относится, например, к фармацевтической композиции, определенной в настоящем документе, в которой соединение нуклеиновой кислоты представляет собой кодирующую нуклеиновую кислоту, которая кодирует по меньшей мере один пептид или белок. Например, кодирующая нуклеиновая кислота может кодировать терапевтически активный белок или антиген. Настоящее изобретение также относится к вакцине, содержащей такую фармацевтическую композицию, в которой кодирующая нуклеиновая кислота кодирует по меньшей мере один антиген. В данном случае вакцина может состоять из фармацевтической композиции или вакцина может содержать ее совместно с другими компонентами.

Фармацевтическую композицию, наночастицы или композицию, содержащую наночастицы, согласно настоящему изобретению можно вводить перорально, парентерально, с помощью ингаляционного спрея, местно, ректально, назально, буккально, вагинально или через имплантированный резервуар. В настоящем документе термин «парентеральный» включает методики подкожной, внутривенной, внутримышечной внутрисуставной, внутрисиновиальной, внутристеральной, внутритекальной, внутрипеченочной, внутриочаговой, внутричерепной, трансдермальной, внутрикожной, внутрилегочной, внутрибрюшинной, внутрисердечной, внутриартериальной и сублингвальной инъекции или инфузии. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фармацевтическую композицию, наночастицы или композицию, содержащую наночастицы, согласно настоящему изобретению можно вводить путем доставки в глаза. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическую композицию, наночастицы или композицию, содержащую наночастицы, согласно настоящему изобретению вводят с помощью субретинальной или внутривитреальной инъекции. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, наночастицы или композицию, содержащую наночастицы, вводят с помощью внутривитреальной инъекции. Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическую композицию, наночастицы или композицию, содержащую наночастицы, вводят с помощью субретинальной инъекции.

Настоящее изобретение также можно применять для лечения субъекта, который страдает или предрасположен к развитию глазного заболевания, расстройства или состояния. В настоящем документе термин «глазное заболевание, расстройство или состояние» относится к заболеванию, расстройству или состоянию, поражающему глаза

и/или зрение. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения глазное заболевание, расстройство или состояние может быть вызвано дефицитом белка или нарушением функций глаза или частей организма, связанных со зрением.

Примерные глазные заболевания, расстройства или состояния включают, но не ограничиваются ими, возрастную дегенерацию желтого пятна (AMD), пигментный увеит (PU), окклюзию ветвей вены сетчатки (BRVO), окклюзию центральной вены сетчатки (CRVO), диабетический отек желтого пятна (DME), цистовидный отек желтого пятна (CME), увеитный отек желтого пятна (UME), цитомегаловирусный (ЦМВ) ретинит, эндофтальмит, воспаление, глаукому, дегенерацию желтого пятна, склерит,

хориоретинит и увеит.

Согласно различным вариантам реализации настоящее изобретение можно применять для доставки иРНК, кодирующей белок, дефицит которого имеется при любом из глазных заболеваний, расстройств или состояний, описанных в настоящем документе.

Предпочтительно фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, наночастицы или композицию, содержащую наночастицы, можно вводить с помощью парентеральной инъекции, более предпочтительно с помощью подкожного, внутривенного, внутримышечного, внутрисуставного, внутрисиновиального, внутристернального, внутритекального, внутripеченочного, внутриочагового, внутричерепного, трансдермального, внутрикожного, внутрилегочного, внутрибрюшинного, внутрисердечного, внутриартериального, внутривитреального, субретинального, внутрикамерного, субконъюнктивального, субтенонового, ретробульбарного, местного и/или постериорно окологсклерального путей введения, введения в ресничную мышцу и с помощью методик подъязычной инъекции или инфузии. Особенно предпочтительной является внутрикожная и внутримышечная инъекция.

Стерильные инъекционные формы фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению могут представлять собой водную или масляную суспензию. Такие суспензии могут быть изготовлены в соответствии с методиками, известными в данной области техники, с использованием подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов.

Фармацевтическую композицию, наночастицы или композицию, содержащую наночастицы, определенные в настоящем документе, согласно настоящему изобретению также можно вводить пероральным путем в любой лекарственной форме, приемлемой для перорального введения, включая, но не ограничиваясь ими, капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы.

Фармацевтическую композицию, наночастицы или композицию, содержащую наночастицы, согласно настоящему изобретению также можно вводить местным путем, в частности, если мишень лечения включает области или органы, легкодоступные для местного применения, например, включая заболевания кожи или любой другой доступной эпителиальной ткани. Составы, подходящие для местного применения, могут быть легко изготовлены для каждой из таких областей или органов. Для местного применения фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть изготовлена в виде подходящей мази, содержащей нуклеиновую кислоту, определенную в настоящем документе, суспендированную или растворенную в одном или более носителях.

Фармацевтическая композиция, наночастицы или композиция, содержащая наночастицы, согласно настоящему изобретению обычно содержат «безопасное и эффективное количество» компонентов фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, в частности, последовательность (последовательности)

нуклеиновой(ых) кислоты (кислот), определенную(ые) в настоящем документе. В настоящем документе термин «безопасное и эффективное количество» означает количество последовательности(ей) нуклеиновой(ых) кислоты (кислот), определенной (ых) в настоящем документе, как таковое, которое является достаточным для

5 существенной индукции положительной модификации заболевания или расстройства, определенного в настоящем документе. В то же время, однако, «безопасное и эффективное количество» достаточно мало, так, чтобы избежать серьезных побочных эффектов и обеспечить целесообразное соотношение польза/риск. Определение этих пределов обычно находится в рамках рационального медицинского суждения.

10 Соответственно, вакцина в соответствии с настоящим изобретением основана на тех же компонентах, как и (фармацевтическая) композиция, описанная в настоящем документе. В связи с этим можно сослаться на описание (фармацевтической) композиции, предусмотренной в настоящем документе. Предпочтительно вакцина в соответствии с настоящим изобретением содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту,

15 содержащую по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, определенную в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В вариантах реализации, в которых вакцина содержит более одной нуклеиновой кислоты, в частности, более одной последовательности иРНК (например, множество последовательностей РНК в соответствии с настоящим изобретением, причем каждая

20 из них предпочтительно кодирует отдельный антигенный пептид или белок), вакцина может быть обеспечена в физически раздельной форме и может быть введена с помощью отдельных этапов введения. Вакцина в соответствии с настоящим изобретением может соответствовать (фармацевтической) композиции, описанной в настоящем документе, в частности, в которой последовательности иРНК обеспечены с помощью одной

25 отдельной композиции. Однако вакцина согласно настоящему изобретению также может быть обеспечена в физически раздельной форме. Например, в вариантах реализации, в которых вакцина содержит более чем одну последовательность/молекулу иРНК, такие молекулы РНК могут быть обеспечены так, например, чтобы обеспечить две, три, четыре, пять или шесть отдельных композиций, каждая из которых может

30 содержать по меньшей мере одну молекулу/последовательность иРНК (например, три различные молекулы/последовательности иРНК), каждая из которых кодирует различные антигенные пептиды или белки, которые можно как комбинировать, так не комбинировать. Также вакцина согласно настоящему изобретению может представлять собой комбинацию по меньшей мере двух различных композиций, при этом каждая

35 композиция содержит по меньшей мере одну иРНК, кодирующую по меньшей мере один из антигенных пептидов или белков, определенных в настоящем документе. Согласно другому варианту вакцина может быть обеспечена в виде комбинации по меньшей мере одной иРНК, предпочтительно по меньшей мере двух, трех, четырех, пяти, шести или более иРНК, каждая из которых кодирует один из антигенных пептидов

40 или белков, определенных в настоящем документе. Вакцину можно комбинировать, чтобы обеспечить одну отдельную композицию перед ее применением, или ее можно применять так, что для введения различных последовательностей/молекул иРНК, кодирующих любой из антигенных пептидов или белков, определенных в настоящем документе, требуется более одного введения. Если вакцина содержит по меньшей мере

45 одну последовательность иРНК, обычно по меньшей мере две последовательности иРНК, кодирующие комбинации антигенов, определенные в настоящем документе, она может быть введена, например, с помощью однократного введения (путем комбинирования всех молекул/последовательностей иРНК), по меньшей мере двух

отдельных введений. Соответственно, любую комбинацию моно-, би- или мультицистронных иРНК, кодирующих по меньшей мере один антигенный пептид или белок, или любую комбинацию антигенов, определенных в настоящем документе (и необязательно дополнительные антигены), которые обеспечены в виде отдельных соединений (содержащих одну молекулу иРНК) или в виде комбинированного соединения (содержащего более одной молекулы иРНК), следует понимать как вакцину согласно настоящему изобретению.

Как и в случае (фармацевтической) композиции согласно настоящему изобретению соединения вакцины могут быть обеспечены в жидкой и/или сухой (например, лиофилизированной) форме. Они могут содержать дополнительные компоненты, в частности, дополнительные компоненты, обеспечивающие ее фармацевтическое применение. Вакцина или (фармацевтическая) композиция может, например, дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель и/или дополнительные вспомогательные вещества и добавки.

Вакцина или (фармацевтическая) композиция обычно содержит безопасное и эффективное количество нуклеиновой кислоты, в частности, иРНК согласно настоящему изобретению, определенной в настоящем документе, кодирующей антигенный пептид или белок, определенный в настоящем документе, или его фрагмент или вариант, или комбинацию антигенов, предпочтительно, определенную в настоящем документе. В настоящем документе термин «безопасное и эффективное количество» означает количество иРНК, которое является достаточным для существенной индукции положительной модификации рака или заболевания, или расстройства, связанного с раком. В то же время, однако, «безопасное и эффективное количество» является достаточно низким, так, чтобы избежать серьезных побочных эффектов, т.е. чтобы обеспечить целесообразное соотношение польза/риск. Определение этих пределов обычно находится в рамках рационального медицинского суждения. В отношении вакцины или (фармацевтической) композиции согласно настоящему изобретению выражение «безопасное и эффективное количество» предпочтительно означает количество иРНК (и, соответственно, кодируемого антигена), которое подходит для стимуляции адаптивного ответа иммунной системы таким способом, что не развиваются чрезмерные или повреждающие иммунные реакции, а также предпочтительно отсутствуют такие иммунные реакции ниже измеримого уровня. Такое «безопасное и эффективное количество» иРНК (фармацевтической) композиции или вакцины, определенной в настоящем документе, также может быть выбрано в зависимости от типа иРНК, например, моноцистронной, би- или даже мультицистронной иРНК, поскольку би- или даже мультицистронная иРНК может приводить к значительно более высокой экспрессии кодируемого антигена (ов), чем экспрессия при применении равного количества моноцистронной иРНК. «Безопасное и эффективное количество» иРНК (фармацевтической) композиции или вакцины, определенное выше, также будет варьироваться в зависимости от конкретного состояния, подлежащего лечению, а также от возраста и физического состояния пациента, подлежащего лечению, тяжести состояния, продолжительности лечения, характера сопутствующей терапии, конкретного применяемого фармацевтически приемлемого носителя и сходных факторов в пределах знаний и опыта лечащего врача. Вакцину или композицию согласно настоящему изобретению можно применять в соответствии с настоящим изобретением у человека, а также для ветеринарных медицинских целей в качестве фармацевтической композиции или в качестве вакцины.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения

нуклеиновая кислота, в частности, иРНК (фармацевтической) композиции, вакцины или набора частей в соответствии с настоящим изобретением, обеспечена в лиофилизированной форме. Предпочтительно лиофилизированную иРНК перед введением восстанавливают в подходящем буфере, преимущественно на основе водного носителя, например, в растворе Рингера с лактатом, который является предпочтительным, растворе Рингера, фосфатном буфере. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения (фармацевтическая) композиция, вакцина или набор частей в соответствии с настоящим изобретением содержит по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять, шесть или более иРНК, предпочтительно иРНК, которые 5 обеспечиваются по отдельности в лиофилизированной форме (необязательно совместно с по меньшей мере одной дополнительной добавкой) и которые предпочтительно восстанавливают по отдельности в подходящем буфере (таком как раствор Рингера с лактатом) перед их применением, чтобы обеспечить индивидуальное введение каждой из (монокистронных) иРНК.

Вакцина или (фармацевтическая) композиция в соответствии с настоящим изобретением обычно может содержать фармацевтически приемлемый носитель. В настоящем документе выражение «фармацевтически приемлемый носитель» предпочтительно включает жидкую или нежидкую основу вакцины согласно настоящему изобретению. Если вакцина согласно настоящему изобретению обеспечена в жидкой 20 форме, то носителем будет вода, обычно апиrogenная вода; изотонические солевые или забуференные (водные) растворы, например, забуференные фосфатом, цитратом и т.д. растворы. В частности, для инъекции вакцины согласно настоящему изобретению можно применять воду или предпочтительно буфер, более предпочтительно водный буфер, содержащий натриевую соль, предпочтительно по меньшей мере 50 мМ натриевой соли, кальциевую соль, предпочтительно по меньшей мере 0,01 мМ кальциевой соли, и необязательно калиевую соль, предпочтительно по меньшей мере 3 мМ калиевой соли. В соответствии с предпочтительным вариантом реализации настоящего изобретения соли натрия, кальция и необязательно соли калия могут присутствовать в форме их галогенидов, например, хлоридов, йодидов или бромидов, в форме их 30 гидроксидов, карбонатов, гидрокарбонатов или сульфатов и т.д. Примеры солей натрия включают, но не ограничиваются этим, например, NaCl, NaI, NaBr, Na₂CO₃, NaHCO₃, Na₂SO₄, примеры необязательных солей калия включают, например, KCl, KI, KBr, K₂CO₃, KHCO₃, K₂SO₄, и примеры солей кальция включают, например, CaCl₂, CaI₂, CaBr₂, CaCO₃, CaSO₄, Ca(OH)₂. Помимо этого буфер может содержать органические анионы вышеуказанных катионов. В соответствии с более предпочтительным вариантом реализации буфер, подходящий для инъекции, определенный выше, может содержать соли, выбранные из хлорида натрия (NaCl), хлорида кальция (CaCl₂) и необязательно хлорида калия (KCl), при этом помимо хлоридов могут присутствовать дополнительные 35 анионы. CaCl₂ также может быть заменен другой солью, такой как KCl. Как правило, соли в буфере для инъекций присутствуют в концентрации, составляющей по меньшей мере 50 мМ хлорида натрия (NaCl), по меньшей мере 3 мМ хлорида калия (KCl) и по меньшей мере 0,01 мМ хлорида кальция (CaCl₂). Буфер для инъекции может быть 40 гипертоническим, изотоническим или гипотоническим по отношению к конкретной эталонной среде, т.е. буфер может иметь более высокое, идентичное или более низкое содержание соли по отношению к конкретной эталонной среде, при этом предпочтительно можно применять такие концентрации вышеуказанных солей, которые не приводят к повреждению клеток из-за осмоса или других эффектов концентрации.

Эталонные среды представляют собой, например, в способах «в условиях *in vivo*», такие жидкости как кровь, лимфа, цитозольные жидкости или другие жидкости организма, или, например, жидкости, которые можно применять в качестве эталонных сред в способах «в условиях *in vitro*», такие как распространенные буферы или жидкости.

5 Такие распространенные буферы или жидкости известны специалисту в данной области техники. Раствор Рингера с лактатом является особенно предпочтительным в качестве жидкой основы.

Однако также можно применять один или более совместимых твердых или жидких наполнителей или разбавителей, а также инкапсулирующих соединений, которые
10 подходят для введения человеку. В настоящем документе термин «совместимый» означает, что компоненты вакцины согласно настоящему изобретению способны смешиваться с нуклеиновой кислотой, в частности, с иРНК согласно настоящему изобретению, как определено в настоящем документе, так, что не происходит взаимодействие, которое может существенно уменьшить фармацевтическую
15 эффективность вакцины согласно настоящему изобретению в обычных условиях применения. Понятно, что фармацевтически приемлемые носители, наполнители и разбавители, должны иметь достаточно высокую чистоту и достаточно низкую токсичность, чтобы обеспечить их пригодность для введения человеку, которого лечат. Некоторые примеры соединений, которые можно применять в качестве фармацевтически
20 приемлемых носителей, наполнителей или их компонентов, включают сахара, такие как, например, лактоза, глюкоза, трегалоза и сахароза; крахмалы, такие как, например, кукурузный крахмал или картофельный крахмал; декстрозу; целлюлозу и ее производные, такие как, например, карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза, ацетат целлюлозы; порошкообразный трагакант; солод; желатин; жир; твердые
25 вещества, обеспечивающее скольжение, такие как, например, стеариновая кислота, стеарат магния; сульфат кальция; растительные масла, такие как, например, арахисовое масло, хлопковое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и масло какао-бобов; полиолы, такие как, например, полипропиленгликоль, глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; альгиновую кислоту.

30 Выбор фармацевтически приемлемого носителя в принципе определяется способом введения фармацевтической композиции или вакцины согласно настоящему изобретению. Композицию или вакцину можно вводить, например, системно или местно. Пути системного введения обычно включают, например, трансдермальный, пероральный и парентеральный пути, включая подкожные, внутривенные, внутримышечные,
35 внутриартериальные, внутрикожные и внутрибрюшинные инъекции, внутриглазной, внутривитреальный, субретинальный, внутрикамерный, субконъюнктивальный, субтеноновый, ретробульбарный, местный и/или постериорно окологлобальный пути введения, введение в ресничную мышцу и/или внутриназальный путь введения. Пути местного введения обычно включают, например, способы местного введения, а также
40 внутрикожные, чрескожные, подкожные или внутримышечные инъекции или внутриочаговые, внутричерепные, внутрилегочные, внутрисердечные и подязычные инъекции. Более предпочтительно композицию или вакцину согласно настоящему изобретению можно вводить внутрикожным, подкожным или внутримышечным путем, предпочтительно с помощью инъекции, которая может представлять собой безыгольную
45 и/или игольную инъекцию. Соответственно, композиции/вакцины предпочтительно изготавливают в жидкой или твердой форме. Количество вакцины или композиции согласно настоящему изобретению, подходящее для введения, может быть определено с помощью обычных экспериментов, например, с использованием моделей на животных.

Такие модели включают, но не ограничиваются ими, модель на кролике, овце, мыши, крысе, собаке и приматах, отличных от человека. Предпочтительные стандартные дозированные формы для инъекций включают стерильные водные растворы, физиологический солевой раствор или их смеси. рН таких растворов должен быть
 5 доведен до 7,4. Подходящие носители для инъекций включают гидрогели, устройства для контролируемого или замедленного высвобождения, матриксы из полимолочной кислоты и коллагена. Подходящие фармацевтически приемлемые носители для местного применения включают те, которые подходят для применения в лосьонах, кремах, гелях и т.п. Если композиция или вакцина согласно настоящему изобретению должна быть
 10 введена перорально, то предпочтительными стандартными дозированными формами являются таблетки, капсулы и т.п. Фармацевтически приемлемые носители для приготовления стандартных дозированных форм, которые можно применять для перорального введения, хорошо известны в предшествующем уровне техники. Их выбор будет зависеть от дополнительных факторов, таких как вкус, затраты и возможность
 15 хранения, которые не являются существенными для целей настоящего изобретения, и может быть легко сделан специалистом в данной области техники.

Согласно настоящему изобретению вакцина или композиция может дополнительно содержать одно или более вспомогательных веществ для того чтобы дополнительно повысить иммуногенность. С помощью этого предпочтительно достигается
 20 синергетическое действие нуклеиновой кислоты, содержащейся в композиции согласно настоящему изобретению, и вспомогательного вещества, которое может быть необязательно совместно изготовлено (или изготовлено по отдельности) с вакциной или композицией согласно настоящему изобретению, как описано выше. В зависимости от различных типов вспомогательных веществ синергическое действие может быть
 25 обусловлено различными механизмами.

Дополнительные добавки, которые могут быть включены в вакцину или композицию согласно настоящему изобретению, включают эмульгаторы, такие как, например, твин; смачивающие агенты, такие как, например, лаурилсульфат натрия; красители; средства, придающие вкус, фармацевтические носители; таблеткообразующие агенты;
 30 стабилизаторы; антиоксиданты; консерванты.

Вакцина или композиция согласно настоящему изобретению также может дополнительно содержать любое дополнительное соединение, которое, как известно, обладает иммуностимулирующей активностью благодаря своей аффинности связывания (в виде лигандов) с Toll-подобными рецепторами человека TLR1, TLR2, TLR3, TLR4,
 35 TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, или благодаря своей аффинности связывания (в качестве лигандов) с Toll-подобными рецепторами мыши TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 или TLR13.

Другим классом соединений, которые могут быть добавлены к вакцине или композиции согласно настоящему изобретению в данном случае, могут быть CpG-содержащие нуклеиновые кислоты, в частности, CpG-РНК или CpG-ДНК. CpG-РНК или CpG-ДНК может быть одноцепочечной CpG-ДНК (оц CpG-ДНК), двухцепочечной CpG-ДНК (дц CpG-ДНК), одноцепочечной CpG-РНК (оц CpG-РНК) или двухцепочечной CpG-РНК (дц CpG-РНК). CpG-содержащая нуклеиновая кислота предпочтительно
 40 обеспечена в форме CpG-РНК, более предпочтительно в форме одноцепочечной CpG-РНК (оц CpG-РНК). CpG-содержащая нуклеиновая кислота предпочтительно содержит по меньшей мере одну или более (митогенных) последовательностей динуклеотида цитозин/гуанин (мотив (ы) CpG). Согласно первому предпочтительному варианту по меньшей мере один мотив CpG, содержащийся в этих последовательностях, т.е. С

(цитозин) и G (гуанин) мотива CpG, является не метилированным. Все другие цитозины или гуанины, необязательно содержащиеся в этих последовательностях, могут быть метилированными или неметилированными. Однако в соответствии с другим предпочтительным вариантом C (цитозин) и G (гуанин) мотива CpG также могут присутствовать в метилированной форме.

В настоящем документе термин «композиция согласно настоящему изобретению» может относиться к композиции согласно настоящему изобретению, содержащей по меньшей мере одну искусственную нуклеиновую кислоту. Аналогичным образом, термин «вакцина согласно настоящему изобретению», используемый в данном контексте, может относиться к вакцине согласно настоящему изобретению, которая основана на искусственной нуклеиновой кислоте, т.е. содержит по меньшей мере одну искусственную нуклеиновую кислоту, или которая содержит композицию согласно настоящему изобретению, содержащую указанную искусственную нуклеиновую кислоту.

Композиция может быть разработана в виде готовой к применению композиции для инъекции. Например, она может быть изготовлена в виде стерильной жидкости, подходящей для инъекции. В этом случае она может быть обеспечена в виде стерильного водного раствора или стерильной водной суспензии наночастиц, предпочтительно с рН в пределах диапазона от приблизительно 4 до приблизительно 9 или более предпочтительно от приблизительно 4,5 до приблизительно 8,5. Осмоляльность такой жидкой композиции предпочтительно составляет от приблизительно 150 до приблизительно 500 мОсмоль/кг и более предпочтительно от приблизительно 200 до приблизительно 400 мОсмоль/кг. Если композиция должна быть введена внутривенно, то показатель рН также может находиться в пределах диапазона от приблизительно 4,5 до приблизительно 8 или от приблизительно 5 до приблизительно 7,5; и осмоляльность в этом случае предпочтительно может быть выбрана в пределах диапазона от приблизительно 220 до приблизительно 350 мОсмоль/кг или от приблизительно 250 до приблизительно 330 мОсмоль/кг, соответственно.

Согласно другому варианту композиция может быть изготовлена в виде концентрированной формы, которая требует разбавления или даже восстановления перед применением. Например, она может быть в форме жидкого концентрата, который может представлять собой водный и/или органический жидкий состав, который требует разбавления водным растворителем или разбавителем. Если жидкий концентрат содержит органический растворитель, такой растворитель предпочтительно выбран из смешивающихся с водой органических растворителей с относительно низкой токсичностью, таких как этанол или пропиленгликоль.

Согласно одному из предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения композиция согласно настоящему изобретению обеспечена в виде сухого состава для восстановления жидким носителем, например, для получения жидкого состава, подходящего для инъекции. В частности, сухой состав может представлять собой стерильный порошок или лиофилизированную форму для восстановления водным жидким носителем.

Для оптимизации функциональности, стабильности или переносимости композиции она может необязательно содержать фармацевтические вспомогательные вещества, если это необходимо или полезно. Потенциально подходящие вспомогательные вещества включают кислоты, основания, осмотические агенты, антиоксиданты, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества, синергически действующие агенты, красители, загустители, наполнители и, если требуется, консерванты.

Настоящее изобретение также относится к набору, в частности, к набору частей,

содержащему компоненты композиции согласно настоящему изобретению, определенные в настоящем документе. Другими словами, настоящее изобретение относится к набору для получения любой такой композиции. Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может, например, присутствовать в одной или разных частях набора, причем набор содержит первый компонент набора, содержащий катионный пептид или полимер и/или липидоидное соединение, и второй компонент набора, содержащий соединение нуклеиновой кислоты.

Например, первый компонент набора может быть обеспечен в виде стерильной твердой композиции, такой как лиофилизированная форма или порошок, или в виде стерильной жидкой композиции. В дополнение к катионному пептиду или полимеру и/или липидоиду первый компонент набора может содержать один или более неактивных ингредиентов, описанных выше. Аналогичным образом, второй компонент набора может быть изготовлен, например, в виде стерильной твердой или жидкой композиции, а также содержать один или более дополнительных неактивных ингредиентов в дополнение к соединению нуклеиновой кислоты. Композицию согласно настоящему изобретению получают путем комбинирования и необязательно смешивания содержащего двух компонентов. Необязательно липидоид может быть помещен в третий компонент набора, а не в первый компонент набора вместе с катионным пептидом или полимером.

Согласно другому варианту, но также в пределах объема настоящего изобретения, предложен набор, который содержит первый компонент набора, содержащий по меньшей мере один катионный пептид или полимер, по меньшей мере один липидоид и по меньшей мере одно соединение нуклеиновой кислоты или по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, или вакцину, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, изготовленный, например, в виде стерильного твердого или жидкого состава, причем указанный первый компонент набора необязательно содержит по меньшей мере один другой компонент, определенный в настоящем документе, например, фармацевтический носитель или наполнитель; и второй компонент набора, содержащий жидкий носитель для растворения или диспергирования содержащего первого компонента набора, например, для получения композиции согласно настоящему изобретению, описанной выше. Аналогично вышеуказанному, компоненты набора предпочтительно обеспечены в стерильной форме, будь то твердой или жидкой, и каждый из них может содержать одно или более дополнительных вспомогательных веществ или неактивный ингредиент.

В том случае, если набор или набор частей содержит множество последовательностей нуклеиновых кислот, один компонент набора может содержать только одну, несколько или все последовательности нуклеиновых кислот, содержащиеся в наборе. Согласно другому варианту реализации каждая/любая последовательность нуклеиновой кислоты может содержаться в другом/отдельном компоненте набора так, что каждый компонент образует часть набора. Помимо этого, более чем одна нуклеиновая кислота может содержаться в первом компоненте как части набора, тогда как один или более других (второй, третий и т.д.) компонентов (обеспечивающих одну или более других частей набора) могут содержать либо одну, либо более одной нуклеиновой кислоты, которые могут быть идентичны или частично идентичны или отличаться от нуклеиновой кислоты первого компонента.

Необязательно любой из компонентов набора, описанных выше, изготовлен в форме концентратов, будь то в твердой или жидкой форме, и может быть предназначен для разбавления биосовместимым или физиологически переносимым жидким носителем,

который необязательно может не быть частью набора, таким как стерильный солевой раствор, стерильный буфер или другие растворы, которые часто используют в качестве жидких разбавителей для инъекционных лекарственных препаратов.

5 Применительно к композициям для инъекций выражение «жидкий носитель» обычно означает хорошо переносимую водную жидкую композицию для инъекций, имеющую физиологически приемлемый состав, pH и осмотическое давление.

Помимо этого, набор или набор частей может содержать технические инструкции с информацией о введении и дозировке последовательности нуклеиновой кислоты, фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению или любого из его
10 компонентов или частей, например, если набор получают в виде набора частей.

Наночастицы, набор и композицию, описанные выше, можно применять для доставки транспортируемой нуклеиновой кислоты в живые клетки, например, для трансфекции клеток нуклеиновой кислотой. Это можно использовать в целях научных исследований, диагностического применения или терапии. Согласно одному из предпочтительных
15 вариантов реализации настоящего изобретения наночастицу (ы) или композицию применяют в качестве лекарственного средства.

В настоящем документе термин «лекарственное средство» означает любое соединение, материал, композицию или состав, которые можно применять для профилактики, предотвращения, лечения, исцеления, паллиативного лечения, облегчения, контроля,
20 улучшения, задержки, стабилизации или предотвращения или задержки рецидива или распространения заболевания или состояния, включая предотвращение, лечение или облегчение любого симптома заболевания или состояния.

Для применения в качестве диагностического средства или лекарственного средства в условиях *in vivo* композиция согласно настоящему изобретению может быть обеспечена
25 в жидкой форме, в которой каждый компонент может быть независимо включен в растворенной или диспергированной (например, суспензированной или эмульгированной) форме. Например, композиция может быть в форме стерильного водного раствора, который подходит для введения субъекту путем инъекции. Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения композиция
30 изготовлена в виде стерильной твердой композиции, такой как стерильный порошок или лиофилизированная форма для восстановления водным жидким носителем.

Согласно дополнительному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения наночастицу (ы) и/или композицию, описанные в настоящем документе, применяют для профилактики, лечения и/или облегчения заболевания, связанного с
35 дефицитом пептида или белка. Соответственно, настоящее изобретение также относится к применению наночастицы (наночастиц) и/или композиции для изготовления лекарственного средства для профилактики, лечения и/или облегчения заболевания, связанного с дефицитом пептида или белка. Помимо этого, изобретение относится к способу лечения субъекта, подверженного риску или пораженного заболеванием или
40 состоянием, связанным с дефицитом пептида или белка, причем указанный способ включает введение наночастицы (наночастиц) и/или композиции указанному субъекту.

Настоящее изобретение также относится к нескольким сферам применения и вариантам применения искусственной нуклеиновой кислоты, композиции согласно настоящему изобретению, содержащей по меньшей мере одну искусственную
45 нуклеиновую кислоту, полипептидов согласно настоящему изобретению, описанных в настоящем документе, композиции согласно настоящему изобретению, содержащей по меньшей мере один полипептид согласно настоящему изобретению, или вакцины согласно настоящему изобретению или наборов, содержащих их. В частности, согласно

настоящему изобретению (фармацевтическую) композицию (и) или вакцину согласно настоящему изобретению может применять у человека, а также для ветеринарных медицинских целей, предпочтительно для медицинских целей у человека, в качестве фармацевтической композиции в целом или в качестве вакцины.

5 Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к искусственной нуклеиновой кислоте, композиции согласно настоящему изобретению, содержащей по меньшей мере одну искусственную нуклеиновую кислоту, полипептидам согласно настоящему изобретению, описанным в настоящем документе, композиции согласно настоящему изобретению, содержащей по меньшей мере один полипептид согласно
10 настоящему изобретению, вакцине согласно настоящему изобретению или набору или набору частей согласно настоящему изобретению для применения в способе профилактики (профилактики до воздействия или профилактики после воздействия) и/или терапевтического лечения, например, вирусных инфекций. Следовательно, согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к первому варианту медицинского
15 применения искусственной нуклеиновой кислоты, композиции согласно настоящему изобретению, содержащей по меньшей мере одну искусственную нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе, полипептидов согласно настоящему изобретению, описанных в настоящем документе, композиции согласно настоящему изобретению, содержащей по меньшей мере один полипептид согласно настоящему изобретению,
20 вакцины согласно настоящему изобретению или набора или набора частей согласно настоящему изобретению, определенных в настоящем документе, в качестве лекарственного средства. В частности, настоящее изобретение относится к применению искусственной нуклеиновой кислоты, содержащей по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один полипептид, содержащий по меньшей
25 мере один, например, вирусный белок или пептид, определенный в настоящем документе, или его фрагмент или вариант, описанный в настоящем документе, для получения лекарственного средства.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится ко второму варианту медицинского применения искусственной нуклеиновой кислоты, описанной
30 в настоящем документе, композиции согласно настоящему изобретению, содержащей по меньшей мере одну искусственную нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе, полипептидов согласно настоящему изобретению, описанных в настоящем документе, композиции согласно настоящему изобретению, содержащей по меньшей мере один полипептид согласно настоящему изобретению, вакцины согласно настоящему
35 изобретению или набора или набора частей согласно настоящему изобретению для лечения инфекции, например, вирусной, или заболевания или расстройств, связанных с инфекцией.

Композицию согласно настоящему изобретению или вакцину согласно настоящему изобретению, в частности, композицию согласно настоящему изобретению, содержащую
40 по меньшей мере одну искусственную нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе, полипептиды согласно настоящему изобретению, описанные в настоящем документе, или композицию согласно настоящему изобретению, содержащую по меньшей мере один полипептид согласно настоящему изобретению, можно вводить, например, системно или местно. Пути системного введения обычно включают, например,
45 трансдермальный, пероральный, парентеральный путь, включая подкожные, внутривенные, внутримышечные, внутриартериальные, внутрикожные и внутрибрюшинные инъекции, внутрикамерный, субконъюнктивальный, субтеноновый, ретробульбарный, местный и/или постериорно окологсклеральный пути введения,

введение в ресничную мышцу и/или внутриназальный путь введения. Пути местного введения обычно включают, например, пути местного введения, а также внутрикожные, чрескожные, подкожные или внутримышечные инъекции или внутриочаговые, внутричерепные, внутрилегочные, внутрисердечные и подъязычные инъекции. Более

предпочтительно вакцины можно вводить внутрикожным, подкожным или внутримышечным путем. Соответственно, вакцины согласно настоящему изобретению предпочтительно изготавливают в жидкой (или иногда в твердой) форме. Предпочтительно вакцину согласно настоящему изобретению можно вводить с помощью обычной игольной инъекции или безыгольной струйной инъекции. Согласно

предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вакцину или композицию согласно настоящему изобретению можно вводить с помощью струйной инъекции, как определено в настоящем документе, предпочтительно внутримышечно или внутрикожно, более предпочтительно внутрикожно.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения однократная доза искусственной нуклеиновой кислоты, композиции или вакцины содержит определенное количество искусственной нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем документе. Предпочтительно искусственная нуклеиновая кислота обеспечена в количестве, составляющем по меньшей мере 40 мкг на дозу, предпочтительно в количестве от 40 до 700 мкг на дозу, более предпочтительно в количестве от 80 до 400 мкг на дозу. Более конкретно, в случае внутрикожной инъекции, которую предпочтительно осуществляют с использованием обычной иглы, количество искусственной нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, содержащееся в однократной дозе, обычно составляет по меньшей мере 200 мкг, предпочтительно от 200 мкг до 1000 мкг, более предпочтительно от 300 мкг до 850 мкг, еще более предпочтительно от 300 мкг до 700 мкг. В случае внутрикожной инъекции, которую предпочтительно осуществляют с помощью струйной инъекции (например, с использованием устройства Tropis), количество искусственной нуклеиновой кислоты, содержащееся в однократной дозе, обычно составляет по меньшей мере 80 мкг, предпочтительно от 80 мкг до 700 мкг, более предпочтительно от 80 до 400 мкг. Более того, в случае внутримышечной инъекции, которую предпочтительно осуществляют с использованием обычной иглы или струйной инъекции, количество искусственной нуклеиновой кислоты, содержащееся в однократной дозе, обычно составляет по меньшей мере 80 мкг, предпочтительно от 80 мкг до 1000 мкг, более предпочтительно от 80 до 850 мкг, еще более предпочтительно от 80 до 700 мкг.

Протокол иммунизации для лечения или профилактики, например, вирусной инфекции, т.е. иммунизации субъекта, например, против вируса, обычно включает серию однократных доз или дозировок композиции согласно настоящему изобретению или вакцины согласно настоящему изобретению. В настоящем документе однократная доза относится к начальной/первой дозе, второй дозе или любым другим дополнительным дозам, соответственно, которые предпочтительно вводят для «усиления» иммунной реакции.

В соответствии с предпочтительным вариантом реализации настоящего изобретения предложена искусственная нуклеиновая кислота, описанная в настоящем документе, композиция согласно настоящему изобретению, содержащая по меньшей мере одну искусственную нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе, полипептиды согласно настоящему изобретению, описанные в настоящем документе, композиция согласно настоящему изобретению, содержащая по меньшей мере один полипептид согласно настоящему изобретению, вакцина согласно настоящему изобретению или

набор или набор частей для применения при лечении или профилактике, предпочтительно лечению или профилактике, например, вирусной инфекции или связанного с ней расстройства или заболевания, при этом лечение или профилактика включает введение дополнительного активного фармацевтического ингредиента. Более предпочтительно в случае вакцины или композиции согласно настоящему изобретению, основанной на искусственной нуклеиновой кислоте согласно настоящему изобретению, полипептид можно вводить совместно в качестве дополнительного активного фармацевтического ингредиента. Например, по меньшей мере один, например, вирусный белок или пептид, описанный в настоящем документе, или его фрагмент или вариант, можно вводить совместно для индукции или усиления иммунного ответа. Аналогичным образом, в случае вакцины или композиции согласно настоящему изобретению, основанной на полипептиде согласно настоящему изобретению, описанном в настоящем документе, искусственную нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе, можно вводить совместно в качестве дополнительного активного фармацевтического ингредиента. Например, искусственную нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе, кодирующую по меньшей мере один полипептид, описанный в настоящем документе, можно вводить совместно для индукции или усиления иммунного ответа.

Дополнительным компонентом вакцины или композиции согласно настоящему изобретению может быть иммунотерапевтический агент, который может быть выбран из иммуноглобулинов, предпочтительно IgG, моноклональных или поликлональных антител, поликлональной сыворотки или сывороток и т.д., наиболее предпочтительно иммуноглобулинов, направленных против, например, вируса. Предпочтительно такой дополнительный иммунотерапевтический агент может быть обеспечен в виде пептида/белка или может кодироваться нуклеиновой кислотой, предпочтительно ДНК или РНК, более предпочтительно иРНК. Такой иммунотерапевтический агент позволяет обеспечивать пассивную вакцинацию в дополнение к активной вакцинации, запускаемой искусственной нуклеиновой кислотой согласно настоящему изобретению или полипептидом согласно настоящему изобретению.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения или предотвращения расстройства, причем расстройство предпочтительно представляет собой инфекцию, например, вирусом, или расстройство, связанное с инфекцией, например, вирусом, при этом указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, искусственной нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе, композиции согласно настоящему изобретению, содержащей по меньшей мере одну искусственную нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе, полипептидов согласно настоящему изобретению, описанных в настоящем документе, композиции согласно настоящему изобретению, содержащей по меньшей мере один полипептид согласно настоящему изобретению, вакцины согласно настоящему изобретению или набора или набора частей согласно настоящему изобретению,

В частности, такой способ может предпочтительно включать следующие этапы:

а) обеспечение искусственной нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе, композиции согласно настоящему изобретению, содержащей по меньшей мере одну искусственную нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе, полипептидов согласно настоящему изобретению, описанных в настоящем документе, композиции согласно настоящему изобретению, содержащей по меньшей мере один полипептид согласно настоящему изобретению, вакцины согласно настоящему изобретению или набора или набора частей согласно настоящему изобретению;

б) применение или введение искусственной нуклеиновой кислоты, описанной в

настоящем документе, композиции согласно настоящему изобретению, содержащей по меньшей мере одну искусственную нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе, полипептидов согласно настоящему изобретению, описанных в настоящем документе, композиции согласно настоящему изобретению, содержащей по меньшей мере один полипептид согласно настоящему изобретению, вакцины согласно настоящему изобретению или набора или набор частей согласно настоящему изобретению в ткань или организм;

с) необязательно введение иммуноглобулина (IgG) против, например, вируса.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящее изобретение также относится к способу экспрессии по меньшей мере одного полипептида, содержащего, например, по меньшей мере один вирусный полипептид, или его фрагмента или варианта, причем указанный способ предпочтительно включает следующие этапы:

а) обеспечение искусственной нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, содержащей по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один полипептид, содержащий, например, по меньшей мере один вирусный полипептид, или его фрагмент или вариант, предпочтительно, как определено в настоящем документе, или композиции, содержащей указанную искусственную нуклеиновую кислоту; и

б) применение или введение искусственной нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению или композиции согласно настоящему изобретению, содержащей указанную искусственную нуклеиновую кислоту, в систему экспрессии, например, в бесклеточную систему экспрессии, клетку (например, экспрессирующую клетку-хозяина или соматическую клетку), ткань или организм.

Способ можно применять для лабораторных исследований, для научных исследований, для диагностики, для коммерческого получения пептидов или белков и/или для терапевтических целей. В данном случае обычно после получения искусственной нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, определенной в настоящем документе, или композиции или вакцины согласно настоящему изобретению, определенной в настоящем документе, как правило, их применяют или вводят в бесклеточную систему экспрессии, клетку (например, экспрессирующую клетку-хозяина или соматическую клетку), ткань или организм, например, в оголенной форме или в составе комплекса или в виде (фармацевтической) композиции или вакцины, описанной в настоящем документе, предпочтительно путем трансфекции или с использованием любого из способов введения, описанных в настоящем документе. Способ можно осуществлять в условиях *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*. Помимо этого способ можно осуществлять применительно к лечению конкретного заболевания, в частности, при лечении инфекционных заболеваний или связанных с ними расстройств.

В данном случае «в условиях *in vitro*» определяется в настоящем документе как трансфекция или трансдукция искусственной нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, определенной в настоящем документе, или композиции или вакцины согласно настоящему изобретению, определенной в настоящем документе, в клетки в культуре вне организма; «в условиях *in vivo*» определяется в настоящем документе как трансфекция или трансдукция искусственной нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению или композиции или вакцины согласно настоящему изобретению в клетки путем применения иРНК согласно настоящему изобретению или композиции согласно настоящему изобретению ко всему организму или индивидууму, и «в условиях *ex vivo*» определяется в настоящем документе как трансфекция или трансдукция искусственной нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению или композиции или вакцины

согласно настоящему изобретению в клетки вне организма или индивидуума и последующее внесение трансфицированных клеток в организм или индивидуума.

Аналогичным образом, в соответствии с другим аспектом настоящее изобретение также относится к применению искусственной нуклеиновой кислоты согласно
5 настоящему изобретению, определенной в настоящем документе, или композиции или вакцины согласно настоящему изобретению, определенной в настоящем документе, предпочтительно для диагностических или терапевтических целей, для экспрессии, например, кодируемого вирусного антигенного пептида или белка, например, путем применения или введения искусственной нуклеиновой кислоты согласно настоящему
10 изобретению, определенной в настоящем документе, или композиции или вакцины согласно настоящему изобретению, определенной в настоящем документе, например, в бесклеточную систему экспрессии, клетку (например, экспрессирующую клетку-хозяина или соматическую клетку), ткань или организм. Применение может быть подходящим для (диагностических) лабораторных исследований, для научных
15 исследований, для диагностики, для коммерческого получения пептидов или белков и/или для терапевтических целей. В данном случае обычно после получения искусственной нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, определенной в настоящем документе, или композиции или вакцины согласно настоящему изобретению, определенной в настоящем документе, обычно ее применяют или вводят в бесклеточную
20 систему экспрессии, клетку (например, экспрессирующую клетку-хозяина или соматическую клетку), ткань или организм, предпочтительно в оголенной форме или в составе комплекса, или в виде (фармацевтической) композиции или вакцины, описанной в настоящем документе, предпочтительно путем трансфекции или с использованием любого из способов введения, описанных в настоящем документе. Применение можно
25 осуществлять в условиях *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*. Помимо этого, применение можно осуществлять в отношении лечения конкретного заболевания, в частности, при лечении, например, вирусной инфекции или связанного с ней расстройства.

Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящее изобретение относится к искусственной нуклеиновой кислоте, композиции согласно настоящему
30 изобретению или вакцине согласно настоящему изобретению для применения, как определено в настоящем документе, предпочтительно для применения в качестве лекарственного средства, для применения при лечении или профилактике, предпочтительно лечению или профилактике, например, вирусной инфекции или связанного с ней расстройства, или для применения в качестве вакцины.

Композицию или вакцину можно вводить с помощью обычной игольной инъекции или безыгольной инъекции, например, в опухолевую ткань, или рядом с ней и/или в непосредственной близости от нее. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения композицию согласно настоящему изобретению или
40 фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят с помощью струйной инъекции. Струйная инъекция относится к способу безыгольной инъекции, при котором жидкость, содержащую композицию согласно настоящему изобретению и необязательно дополнительные подходящие вспомогательные вещества, проталкивают через отверстие с получением ультратонкого потока жидкости под высоким давлением, который способен проникать в кожу млекопитающего. По существу поток жидкости
45 образует отверстие в коже, через которое поток жидкости проталкивается в ткань-мишень, например, опухолевую ткань. Соответственно, струйная инъекция может быть использована, например, для внутриопухолевого применения композиции согласно настоящему изобретению.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения композицию согласно настоящему изобретению или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно вводить перорально, парентерально, посредством ингаляционного спрея, местно, ректально, назально, буккально, вагинально или через имплантированный резервуар. В настоящем документе термин «парентеральный» включает подкожный, внутривенный, внутримышечный, внутрисуставной, внутринодальный, внутрисиновиальный, внутристернальный, внутритекальный, внутрипеченочный, внутриочаговый, внутричерепной, трансдермальный, внутрикожный, внутрилегочной, внутрибрюшинный, внутрисердечный, внутриартериальный, внутрикамерный, субконъюнктивальный, субтеноновый и/или постериорно окологсклеральный пути введения, введение в ресничную мышцу и методики подъязычной инъекции или инфузии.

Другие особенно предпочтительные пути введения включают внутрикожную и внутримышечную инъекцию.

Тем не менее, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать дополнительные компоненты для облегчения введения и поглощения компонентов фармацевтической композиции. Такие дополнительные компоненты могут представлять собой подходящий носитель или наполнитель, антибактериальные и/или противовирусные агенты.

Дополнительный компонент фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению может представлять собой иммунотерапевтический агент, который может быть выбран из иммуноглобулинов, предпочтительно IgG, моноклональных или поликлональных антител, поликлональной сыворотки или сывороток и т.д.

Предпочтительно такой дополнительный иммунотерапевтический агент может быть обеспечен в виде пептида/белка или может кодироваться нуклеиновой кислотой, предпочтительно ДНК или РНК, более предпочтительно иРНК.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению обычно содержит «безопасное и эффективное количество» компонентов фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, в частности, молекулу (ы) РНК, определенную в настоящем документе. В настоящем документе термин «безопасное и эффективное количество» означает количество молекулы (молекул) РНК, определенное в настоящем документе, как таковое, которое является достаточным для существенной индукции положительной модификации, например, опухоли или ракового заболевания. В то же время, однако, «безопасное и эффективное количество» достаточно мало, так, чтобы избежать серьезных побочных эффектов и обеспечить целесообразное соотношение польза/риск. Определение этих пределов обычно находится в рамках рационального медицинского суждения.

Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно применять у человека, а также для ветеринарных медицинских целей, предпочтительно для медицинских целей у человека в качестве фармацевтической композиции в целом.

Помимо этого, настоящее изобретение относится к нескольким сферам применения и вариантам применения последовательности нуклеиновой кислоты, определенной в настоящем документе, композиции согласно настоящему изобретению, содержащей множество последовательностей нуклеиновых кислот, определенных в настоящем документе, фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, определенную в настоящем документе, или наборов, содержащих их.

В соответствии с одним конкретным аспектом настоящее изобретение относится к

первому варианту медицинского применения последовательности нуклеиновой кислоты, определенной в настоящем документе, или композиции согласно настоящему изобретению, содержащей множество последовательностей нуклеиновых кислот, определенных в настоящем документе, в качестве лекарственного средства, в частности, в генной терапии, предпочтительно для лечения заболеваний, определенных в настоящем документе.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится ко второму варианту медицинского применения последовательности нуклеиновой кислоты, определенной в настоящем документе, или композиции согласно настоящему изобретению, содержащей множество последовательностей нуклеиновых кислот, определенных в настоящем документе, для лечения заболеваний, определенных в настоящем документе, предпочтительно к применению последовательности нуклеиновой кислоты, определенной в настоящем документе, композиции согласно настоящему изобретению, содержащей множество последовательностей нуклеиновых кислот, определенных в настоящем документе, фармацевтической композиции, содержащей их, или наборов, содержащих их, для получения лекарственного средства для профилактики, лечения и/или облегчения заболеваний, определенных в настоящем документе. Предпочтительно фармацевтическую композицию применяют или вводят пациенту, нуждающемуся в этом, для этой цели.

Предпочтительно заболевания, упомянутые в настоящем документе, предпочтительно выбраны из инфекционных заболеваний, новообразований (например, рака или опухолевых заболеваний), заболеваний крови и кроветворных органов, заболеваний эндокринной системы, заболеваний, связанных с питанием, и нарушений обмена веществ, заболеваний нервной системы, заболеваний системы кровообращения, заболеваний дыхательной системы, заболеваний пищеварительной системы, заболеваний кожи и подкожной клетчатки, заболеваний опорно-двигательного аппарата и соединительной ткани и заболеваний мочеполовой системы.

В данном случае особенно предпочтительными являются наследственные заболевания, выбранные из: синдрома делеции 1p36; синдрома делеции 18p; дефицита 21-гидроксилазы; 45, X (синдрома Тернера); 47, XX, +21 (синдрома Дауна); 47, XXX (синдрома тройной X-хромосомы); 47, XXY (синдрома Клайнфелтера); 47, XY, +21 (синдрома Дауна); синдрома 47, XYY; порфирии вследствие дефицита 5-ALA-дегидратазы (дефицита ALA-дегидратазы); порфирии вследствие дефицита дегидратазы 5-аминолевулиновой кислоты (дефицита ALA-дегидратазы); синдрома делеции 5p («синдром кошачьего крика»); синдрома 5p («синдром кошачьего крика»); А-Т (атаксии-телеангиэктазии); ААТ (дефицита альфа-1-антитрипсина); отсутствия семявыносящего протока (врожденного двустороннего отсутствия семявыносящих протоков); отсутствия семявыносящего протока (врожденного двустороннего отсутствия семявыносящих протоков); ацерулоплазминеми; АСГ2 (ахондрогенеза типа II); АСН (ахондроплазии); ахондрогенеза типа II; ахондроплазии; дефицита кислой бета-глюкозидазы (болезни Гоше 1 типа); акроцефалосиндактилии (Аперта) (синдрома Аперта); акроцефалосиндактилии типа V (синдрома Пфейффера); акроцефалии (синдрома Аперта); острой церебральной болезни Гоше (болезни Гоше 2 типа); острой перемежающейся порфирии; дефицита АСУ2 (болезни Канавана); БА (болезни Альцгеймера); краниосиностоза аделаидного типа (синдрома Мюнке); аденоматозного полипоза толстой кишки (семейного аденоматозного полипоза); аденоматозного полипоза толстой кишки (семейного аденоматозного полипоза); ADP (дефицита ALA-дегидратазы); дефицита аденилсукцинатлиазы; расстройств надпочечников (дефицита

21-гидроксилазы); адреногенитального синдрома (дефицита 21-гидроксилазы); адренолейкодистрофии; AIP (острой перемежающейся порфирии); AIS (синдрома нечувствительности к андрогенам); AKU (алкаптонурии); порфирии вследствие дефицита ALA-дегидратазы (дефицита ALA-дегидратазы); ALA-D-порфирии (дефицита ALA-дегидратазы); дефицита дегидратазы ALA; алкаптонурии (алкаптонурии); болезни Александера; алкаптонурии; алкаптонурического хроноза (алкаптонурии); дефицита альфа-1-антитрипсина; ингибитора альфа-1-протеиназы (дефицита альфа-1-антитрипсина); эмфиземы, связанной с альфа-1 (дефицита альфа-1-антитрипсина); дефицита альфа-галактозидазы А (болезни Фабри); БАС (бокового амиотрофического склероза); синдрома Альстрема; ALX (болезни Александера); болезни Альцгеймера; несовершенного амелогенеза; дефицита дегидратазы аминолевулиновой кислоты (дефицита дегидратазы ALA); дефицита аминоксилы 2 (болезни Канавана); бокового амиотрофического склероза; болезни Андерсона-Фабри (болезни Фабри); синдрома нечувствительности к андрогенам; анемии; сидеробластной наследственной анемии (Х-сцепленной сидеробластной анемии); связанной с полом гипохромной сидеробластной анемии (Х-сцепленной сидеробластной анемии); семейной селезеночной анемии (болезни Гоше); синдрома Ангельмана; диффузной ангиокератомы туловища (болезни Фабри); диффузной ангиокератомы (болезни Фабри); ангиоматоза сетчатки (болезни Гиппеля-Линдау); ANH1 (Х-сцепленной сидеробластной анемии); устойчивости к APC лейденского типа (тромбофилии, связанной с лейденской мутацией гена фактора V); синдрома Аперта; дефицита AR (синдрома нечувствительности к андрогенам); AR-CMT2 ee (болезни Шарко-Мари-Тута 2 типа); арахнодактилии (синдрома Марфана); ARNSHL (аутосомно-рецессивной несиндромальной глухоты); наследственной прогрессирующей артроофтальмопатии (синдрома Стиклера COL2A1); врожденной множественной артрохалазии (синдрома Элерса-Данлоса, типа артрохалазии); AS (синдрома Ангельмана); дефицита Asp (болезни Канавана); дефицита Aspa (болезни Канавана); дефицита аспартацилазы (болезни Канавана); атаке ии-телеангиэктазии; синдром аутизма-деменции-атаксии-утраты целенаправленных движений рук (синдрома Ретта); аутосомно-доминантного ювенильного БАС (бокового амиотрофического склероза 4 типа); аутосомно-доминантного синдрома Опитца/синдрома BBB (синдрома делеции 22q11.2); аутосомно-рецессивной формы ювенильного БАС 3 типа (бокового амиотрофического склероза 2 типа); аутосомно-рецессивной несиндромальной глухоты (аутосомно-рецессивной несиндромальной глухоты); аутосомно-рецессивной нейросенсорной тугоухости и зоба (синдрома Пендреда); AxD (болезни Александера); синдрома Айерза (первичной легочной гипертензии); GM2-ганглиозидоза В-варианта гексозаминидазы (болезни Сандхоффа); BANF (нейрофиброматоза 2 типа); синдрома сморщенных кожных покровов Бира-Стивенсона; доброкачественного пароксизмального перитонита (семейной средиземноморской лихорадки); синдрома Бенджамина; бета-талассемии; дефицита ВН4 (дефицита тетрагидробиоптерина); двустороннего акустического нейрофиброматоза (нейрофиброматоза 2 типа); дефицита биотинидазы; рака мочевого пузыря; нарушения свертываемости крови (тромбофилии, связанной с лейденской мутацией гена фактора V); синдрома Блоха-Сульцбергера (неудержания пигмента); синдрома Блума; заболевания костей; заболевания костного мозга (Х-сцепленной сидеробластной анемии); синдрома Бонневье-Ульриха (синдрома Тернера); болезни Бурневилля (туберозного склероза); факоматоза Бурневилля (туберозного склероза); заболеваний мозга (прионной болезни); рака молочной железы; синдрома Бирта-Хогга-Дубе; синдрома ломких костей (несовершенного остеогенеза); синдрома широкого большого пальца кистей и стоп (синдрома Рубинштейна-Тейби);

бронзового диабета (гемохроматоза); бронзового цирроза (гемохроматоза); X-
 сцепленной бульбоспинальной мышечной атрофии (болезни Кеннеди); синдрома
 Бюргера-Грютца (семейного дефицита липопротеинлипазы); CADASIL; хронической
 гранулематозной болезни, CGD; кампомелической дисплазии; болезни Канавана; рака;
 5 семейного синдрома рака (наследственного неполипозного колоректального рака);
 рака груди (рака молочной железы); рака мочевого пузыря (рака мочевого пузыря);
 множественного дефицита карбоксилазы с поздним началом (дефицита биотинидазы);
 кардиомиопатии (синдрома Нунана); синдрома кошачьего крика («Cri du chat»); CAVD
 10 (врожденного двустороннего отсутствия семявыносящих протоков); сердечно-лицевого
 синдрома Кейлора (синдрома делеции 22q11.2); CBAVD (врожденного двустороннего
 отсутствия семявыносящих протоков); целиакии; CEP (врожденной эритропоэтической
 порфирии); дефицита церамидтригексозидазы (болезни Фабри); семейного
 церебелоретинального ангиоматоза (болезни Гиппеля-Линдау); церебральной
 артериопатии с подкорковыми инфарктами и лейкоэнцефалопатией (CADASIL);
 15 аутосомно-доминантной церебральной артериопатии с подкорковыми инфарктами и
 лейкоэнцефалопатией (CADASIL); церебрального склероза (туберозного склероза);
 цереброатрофической гипераммонемии (синдрома Ретта); синдрома цереброзидного
 липидоза (болезни Гоше); MB (муковисцидоза); СН (врожденного гипотиреоза); болезни
 Шарко (бокового амиотрофического склероза); болезни Шарко-Мари-Тута;
 20 хондродистрофии (ахондроплазии); синдрома хондродистрофии (ахондроплазии);
 хондродистрофии с нейросенсорной глухотой (отоспондиломегаэпифизарной дисплазии);
 несовершенного хондрогенеза (ахондрогенеза типа II); синдрома самотравмирующего
 поведения, хореоатетоза и гиперурикемии (синдрома Леша-Найхана); классической
 галактоземии (галактоземии); классического синдрома Элерса-Данлоса (синдрома
 25 Элерса-Данлоса классического типа); классической фенилкетонурии (фенилкетонурии);
 расщелины губы и неба (синдрома Стиклера); синдрома клеверного листа с
 танатофорной карликовостью (танатофорной дисплазии 2 типа); CLS (синдрома
 Коффина-Лоури); СМТ (болезни Шарко-Мари-Тута); синдрома Кокейна; синдрома
 Коффина-Лоури; коллагенопатии типов II и XI; семейного неполипозного рака толстой
 30 кишки (наследственного неполипозного рака толстой кишки); семейного рака толстой
 кишки (семейного аденоматозного полипоза); колоректального рака; полного дефицита
 HPRT (синдрома Леша-Найхана); полного дефицита гипоксантин-гуанин-
 фосфорибозилтрансферазы (синдрома Леша-Найхана); компрессионной нейропатии
 (наследственной нейропатии со склонностью к параличу от сдавления нерва);
 35 врожденной гиперплазии надпочечников (дефицита 21-гидроксилазы); врожденного
 двустороннего отсутствия семявыносящих протоков (врожденного отсутствия
 семявыносящих протоков); врожденной эритропоэтической порфирии; врожденного
 порока сердца; врожденной гипомиелинизации (болезни Шарко-Мари-Тута 1 типа/
 болезни Шарко-Мари-Тута 4 типа); врожденного гипотиреоза; врожденной
 40 метгемоглобинемии (метгемоглобинемии, врожденной метгемоглобинемии);
 врожденного остеосклероза (ахондроплазии); врожденной сидеробластной анемии (X-
 сцепленной сидеробластной анемии); заболевания соединительной ткани; синдрома
 конотрункальной аномалии лица (синдрома делеции 22q11.2); анемии Кули (бета-
 талассемии); болезни накопления меди (болезни Вильсона); болезни переноса меди
 45 (синдрома Менкеса); наследственной копропорфирии (наследственной копропорфирии);
 дефицита копропорфириногеноксидазы (наследственной копропорфирии); синдрома
 Каудена; дефицита CPO (наследственной копропорфирии); дефицита CPRO
 (наследственной копропорфирии); дефицита CPX (наследственной копропорфирии);

черепно-лицевого дизартроза (синдрома Крузона); черепно-лицевого дизостоза (синдрома Крузона); кретинизма (врожденного гипотиреоза); болезни Крейтцфельда-Якоба (прионной болезни); синдрома «кошачьего крика» (болезни Крона, фибростеноза); синдрома Крузона; синдрома Крузона с черным акантозом
 5 (дермоскелетного синдрома Крузона); дермоскелетного синдрома Крузона; CS (синдрома Кокейна) (синдрома Коудена); синдрома Куршмана-Баттена-Штейнерта (миотонической дистрофии); синдрома сморщенных кожных покровов Бира-Стивенсона (синдрома сморщенных кожных покровов Бира-Стивенсона); нарушения, связанного с мутацией хромосомы; дефицита D-глицератдегидрогеназы (первичной гипероксалурии);
 10 синдрома пятнистого метафиза (спондилоэпиметафизарной дисплазии типа Страдвика); DAT - деменции при болезни Альцгеймера (болезни Альцгеймера); генетической гиперкальциурии (болезни Дента); DBMD (мышечной дистрофии, типа Дюшенна и Беккера); глухоты с зобом (синдрома Пендреда); синдрома глухоты-пигментного ретинита (синдрома Ушера); болезни, вызванной нехваткой каких-либо факторов,
 15 дефицита фенилаланингидроксилазы (фенилкетонурии); дегенеративных заболеваний нервов; синдрома де Груши 1 типа (синдрома де Груши); синдрома Дежерина-Соттаса (болезни Шарко-Мари-Тута); порфирии вследствие дефицита дельта-аминолевулинатдегидратазы (дефицита ALA-дегидратазы); деменции (CADASIL); демиелиногенной лейкодистрофии (болезни Александера); дерматоспараксического
 20 типа синдрома Элерса-Данлоса (синдрома Элерса-Данлоса дерматоспараксического типа); дерматоспараксиса (синдрома Элерса-Данлоса дерматоспараксического типа); нарушений развития; dHMN (бокового амиотрофического склероза 4 типа); DHMN-V (дистальной спинальной мышечной атрофии типа V); дефицита DHTR (синдрома нечувствительности к андрогенам); диффузного глобоидного склероза (болезни Краббе);
 25 синдрома Ди-Джорджа; дефицита рецептора дигидротестостерона (синдрома нечувствительности к андрогенам); дистальной спинальной мышечной атрофии типа V; DM1 (миотонической дистрофии 1 типа); DM2 (миотонической дистрофии 2 типа); синдрома Дауна; DSMAV (дистальной спинальной мышечной атрофии V типа); DSN (болезни Шарко-Мари-Тута 4 типа); DSS (болезни Шарко-Мари-Тута 4 типа); мышечной
 30 дистрофии Дюшенна-Беккера (мышечной дистрофии типов Дюшенна и Беккера); ахондропластической карликовости (ахондроплазии); танатофорной карликовости (танатофорной дисплазии); карликовости; синдрома карликовости-ретикулярной атрофии-глухоты (синдрома Кокейна); дисмиелиногенной лейкодистрофии (болезни Александера); миотонической дистрофии (миотонической дистрофии); синдрома
 35 пигментного ретинита-дизостоза (синдрома Ушера); семейной болезни Альцгеймера с ранним началом (EOFAD) (болезни Альцгеймера); EDS (синдрома Элерса-Данлоса); синдрома Элерса-Данлоса; болезни Экмана-Лобштейна (несовершенного остеогенеза); компрессионной нейропатии (наследственной нейропатии со склонностью к параличу от сдавления нерва); эпилонии (туберозного склероза); EPP (эритропоэтической
 40 протопорфирии); эритробластической анемии (бета-талассемии); эритропеченочной протопорфирии (эритропоэтической протопорфирии); дефицита эритроидной 5-аминолевулинатсинтетазы (X-сцепленной сидеробластной анемии); эритропоэтической порфирии (врожденной эритропоэтической порфирии); эритропоэтической протопорфирии; эритропоэтической уропорфирии (врожденной эритропоэтической
 45 порфирии); рака глаза (ретинобластомы АФ атаксии Фридрейха); болезни Фабри; лицевых повреждений и расстройств; тромбофилии, связанной с лейденской мутацией гена фактора V; FALS (бокового амиотрофического склероза); семейной акустической невromы (нейрофиброматоза типа II); семейного аденоматозного полипоза; семейной

болезни Альцгеймера (FAD) (болезни Альцгеймера); семейного бокового амиотрофического склероза (бокового амиотрофического склероза); семейной дисавтономии; семейной жировой гипертриглицеридемии (семейного дефицита липопротеинлипазы); семейного гемохроматоза (гемохроматоза); семейного дефицита ЛПЛ (семейного дефицита липопротеинлипазы); семейного неполипозного рака толстой кишки (наследственного неполипозного рака толстой кишки); семейного пароксизмального полисерозита (семейной средиземноморской лихорадки); семейной РСТ (поздней порфирии кожи); семейной нейропатии, чувствительной к сдавлению (наследственной нейропатии со склонностью к параличу от сдавления нервов); семейной первичной легочной гипертензии (FPPH) (первичной легочной гипертензии); семейного синдрома Тернера (синдрома Нунана); семейной сосудистой лейкоэнцефалопатии (CADASIL); FAP (семейного аденоматозного полипоза); FD (семейной дисавтономии); женского псевдо-Тернера синдрома (синдрома Нунана); дефицита феррохелатазы (эритропоэтической протопорфирии); ферропортиновой болезни (гемохроматоза 4 типа); лихорадки (семейной средиземноморской лихорадки); синдрома FG; FGFR3-ассоциированного коронарного синотоза (синдрома Мюнке); фибриноидной дегенерации астроцитов (болезни Александра); фиброзно-кистозной болезни поджелудочной железы (муковисцидоза); FMF (семейной средиземноморской лихорадки); болезни Фоллинга (фенилкетонурии); синдрома fra(X) (синдрома ломкой X-хромосомы); синдрома ломкой X-хромосомы; «ломкости костей» (несовершенного остеогенеза); синдрома FRAXA (синдрома ломкой X-хромосомы); FRDA (атаксии Фридрейха); атаксии Фридрейха (атаксии Фридрейха); атаксии Фридрейха; FXS (синдрома ломкой X-хромосомы); дефицита G6PD; болезни, связанной с дефицитом галактокиназы (галактоземии); болезни, связанной с дефицитом галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы (галактоземии); галактоземии; болезни, связанной с дефицитом галактозилцерамидазы (болезни Краббе); галактозилцерамидного липидоза (болезни Краббе); дефицита галактозилцереброзидазы (болезни Краббе); галактозилсфингозинлипидоза (болезни Краббе); дефицита GALT (болезни Краббе); дефицита GALT (галактоземии); болезни Гоше; Гоше-подобной болезни (псевдо-болезни Гоше); дефицита GBA (болезни Гоше 1 типа); GD (болезни Гоше); генетических расстройств мозга; генетической эмфиземы (дефицита альфа-1-антитрипсина); генетического гемохроматоза (гемохроматоза); неонатального гигантоклеточного гепатита (неонатального гемохроматоза); дефицита GLA (болезни Фабри); ретиальной глиобластомы (ретинобластомы); глиомы сетчатки (ретинобластомы); глобоидноклеточной лейкодистрофии (GCL, GLD) (болезни Краббе); глобоидноклеточной лейкоэнцефалопатии (болезни Краббе); дефицита глюкоцереброзидазы (болезни Гоше); глюкоцереброзидоза (болезни Гоше); глюкозилцереброзидного липидоза (болезни Гоше); дефицита глюкозилцерамидазы (болезни Гоше); дефицита глюкозилцерамид-бета-глюкозидазы (болезни Гоше); глюкозилцерамидного липидоза (болезни Гоше); глицириновой ацидурии (первичной гипероксалурии); глицириновой энцефалопатии (некетоновой гиперглицинемии); гликолевой ацидурии (первичной гипероксалурии); GM2-ганглиозидоза 1 типа (болезни Тея-Сакса); синдрома глухоты с зобом (синдрома Пендреда); синдрома Грефе-Ушера (синдрома Ушера); синдрома Гронблада-Страндберга (эластической псевдоксантомы); порфирии Гюнтера (врожденной эритропоэтической порфирии); болезни Гюнтера (врожденной эритропоэтической порфирии); гемохроматоза (гемохроматоза); синдрома Халлгрена (синдрома Ушера); арлекинового ихтиоза; болезни Hb S (серповидноклеточной анемии); HCN (гипохондроплазии); HCP (наследственной копропорфирии); пороков развития головы и мозга; расстройств слуха и глухоты;

проблем со слухом у детей; HEF2A (гемохроматоза 2 типа); HEF2B (гемохроматоза 2 типа); гематопорфирии (порфирии); дефицита гемсинтетазы (эритропоэтической протопорфирии); гемохроматозов (гемохроматоза); гемохроматоза; болезни, связанной с гемоглобином М (метагемоглобинемии бета-глобинового типа); болезни, связанной с гемоглобином S (серповидноклеточной анемии); гемофилии; HEP (гепатоэритропоэтической порфирии); недостаточности печеночной AGT (первичной гипероксалурии); гепатоэритропоэтической порфирии; синдрома гепатолентикулярной дегенерации (болезни Вильсона); наследственной артроофтальмопатии (синдрома Стиклера); наследственной копропорфирии; наследственного дистопического липидоза (болезни Фабри); наследственного гемохроматоза (ННС) (гемохроматоза); наследственной миопатии телец включения (регенерации скелетных мышц); наследственной железо-нагружающей анемии (X-сцепленной сидеробластной анемии); наследственной моторной и сенсорной нейропатии (болезни Шарко-Мари-Тута); наследственной моторной нейропатии (спинальной мышечной атрофии); наследственной моторной нейропатии типа V (дистальной спинальной мышечной атрофии типа V); наследственных множественных экзостозов; наследственного неполипозного колоректального рака; синдрома наследственной периодической лихорадки (семейной средиземноморской лихорадки); наследственного полипоза толстой кишки (семейного аденоматозного полипоза); наследственной эмфиземы легких (дефицита альфа-1-антитрипсина); наследственной резистентности к активированному белку C (тромбофилии, связанной с лейденской мутацией гена фактора V); наследственной сенсорно-вегетативной нейропатии III типа (семейной дисавтономии); наследственной спастической параплегии (младенческой формы наследственного восходящего спастического паралича); наследственной спинальной атаксии (атаксии Фридрейха); наследственного склероза позвоночника (атаксии Фридрейха); анемии Геррика (серповидноклеточной анемии); гетерозиготного OSMED (синдрома Вейссенбахера-Цваймюллера); гетерозиготной отоспондиломегаэпифизарной дисплазии (синдрома Вейссенбахера-Цваймюллера); дефицита НехА (болезни Тея-Сакса); дефицита гексозаминидазы А (болезни Тея-Сакса); дефицита альфа-субъединицы гексозаминидазы (варианта В) (болезни Тея-Сакса); HFE-ассоциированного гемохроматоза (гемохроматоза); HGPS (прогерии); болезни Гиппеля-Линдау (болезни фон Гиппеля-Линдау); HLAN (гемохроматоза); HMN V (дистальной спинальной мышечной атрофии типа V); HMSN (болезни Шарко-Мари-Тута); HNPPCC (наследственного неполипозного колоректального рака); HNPP (наследственной нейропатии со склонностью к параличу от сдавления нервов); гомоцистинурии; дефицита оксидазы гомогентизиновой кислоты (алкаптонурии); гомогентизинурии (алкаптонурии); гомозиготной поздней порфирии кожи (гепатоэритропоэтической порфирии); HP1 (первичной гипероксалурии); HP2 (первичной гипероксалурии); HPA (гиперфенилаланинемии); HPRT - дефицита гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (синдрома Леша-Найхана); HSN типа III (семейной дисавтономии); HSN3 (семейной дисавтономии); HSN-III (семейной дисавтономии); дерматоспараксиса человека (синдрома Элерса-Данлоса дерматоспараксического типа); болезни Хантингтона; синдрома прогерии Хатчинсона-Гилфорда (прогерии); гиперандрогенизма неклассического типа вследствие дефицита 21-гидроксилазы (дефицита 21-гидроксилазы); семейной гиперхиломикронемии (семейного дефицита липопротеинлипазы); гипергликемии с кетоацидозом и лейкопенией (пропионовой ацидемии); гиперлипопропротеинемии типа I (семейного дефицита липопротеинлипазы); первичной гипероксалурии; гиперфенилаланинемии (гиперфенилаланинемии); гиперфенилаланинемии; гипохондродисплазии

(гипохондроплазии); гипохондрогенеза; гипохондроплазии; гипохромной анемии (X-сцепленной сидеробластной анемии); врожденной гипокупремии; синдрома Менкеса; дефицита гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPRT) (синдрома Леша-Найхана); IAHSP (младенческого наследственного восходящего спастического паралича);

5 идиопатического гемохроматоза (гемохроматоза 3 типа); идиопатического неонатального гемохроматоза (неонатального гемохроматоза); идиопатической легочной гипертензии (первичной легочной гипертензии); расстройств иммунной системы (X-сцепленного тяжелого комбинированного иммунодефицита); синдрома недержания пигмента; младенческой церебральной болезни Гоше (болезни Гоше 2

10 типа); младенческой болезни Гоше (болезни Гоше 2 типа); младенческого наследственного восходящего спастического паралича; бесплодия; наследственной эмфиземы (дефицита альфа-1-антитрипсина); наследственных трансмиссивных губчатых энцефалопатии человека (прионной болезни); наследованной склонности к параличам от сдавления нервов (наследственной нейропатии со склонностью к параличам от

15 сдавления нервов); синдрома Инсли-Эстли (отоспондиломегаэпифизарной дисплазии); синдрома перемежающейся острой порфирии (острой перемежающейся порфирии); синдрома кишечного полипоза и кожной пигментации (синдрома Пейтца-Егерса); IP (недержания пигмента); болезни накопления железа (гемохроматоза); изодицентрической хромосомы 15 (idic15); изолированной глухоты (несиндромальной глухоты); синдрома

20 Джексона-Вейсса; JH (гемохроматоза 2 типа); синдрома Жубера; JPLS (ювенильного первичного бокового склероза); ювенильного бокового амиотрофического склероза (амиотрофического бокового склероза 2 типа); ювенильной подагры, хореоатетоза, синдрома умственной отсталости (синдрома Леша-Найхана); синдрома ювенильной гиперурикемии (синдрома Леша-Найхана); JWS (синдрома Джексона-Вейсса); KD (X-

25 сцепленной спинально-бульбарной мышечной атрофии); болезни Кеннеди (X-сцепленной спинально-бульбарной мышечной атрофии); спинально-бульбарной мышечной атрофии Кеннеди (X-сцепленной спинально-бульбарной мышечной атрофии); керазинового гистиоцитоза (болезни Гоше); керазинового липоидоза (болезни Гоше); керазинового тизауризмоза (болезни Гоше); кетотической глицинемии (пропионовой ацидемии);

30 кетотической гиперглициемии (пропионовой ацидемии); заболеваний почек (первичной гипероксалурии); синдрома Клайнфелтера; синдрома Клайнфелтера; дисплазии Книста; болезни Краббе; лакунарной деменции (CADASIL); ахондрогенеза Лангера-Салдино (ахондрогенеза типа II); дисплазии Лангера-Салдино (ахондрогенеза типа II); болезни Альцгеймера с поздним началом (болезни Альцгеймера 2 типа); семейной болезни

35 Альцгеймера с поздним началом (AD2) (болезни Альцгеймера 2 типа); болезни Краббе с поздним началом (LOKD) (болезни Краббе); расстройств обучения (неспособности к обучению); периорального лентигиноза (синдрома Пейтца-Егерса); синдрома Леша-Найхана; лейкодистрофий; лейкодистрофии с волокнами Розенталя (болезни

40 Александера); губчатой лейкодистрофией (болезни Канавана); LFS (синдрома Ли-Фраумени); синдрома Ли-Фраумени; дефицита липазы D (семейного дефицита липопротеинлипазы); дефицита LIPD (семейного дефицита липопротеинлипазы); цереброзидного липидоза (болезни Гоше); младенческого ганглиозидозного липидоза (болезни Тей-Сакса); липоидного гистиоцитоза (керазинового типа) (болезни Гоше); семейного дефицита липопротеинлипазы; заболеваний печени (галактоземии); болезни

45 Лу Герига (бокового амиотрофического склероза); синдрома Луи-Бар (атаксии-телеангиэктазии); синдрома Линча (наследственного неполипозного колоректального рака); дефицита лизилгидроксилазы (синдрома Элерса-Данлоса кифосколиозного типа); болезни Мачадо-Джозефа (спиноцеребеллярной атаксии 3 типа); рака молочной железы

у мужчин (рака молочной железы); мужских половых расстройств; синдрома Тернера у мужчин (синдрома Нунана); злокачественного новообразования молочной железы (рака молочной железы); злокачественной опухоли молочной железы (рака молочной железы); злокачественной опухоли мочевого пузыря (рака мочевого пузыря); рака молочной железы (рака молочной железы); синдрома Марфана 15; синдрома маркера X (синдрома ломкой X-хромосомы); синдрома Мартина-Белла (синдрома ломкой X-хромосомы); синдрома Маккуна-Олбрайта; синдрома Маклеода; MEDNIK; средиземноморской анемии (бета-талассемии); семейной средиземноморской лихорадки; мегаэпифизарной карликовости (отоспондиломегаэпифизарной дисплазии); синдрома Менкеса (синдрома Менкеса); синдрома Менкеса; умственной отсталости с костно-хрящевыми аномалиями (синдрома Коффина-Лоури); нарушений обмена веществ; метатропной карликовости типа II (дисплазии Книста); метатропной дисплазии типа II (дисплазии Книста); метгемоглобинемии бета-глобинового типа; метилмалоновой ацидемии; MFS (синдрома Марфана); МНАМ (синдрома Каудена); МК (синдрома Менкеса); синдрома MICRO; микроцефалии; ММА (метилмалоновой ацидемии); MNK (синдрома Менкеса); синдрома моносомии 1p36 (синдрома делеции 1p36); моносомии X (синдрома Тернера); заболевания двигательных нейронов, бокового амиотрофического склероза (бокового амиотрофического склероза); двигательных нарушений; синдрома Моуата-Вильсона; мукополисахаридоза (MPS I); муковисцидоза (кистозного фиброза); синдрома Мюнке; мультиинфарктной деменции (CADASIL); множественного дефицита карбоксилазы с поздним началом (дефицита биотинидазы); синдрома множественной гамартомы (синдрома Каудена); множественного нейрофиброматоза (нейрофиброматоза); мышечной дистрофии; мышечной дистрофии типа Дюшенна и Беккера; миотонической атрофии (миотонической дистрофии);

25 миотонической дистрофии (миотонической дистрофии); миотонической дистрофии; врожденной микседемы (врожденного гипотиреоза); синдрома Нэнса-Инсли (отоспондиломегаэпифизарной дисплазии); хондродисплазии Нэнса-Суини (отоспондиломегаэпифизарной дисплазии); NBIA1 (нейродегенерации, связанной с пантотенаткиназой); синдрома Нейла-Дингуолла (синдрома Кокейна); нейробластомы сетчатки (ретинобластомы); нейродегенерации с накоплением железа в мозге 1 типа (нейродегенерации, связанной с пантотенаткиназой); нейрофиброматоза типа I; нейрофиброматоза типа II; неврологических заболеваний; нервно-мышечных расстройств; наследственной дистальной двигательной нейропатии типа V (дистальной спинальной мышечной атрофии типа V); наследственной дистальной двигательной

35 нейропатии с пирамидальными признаками (бокового амиотрофического склероза 4 типа); NF (нейрофиброматоза); болезни Ниманна-Пика (болезни Ниманна-Пика); синдрома Ноака (синдрома Пфейффера); некототической гиперглициемии (глициновой энцефалопатии); ненейропатической болезни Гоше (болезни Гоше 1 типа); нефенилкетонурической гиперфенилаланинемии (дефицита тетрагидробиоптерина);

40 несиндромальной глухоты; синдрома Нунана; популяции Норрботтен болезни Гоше (болезни Гоше 3 типа); охроноза (алкаптонурии); охронотического артрита (алкаптонурии); OI (несовершенного остеогенеза); OSMED (отоспондиломегаэпифизарной дисплазии); несовершенного остеогенеза; остеопсатироза (несовершенного остеогенеза); врожденного остеосклероза (ахондроплазии);

45 отоспондиломегаэпифизарной дисплазии (отоспондиломегаэпифизарной дисплазии); отоспондиломегаэпифизарной дисплазии; оксалоза (первичной гипероксалурии); первичной оксалурии (первичной гипероксалурии); нейродегенерации, связанной с пантотенаткиназой; синдрома Патау (трисомии 13); дефицита PBGD (острой

перемежающейся порфирии); дефицита РСС (пропионовой ацидемии); РСТ (поздней порфирии кожи); PDM (миотонической дистрофии 2 типа); синдрома Пендреда; периодического заболевания (семейной средиземноморской лихорадки); периодического перитонита (семейной средиземноморской лихорадки); синдрома периорифициального лентигиноза (синдрома Пейтца-Егерса); заболеваний периферических нервов (семейной дисавтономии); периферического нейрофиброматоза (нейрофиброматоза 1 типа); мышечной атрофии перонеального типа (болезни Шарко-Мари-Тута); дефицита пероксисомальной аланин-глиоксилатаминотрансферазы (первичной гипероксалурии); синдрома Пейтца-Егерса; синдрома Пфейффера; дефицита фенилаланингидроксилазы (фенилкетонурии); фенилкетонурии; феохромоцитомы (болезни фон Гиппеля-Линдау); синдрома Пьера Робена с хондродисплазией плода (синдрома Вейссенбахера-Цваймюллера); пигментного цирроза печени (гемохроматоза); PJS (синдрома Пейтца-Егерса); PKAN (нейродегенерации, связанной с пантотенаткиназой); PKU (фенилкетонурии); пламбопорфирии (порфирии с дефицитом АЛК); PMA (болезни Шарко-Мари-Тута); полиостотической фиброзной дисплазии (синдрома Маккуна-Олбрайта); полипоз толстой кишки (семейного аденоматозного полипоза); гамартозного полипоза кишечника (синдрома Пейтца-Егерса); полипоз кишечника типа II (синдрома Пейтца-Егерса); синдрома полипов и пятен (синдрома Пейтца-Егерса); дефицита порфобилиногенсинтазы (порфирии, связанной с дефицитом ALA); порфирии; связанного с порфиринами расстройства (порфирии); PPH (первичной легочной гипертензии); дефицита PPOX (смешанной порфирии); синдрома Прадера-Лабхарта-Вилли (синдрома Прадера-Вилли); синдрома Прадера-Вилли; предстарческой и старческой деменции (болезни Альцгеймера); первичного гемохроматоза (гемохроматоза); синдрома первичной гиперурикемии (синдрома Леша-Найхана); первичной легочной гипертензии; первичной старческой дегенеративной деменции (болезни Альцгеймера); прионной болезни; мутации проколлагена, EDS типа VII (синдрома Элерса-Данлоса, типа артрохалазии); прогерии (синдрома прогерии Хатчинсона-Гилфорда); прогериоподобного синдрома (синдрома Кокейна); прогероидного нанизма (синдрома Кокейна); хронической наследственной прогрессирующей хореи (болезни Хантингтона) (болезни Хантингтона); прогрессирующей мышечной атрофии (спинальной мышечной атрофии); прогрессирующего деформирующего несовершенного остеогенеза с нормальными склерами (несовершенного остеогенеза III типа); PROMM (миотонической дистрофии 2 типа); пропионической ацидемии; дефицита пропионил-КоА-карбоксилазы (пропионовой ацидемии); дефицита белка C; дефицита белка S; протопорфирии (эритропоэтической протопорфирии); дефицита протопорфириногенаоксидазы (смешанной порфирии); проксимальной миотонической дистрофии (миотонической дистрофии 2 типа); проксимальной миотонической миопатии (миотонической дистрофии 2 типа); псевдоболени Гоше; синдрома псевдо-Ульриха-Тернера (синдрома Нунана); эластической псевдоксантомы; психозинового липидоза (болезни Краббе); легочной артериальной гипертензии (первичной легочной гипертензии); легочной гипертензии (первичной легочной гипертензии); PWS (синдрома Прадера-Вилли); PXE - эластической псевдоксантомы (эластической псевдоксантомы); Rb (ретинобластомы); нейрональной болезни Реклингхаузена (нейрофиброматоза 1 типа); рецидивирующего полисерозита (семейной средиземноморской лихорадки); заболеваний сетчатки; синдрома пигментного ретинита-глухоты (синдрома Ушера); ретинобластомы; синдрома Ретта; RFALS 3 типа (бокового амиотрофического склероза 2 типа); синдрома Рикера (миотонической дистрофии 2 типа); синдрома Райли-Дея (семейной дисавтономии); синдрома Руси-

Леви (болезни Шарко-Мари-Тута); RSTS (синдрома Рубинштейна-Тайби); RTS (синдрома Ретта) (синдрома Рубинштейна-Тайби); RTT (синдрома Ретта); синдрома Рубинштейна-Тайби; синдрома Сака-Барабаса (синдрома Элерса-Данлоса сосудистого типа); SADDAN; семейного синдрома саркомы Ли и Фраумени (синдрома Ли-Фраумени);
 5 синдрома саркомы, рака молочной железы, лейкоза и опухоли коры надпочечников (SBLA) (синдрома Ли-Фраумени); синдрома SBLA (синдрома Ли-Фраумени); SBMA (X-сцепленной спинально-бульбарной мышечной атрофии); SCD (серповидноклеточной анемии); акустической двусторонней шванномы (нейрофиброматоза 2 типа); SCIDX1 (X-сцепленного тяжелого комбинированного иммунодефицита); туберозного склероза
 10 (туберозного склероза); SDAT (болезни Альцгеймера); врожденной SED (врожденной спондилоэпифизарной дисплазии); SED Страдвика (спондилоэпиметафизарной дисплазии Страдвика); SEDc (врожденной спондилоэпифизарной дисплазии); SEMD типа Страдвика (спондилоэпиметафизарной дисплазии Страдвика); старческой деменции (болезни Альцгеймера 2 типа); тяжелой ахондроплазии с задержкой развития и черным акантозом
 15 (SADDAN); синдрома Шпринтцена (синдрома делеции 22q11.2); серповидноклеточной анемии; синдрома скелет-кожа-мозг (SADDAN); нарушений пигментации кожи; SMA (спинальной мышечной атрофии); SMED типа Страдвика (спондилоэпиметафизарной дисплазии Страдвика); SMED типа I (спондилоэпиметафизарной дисплазии Страдвика); синдрома Смита-Лемли-Опица; южноафриканской генетической порфирии (смешанной
 20 порфирии); младенческого восходящего спастического паралича (младенческого восходящего наследственного спастического паралича); нарушений речи и коммуникации; сфинголипидоза, болезни Тея-Сакса (болезни Тея-Сакса); спинально-бульбарной мышечной атрофии; спинальной мышечной атрофии; дистальной спинальной мышечной атрофии типа V (дистальной спинальной мышечной атрофии
 25 типа V); дистальной спинальной мышечной атрофии с преобладанием верхних конечностей (дистальной спинальной мышечной атрофии типа V); спиноцереbellарной атаксии; спондилоэпиметафизарной дисплазии Страдвика; врожденной спондилоэпифизарной дисплазии; спондилоэпифизарной дисплазии (коллагенопатии типов II и XI); врожденной спондилометаэпифизарной дисплазии Страдвика
 30 (спондилоэпиметафизарной дисплазии Страдвика); спондилометафизарной дисплазии (SMD) (спондилоэпиметафизарной дисплазии Страдвика); спондилометафизарной дисплазии Страдвика (спондилоэпиметафизарной дисплазии Страдвика); губчатой дегенерации центральной нервной системы (болезни Канавана); губчатой дегенерации головного мозга (болезни Канавана); младенческой губчатой дегенерации белого
 35 вещества (болезни Канавана); sporadicческой первичной легочной гипертензии (первичной легочной гипертензии); синдрома SSB (SADDAN); синдрома стальных волос (синдрома Менкеса); болезни Штейнерта (миотонической дистрофии); синдрома Штейнерта при миотонической дистрофии (миотонической дистрофии); синдрома Стиклера; инсульта (CADASIL); синдрома Страдвика (спондилоэпиметафизарной
 40 дисплазии Страдвика); подострой нейропатической болезни Гоше (болезни Гоше 3 типа); шведской генетической порфирии (острой перемежающейся порфирии); шведской порфирии (острой перемежающейся порфирии); дисплазии хряща типа «швейцарского сыра» (дисплазии Книста); болезни Тея-Сакса; ТД - танатофорной карликовости (танатофорной дисплазии); TD с прямыми бедренными костями и черепом в форме
 45 трилистника (танатофорной дисплазии 2 типа); атаксии-телеангиэктазии (атаксии-телеангиэктазии); синдрома феминизации яичек (синдрома нечувствительности к андрогенам); дефицита тетрагидробиптерина; TFM - синдрома феминизации яичек (синдрома нечувствительности к андрогенам); промежуточной талассемии (бета-

талассемии); большой талассемии (бета-талассемии); танатофорной дисплазии; реагирующей на тиамин мегалобластной анемии с сахарным диабетом и нейросенсорной глухотой; тромбофилии из-за дефицита кофактора для активированного белка С лейденского типа (тромбофилии, связанной с лейденской мутацией гена фактора V);

5 заболевания щитовидной железы; томакулезной нейропатии (наследственной нейропатии со склонностью к параличу от сдавления нервов); полного дефицита HPRT (синдрома Леша-Найхана); полного дефицита гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (синдрома Леша-Найхана); синдрома Туретта; трансмиссивных деменций (прионной болезни); трансмиссивных губчатых энцефалопатий (прионной болезни); синдрома

10 Тричера-Коллинза; позднего несовершенного остеогенеза (несовершенного остеогенеза I типа); синдрома тройной X-хромосомы; синдрома тройной X-хромосомы (синдрома тройной X-хромосомы); трисомии по 21 хромосоме (синдрома Дауна); трисомии X (синдрома тройной X-хромосомы); синдрома Труазье-Хано-Шоффара (гемохроматоза); TS (синдрома Тернера); TSD (болезни Тея-Сакса); TSE (прионной болезни); туберозного склероза (туберозного склероза); туберозного склероза; синдрома Тернера; синдрома Тернера у женщин с X-хромосомой (синдрома Нунана); фенотипа Тернера с нормальным кариотипом (синдрома Нунана); синдрома Тернера (синдрома Тернера); синдрома, подобного синдрому Тернера (синдрома Нунана); болезни Гоше 2 типа (болезни Гоше 2 типа); болезни Гоше 3 типа (болезни Гоше 3 типа); болезни, связанной с дефицитом

20 UDP-галактозо-4-эпимеразы (галактоземии); дефицита UDP-глюкозо-4-эпимеразы (галактоземии); дефицита UDP-глюкозо-гексозо-1-фосфатуридилтрансферазы (галактоземии); синдрома Ульриха-Нунана (синдрома Нунана); синдрома Ульриха-Тернера (синдрома Тернера); недифференцированной глухоты (несиндромальной глухоты); дефицита UPS (острой перемежающейся порфирии); рака мочевого пузыря

25 (рака мочевого пузыря); дефицита UROD (поздней порфирии кожи); дефицита уропорфириногендекарбоксилазы (поздней порфирии кожи); дефицита уропорфириногенсинтазы (острой перемежающейся порфирии); дефицита UROS (врожденной эритропоэтической порфирии); синдрома Ушера; дефицита UTP-гексозо-1-фосфатуридилтрансферазы (галактоземии); синдрома Ван Богарта-Бертрана

30 (болезни Канавана); синдрома Ван дер Ховва (несовершенного остеогенеза типа I); смешанной порфирии; велокардиофациального синдрома (синдрома делеции 22q11.2); синдрома VHL (болезни фон Гиппеля-Линдау); нарушения зрения и слепоты (синдрома Альстрема); болезни фон Богерта-Бертрана (болезни Канавана); болезни фон Гиппеля-Линдау; болезни фон Рекленхаузена-Аппельбаума (гемохроматоза); болезни фон

35 Рекленхаузена (нейрофиброматоза 1 типа); VP (смешанной порфирии); болезни Вролика (несовершенного остеогенеза); синдрома Ваарденбурга; синдрома Варбурга-Шо-Феделиуса (синдрома MICRO); WD (болезни Вильсона); синдрома Вейссенбахера-Цваймюллера; болезни Вильсона; болезни Вильсона (болезни Вильсона); синдрома Вольфа-Хиршхорна; периодической болезни Вольфа (семейной средиземноморской

40 лихорадки); WZS (синдрома Вейссенбахера-Цваймюллера); пигментной ксеродермы; X-сцепленной умственной отсталости и макроорхидизма (синдрома ломкой X-хромосомы); X-сцепленной первичной гиперурикемии (синдрома Леша-Найхана); X-сцепленного тяжелого комбинированного иммунодефицита; X-сцепленной сидеробластной анемии; X-сцепленной спинально-бульбарной мышечной атрофии

45 (болезни Кеннеди); X-сцепленного дефекта фермента, вызывающего увеличение синтеза мочевой кислоты (синдрома Леша-Найхана); X-SCID (X-сцепленного тяжелого комбинированного иммунодефицита); XLSA (X-сцепленной сидеробластной анемии); XSCID (X-сцепленного тяжелого комбинированного иммунодефицита); синдрома XXX

(синдрома тройной X-хромосомы); синдрома XXXX (48, XXXX); синдрома XXXXX (49, XXXXX); синдрома ХХУ (синдрома Клайнфелтера); трисомии ХХУ (синдрома Клайнфелтера); кариотипа ХУУ (синдрома 47, ХУУ); синдрома ХУУ (синдрома 47, ХУУ); и синдрома УУ (синдрома 47, ХУУ).

5 В дополнительном предпочтительном аспекте последовательность нуклеиновой кислоты, определенную в настоящем документе, или композицию согласно настоящему изобретению, содержащую множество последовательностей нуклеиновых кислот, определенных в настоящем документе, можно применять для получения
10 фармацевтической композиции, в частности, для целей, определенных в настоящем документе, предпочтительно для применения в генной терапии при лечении заболеваний, определенных в настоящем документе.

Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению также можно применять в генной терапии, в частности, при лечении заболевания или расстройства, предпочтительно, определенного в настоящем документе.

15 Помимо этого настоящее изобретение относится к нескольким сферам применения и вариантам применения композиции, содержащей РНК, или фармацевтической композиции, или вакцины, или набора, или набора частей согласно настоящему изобретению, определенных в настоящем документе. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения композицию или фармацевтическую композицию,
20 или набор, или набор частей можно применять в качестве лекарственного средства, а именно для лечения опухолевых или раковых заболеваний. В данном случае лечение предпочтительно проводят с помощью внутриопухолевого применения, в частности, путем инъекции в опухолевую ткань. В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится ко второму варианту медицинского применения композиции,
25 содержащей РНК, или фармацевтической композиции, или вакцины, или набора, или набора частей, описанных выше, причем эти объекты применяют для получения лекарственного средства, в частности, для внутриопухолевого применения (введения) для лечения опухолевых или раковых заболеваний.

Предпочтительно заболевания, упомянутые в настоящем документе, выбраны из
30 опухолевых или раковых заболеваний, которые предпочтительно включают, например, острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, аденокарциному, виды рака, связанного со СПИДом, лимфому, связанную со СПИДом, рак анального канала, рак аппендикса, астроцитому, базальноклеточную карциному, рак желчного протока, рак мочевого пузыря, рак костей, остеосаркому/злокачественную
35 фиброзную гистиоцитому, глиому ствола мозга, опухоль головного мозга, астроцитому мозжечка, церебральную астроцитому/злокачественную глиому, эпендимому, медуллобластому, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, глиому зрительного тракта и гипоталамуса, рак молочной железы, бронхиальные аденомы/карциномы, лимфому Беркитта, детскую карциноидную опухоль,
40 карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, карциному с неизвестной первичной локализацией, первичную лимфому центральной нервной системы, детскую астроцитому мозжечка, детскую церебральную астроцитому/злокачественную глиому, рак шейки матки, разновидности рака у детей, хронический лимфолейкоз, хронический миелогенный лейкоз, хронические миелопролиферативные расстройства, рак толстой
45 кишки, кожную Т-клеточную лимфому, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, рак эндометрия, эпендимому, рак пищевода, саркому Юинга в семействе опухолей Юинга, детскую экстракраниальную герминогенную опухоль, экстрагонадную герминогенную опухоль, рак экстрапеченочных желчных протоков, внутриглазную

меланому, ретинобластому, рак желчного пузыря, рак желудка (желудка), карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, стромальную опухоль желудочно-кишечного тракта (GIST), экстракраниальную, экстрагонадную или овариальную герминогенную опухоль, гестационную трофобластическую опухоль, глиому ствола головного мозга, 5 детскую церебральную астроцитому, детскую глиому зрительного тракта и гипоталамуса, карциноидную опухоль желудка, лейкоз ворсистых клеток, рак головы и шеи, рак сердца, гепатоцеллюлярный (печень) рак, лимфому Ходжкина, гипоталамический рак, детскую глиому гипоталамуса и зрительного тракта, внутриглазную меланому, карциному островковых клеток (эндокринная часть 10 поджелудочной железы), саркому Капоши, рак почек (рак из клеток почки), рак гортани, лейкозы, острый лимфобластный лейкоз, острый миелобластный лейкоз, хронический лимфолейкоз, хронический миелогенный лейкоз, лейкоз ворсистых клеток, рак губ и ротовой полости, липосаркому, рак печени, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, лимфомы, лимфому, связанную со СПИДом, лимфому 15 Беркитта, кожную Т-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинские лимфомы, первичную лимфому центральной нервной системы, макроглобулинемию Вальденстрема, злокачественную фиброзную гистиоцитому костей/остеосаркому, детскую медуллобластому, меланому, внутриглазную (глаз) меланому, карциному из клеток Меркеля, злокачественную мезотелиому у взрослых, детскую мезотелиому, 20 метастатический плоскоклеточный рак шеи с оккультным первичным раком ротовой полости, детский синдром множественной эндокринной неоплазии, множественную миелому/новообразование из плазматических клеток, фунгоидный микоз, миелодиспластические синдромы, миелодиспластические/миелопролиферативные заболевания, хронический миелогенный лейкоз, острый миелолейкоз у взрослых, детский острый 25 миелолейкоз, множественную миелому (рак костного мозга), хронические миелопролиферативные расстройства, рак полости носа и околоносовых пазух, карциному носоглотки, нейробластому, рак полости рта, рак ротоглотки, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому костей, рак яичников, эпителиальный рак яичников (поверхностную эпителиально-стромальную опухоль), герминогенную опухоль 30 яичников, опухоль яичников с низким потенциалом злокачественности, рак поджелудочной железы, рак островковых клеток поджелудочной железы, рак полости носа и околоносовых пазух, рак парашитовидной железы, рак полового члена, фарингеальный рак, феохромоцитому, пинеальную астроцитому, пинеальную герминому, детскую пинеобластому и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные 35 опухоли, аденому гипофиза, неоплазию плазматических клеток/множественную миелому, плевропульмональную бластому, первичную лимфому центральной нервной системы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, карциному почек (рак почек), рак почечных лоханок и шейки матки, ретинобластому, детскую рабдомиосаркому, рак слюнных желез, саркому из семейства опухолей Юинга, саркому Капоши, саркому 40 мягких тканей, саркому матки, синдром Сезари, рак кожи (отличный от меланомы), рак кожи (меланому), карциному кожи из клеток Меркеля, рак тонкого кишечника, плоскоклеточную карциному, метастатический плоскоклеточный рак шеи с оккультным первичным раком ротовой полости, детскую примитивную нейроэктодермальную опухоль, рак яичек, рак горла, детскую тимому, тимому и карциному тимуса, рак 45 щитовидной железы, детский рак щитовидной железы, переходноклеточный рак почечной лоханки и мочеточника, гестационную трофобластическую опухоль, рак мочеточника, рак эндометрия матки, саркому матки, рак влагалища, детскую глиому зрительного тракта и гипоталамуса, рак вульвы, макроглобулинемию Вальденстрема

и детскую опухоль Вильмса (рак почек).

Особенно предпочтительные примеры опухолей или видов рака, которые подходят для внутриопухолевого введения, включают рак предстательной железы, рак легких, рак молочной железы, рак головного мозга, рак головы и шеи, рак щитовидной железы, рак толстой кишки, рак желудка, рак печени, рак поджелудочной железы, рак яичников, рак кожи, рак мочевого пузыря, рак матки и шейки матки.

В соответствии с конкретным вариантом реализации настоящего изобретения лекарственное средство можно вводить пациенту в виде однократной дозы или в виде нескольких доз. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лекарственное средство можно вводить пациенту в виде однократной дозы с последующим введением второй дозы и необязательно даже третьей, четвертой (или более) доз, следующих за ней, и так далее.

Предпочтительно композиция согласно настоящему изобретению обеспечена в количестве по меньшей мере 40 мкг РНК на дозу. Более конкретно количество иРНК, содержащееся в однократной дозе, обычно составляет по меньшей мере 200 мкг, предпочтительно от 200 мкг до 1000 мкг, более предпочтительно от 300 мкг до 850 мкг, еще более предпочтительно от 300 мкг до 700 мкг.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты композиции согласно настоящему изобретению, предпочтительно молекула иРНК, кодирует по меньшей мере один эпитоп по меньшей мере одного антигена. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере один антиген выбран из группы, состоящей из антигена из патогена, связанного с инфекционными заболеваниями, антигена, связанного с аллергиями, антигена, связанного с аутоиммунными заболеваниями, и антигена, связанного с раковыми или опухолевыми заболеваниями, или фрагмента, варианта и/или производного указанного антигена.

Предпочтительно по меньшей мере один антиген происходит из патогена, предпочтительно вирусного, бактериального, грибкового или протозойного патогена, предпочтительно выбранного из перечня, состоящего из: вируса бешенства, вируса Эбола, вируса Марбург, вируса гепатита В, вируса папилломы человека (hPV), *Bacillus anthracis*, респираторно-синцитиального вируса (RSV), вируса простого герпеса (ВПГ), вируса Денге, ротавируса, вируса гриппа, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса желтой лихорадки, *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium*, *Staphylococcus aureus*, *Chlamydia trachomatis*, цитомегаловируса (ЦМВ) и вируса гепатита В (ВГВ).

В данном случае иРНК композиции согласно настоящему изобретению может кодировать белок или пептид, который содержит по меньшей мере один эпитоп патогенного антигена или его фрагмента, варианта или производного. Такие патогенные антигены происходят из патогенных организмов, в частности, бактериальных, вирусных или протозойных (многоклеточных) патогенных организмов, которые вызывают иммунологическую реакцию у субъекта, в частности, субъекта-млекопитающего, более конкретно у человека. Более конкретно патогенные антигены предпочтительно включают поверхностные антигены, например, белки (или фрагменты белков, например, внешнюю часть поверхностного антигена), расположенные на поверхности вируса или бактериального или протозойного организма.

Патогенные антигены являются пептидными или белковыми антигенами, предпочтительно происходящими из патогена, связанного с инфекционным заболеванием, которые предпочтительно выбраны из антигенов, происходящих из патогенов *Acinetobacter baumannii*, рода *Anaplasma*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ancylostoma*

braziliense, *Ancylostoma duodenale*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Ascaris lumbricoides*, рода *Aspergillus*, *Astroviridae*, рода *Babesia*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bartonella henselae*, вируса ВК, *Blastocystis hominis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, рода *Borrelia*, *Borrelia* spp., рода *Brucella*, *Brugia malayi*, семейства *Bunyaviridae*,
 5 *Burkholderia cepacia* и других видов *Burkholderia*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, семейства *Caliciviridae*, рода *Campylobacter*, *Candida albicans*, *Candida* spp., *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, приона, связанного с болезнью Крейтцфельда-Якоба, *Clonorchis sinensis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium* spp., *Clostridium tetani*,
 10 *Coccidioides* spp., коронавирусов, *Corynebacterium diphtheriae*, *Coxiella burnetii*, вируса конго-крымской геморрагической лихорадки, *Cryptococcus neoformans*, рода *Cryptosporidium*, цитомегаловируса (ЦМВ), вирусов Денге (DEN-1, DEN-2, DEN-3 и DEN-4), *Dientamoeba fragilis*, вируса Эбола (EBOV), рода *Echinococcus*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, рода *Ehrlichia*, *Entamoeba histolytica*, рода *Enterococcus*, рода *Enterovirus*,
 15 энтеровирусов, в основном вируса Коксаки и энтеровируса 71 (EV71), *Epidermophyton* spp., вируса Эпштейна-Барр (EBV), *Escherichia coli* O157:H7, O111 и O104:H4, *Fasciola hepatica* и *Fasciola gigantica*, приона FFI, суперсемейства *Filarioidea*, флавивирусов, *Francisella tularensis*, рода *Fusobacterium*, *Geotrichum candidum*, *Giardia intestinalis*, *Gnathostoma* spp., приона, связанного с синдромом Герстмана-Штраусслера-Шейнкера,
 20 вируса Гуанарито, вируса *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, хенипавируса (вирус Хендра и вирус Нипах), вируса гепатита А, вируса гепатита В (ВГВ), вируса гепатита С (ВГС), вируса гепатита D, вируса гепатита Е, вируса простого герпеса 1 и 2 (ВПГ-1 и ВПГ-2), *Histoplasma capsulatum*, ВИЧ (вируса иммунодефицита человека), *Hortaea werneckii*, бокавируса человека (HBoV), вируса герпеса человека 6
 25 (HHV-6) и вируса герпеса человека 7 (HHV-7), метапневмовируса человека (hMPV), вируса папилломы человека (HPV), вирусов парагриппа человека (HPIV), вируса японского энцефалита, вируса JC, вируса Джунин, *Kingella kingae*, *Klebsiella granulomatis*, приона куру, вируса Ласса, *Legionella pneumophila*, рода *Leishmania*, рода *Leptospira*, *Listeria monocytogenes*, вируса лимфоцитарного хорио менингита (LCMV), вируса Мачупо,
 30 *Malassezia* spp., вируса Марбург, вируса кори, *Metagonimus yokagawai*, *Microsporidia* phylum, вируса контагиозного моллюска (MCV), вируса паротита, *Mycobacterium leprae* и *Mycobacterium lepromatosis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Naegleria fowleri*, *Necator americanus*, *Neisseria gonorrhoeas*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia asteroides*, *Nocardia* spp., *Onchocerca volvulus*, *Orientia tsutsugamushi*,
 35 семейства *Orthomyxoviridae* (грипп), *Paracoccidioides brasiliensis*, *Paragonimus* spp., *Paragonimus westermani*, парвовируса B19, рода *Pasteurella*, рода *Plasmodium*, *Pneumocystis jirovecii*, полиовируса, вируса бешенства, респираторно-синцитиального вируса (RSV), риновируса, риновирусов, *Rickettsia akari*, рода *Rickettsia*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, вируса лихорадки долины Рифт, ротавируса, вируса краснухи,
 40 вируса сабиа, рода *Salmonella*, *Sarcoptes scabiei*, SARS-коронавируса, рода *Schistosoma*, рода *Shigella*, вируса Син Номбре, хантавируса, *Sporothrix schenckii*, рода *Staphylococcus*, рода *Staphylococcus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Strongyloides stercoralis*, рода *Taenia*, *Taenia solium*, вируса клещевого энцефалита (TBEV), *Toxocara canis* или *Toxocara cati*, *Toxoplasma gondii*, *Treponema pallidum*, *Trichinella spiralis*, *Trichomonas vaginalis*, *Trichophyton* spp., *Trichuris trichiura*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Ureaplasma urealyticum*, вируса ветряной оспы (VZV), *Variola major* или *Variola minor*, приона vCJD, вируса венесуэльского лошадиного энцефалита. *Vibrio cholerae*, вируса Западного Нила, вируса западного конского энцефалита, *Wuchereria*

bancrofti, вируса желтой лихорадки, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis*.

Помимо этого патогенный антиген (антиген, происходящий из патогена, связанного с инфекционным заболеванием) может быть предпочтительно выбран из антигенов, включающих: белок наружной мембраны A OmpA, белок Вар, связанный с биопленкой, транспортный белок MusK (*Acinetobacter baumannii*, акинетобактерные инфекции); вариабельный поверхностный гликопротеин VSG, связанный с микротрубочками белок MAP15, транс-сиалидазу TSA (*Trypanosoma brucei*, африканская сонная болезнь (африканский трипаносомоз)); антиген р24 ВИЧ, белки оболочки ВИЧ (Gp120, Gp41, Gp160), полипротеин GAG, белок отрицательного фактора Nef, трансактиватор транскрипции Tat (ВИЧ (вирус иммунодефицита человека), СПИД (синдром приобретенного иммунодефицита)); ингибируемый галактозой адгезивный белок GIAP, антиген Eh29 29 кДа, лектин Gal/GalNAc, белок CRT, иммунодоминантный антиген 125 кДа, белок M17, адгезин ADH112, белок STIRP (*Entamoeba histolytica*, амебиаз); основные поверхностные белки 1-5 (MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4, MSP5), белки системы секреции IV типа (VirB2, VirB7, VirB11, VirD4) (род *Anaplasma*, анаплазмоз); защитный антиген PA, фактор отека EF, летальный фактор LF, белки гомологии S-слоя SLH (*Bacillus anthracis*, сибирская язва); акранолизин, фосфолипазу D, коллагенсвязывающий белок CbpA (*Arcanobacterium haemolyticum*, инфекция *Arcanobacterium haemolyticum*); белок нуклеокапсида NP, предшественника гликопротеина GPC, гликопротеин GP1, гликопротеин GP2 (вирус Джунин, аргентинская геморрагическая лихорадка); белки хитин-белкового слоя, поверхностный антиген A14 14 кДа, основной белок спермы MSP, белок-организатор полимеризации MSP MPOP, фибриллярный белок MSP 2 MFP2, активирующую полимеризацию MSP киназу MPAK, ABA-1-подобный белок ALB, белок ABA-1, кутикулин CUT-1 (*Ascaris lumbricoides*, аскаридоз); аллерген Asp v13 41 кДа, аллерген Asp f3, основной конидиальный поверхностный белок rodlet A, протеазу Pep1p, GPI-закрепленный белок Gel1p, GPI-закрепленный белок Crf1p (род *Aspergillus*, аспергиллез); белок семейства VP26, белок VP29 (Astroviridae, астровирусная инфекция); ассоциированный с роптриями белок 1 RAP-1, поверхностные антигены мерозоитов MSA-1, MSA-2 (a1, a2, b, c), 12D3, 11C5, 21 B4, P29, вариант поверхностного антигена эритроцитов VESA1, апикальный мембранный антиген 1 AMA-1 (род *Babesia*, бабезиоз); гемолизин, энтеротоксин C, PXO1-51, гликолатоксидазу, ABC-транспортер, пенициллинсвязывающий белок, белок семейства переносчиков цинка, псевдоуридинсинтазу Rsu, белок репликации плазмиды RepX, олигоэндопептидазу F, белок мембраны профага, белок HemK, жгутиковый антиген H, антиген клеточной поверхности 28,5 кДа (*Bacillus cereus*, инфекция *Bacillus cereus*); большой Т-клеточный антиген LT, малый Т-клеточный антиген, капсидный белок VP1, капсидный белок VP2 (вирус ВК, инфекция вирусом ВК); белок 29 кДа, каспаза-3-подобные антигены, гликопротеины (*Blastocystis hominis*, инфекция *Blastocystis hominis*); поверхностный адгезин дрожжей WI-1 (*Blastomyces dermatitidis*, бластомикоз); нуклеопротеин N, полимеразу L, матриксный белок Z, гликопротеин GP (вирус Мачупо, боливийская геморрагическая лихорадка); белок наружной поверхности A OspA, белок наружной поверхности OspB, белок наружной поверхности OspC, связывающий декорин белок A DbpA, связывающий декорин белок B DbpB, основной белок филаментов жгутиков Fla 41 кДа, предшественника основного белка мембраны A BmpA (иммунодоминантный антиген P39), предшественника липопротеина наружной поверхности 22 кДа (антиген IPLA7), вариабельный поверхностный липопротеин vlsE (род *Borrelia*, боррелиоз); ботулинические нейротоксины BoNT/A1, BoNT/A2, BoNT/A3, BoNT/B, BoNT/C, BoNT/

D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G, рекомбинантный домен Нс ботулинического токсина F F_{Hc} (*Clostridium botulinum*, ботулизм (и детский ботулизм)); предшественника гликопротеина нуклеокапсида (вирус Сабиа, бразильская геморрагическая лихорадка); медь/цинк-супероксиддисмутазу SodC, бактериоферритин Bfr, белок RplL субъединицы

5 рибосомы 50S, OmpA-подобный содержащий трансмембранный домен белок Omp31, иммуногенный белок M5 P39 39 кДа, периплазматический цинк-связывающий белок znuA цинк/ABC-транспортера, периплазматический иммуногенный белок Bp26, белок S12 RpsL субъединицы рибосомы 30S, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу Gap, предшественника иммуногенного белка наружной мембраны Omp25 25 кДа, инвазивный

10 белок B_lalB, запускающий фактор Tig, молекулярный шаперон DnaK, предполагаемую пептидил-пролил-цис-транс-изомеразу SurA, липопротеин Omp19, белок наружной мембраны MotY Omp16, консервативный белок наружной мембраны D15, малатдегидрогеназу Mdh, компонент секреторной системы IV типа (T4SS) VirJ, липопротеин с неизвестной функцией BAB1_0187 (род *Brucella*, бруцеллез); членов

15 семейства ABC-транспортеров (LolC, OppA и PotF), предполагаемый трансмембранный белок системы высвобождения липопротеинов LolC/E, флагеллин FliC, белок внутриклеточной подвижности A Burkholderia BimA, бактериальный фактор элонгации Tu ef-tu, OmpA-подобный белок 17 кДа, boaA-кодирующий белок, boaB-кодирующий белок (*Burkholderia* серасия и другие виды *Burkholderia*, инфекция *Burkholderia*);

20 миколитрансферазу Ag85A, белок теплового шока Hsp65, белок TB10.4, антиген 19 кДа, белок PstS3, белок теплового шока Hsp70 (*Mycobacterium ulcerans*, язва Бурули); основной и минорный капсидные белки норовируса VP1 и VP2, геномный полипротеин, капсидный белок саповируса VP1, белок Vp3, геномный полипротеин (семейство *Caliciviridae*, инфекция калицивирусом (норовирус и саповирус)); основной белок

25 наружной мембраны PorA, флагеллин FlaA, поверхностный антиген CjaA, фибронектинсвязывающий белок CadF, аспартат/глутамат-связывающий белок ABC-транспортера Peb1A, белок FspA1, белок FspA2 (род *Campylobacter*, кампилобактериоз); гликолитический фермент енолазу, секретируемые аспартилпротеазы SAP1-10, гликофосфатидилинозитол (GPI)-связанный белок клеточной стенки, белок Hyr1,

30 родственный рецептору комплемента 3 белок CR3-RP, адгезин Als3p, белок теплового шока hsp90 90 кДа, гидрофобный белок клеточной поверхности CSH (обычно *Candida albicans* и другие виды *Candida*, кандидоз); антиген 17 кДа, белок P26, тримерные адгезины аутооттранспортировки TAA, адгезин A *Bartonella* BadA, вариабельно экспрессируемые белки наружной мембраны Vomp, белок Pap3, белок HbpA,

35 ассоциированная с оболочкой протеза HtrA, белок OMP89, белок GroEL, белок LalB, белок OMP43, дигидролипоамидсукцинилтрансферазу SucB (*Bartonella henselae*, болезнь кошачьих царапин); поверхностный белок амастигот 2, специфичный для амастигот поверхностный белок SSP4, круципаин, транс сиаид азу TS, поверхностный гликопротеин трипомастигот TSA-1, регуляторный белок комплемента CRP-10, белок

40 G4, белок G2, пароксонемальный палочковый белок PAR2, парафлагеллярный палочковый компонент Par1, муцинассоциированные поверхностные белки MPSP (*Trypanosoma cruzi*, болезнь Шагаса (американский трипаносомоз)); гликопротеины оболочки (gB, gC, gE, gH, gI, gK, gL) (вирус ветряной оспы (VZV), ветряная оспа); основной белок наружной мембраны MOMP, предполагаемый белок наружной

45 мембраны PMPC, белок комплекса наружной мембраны B OmcB, белки теплового шока Hsp60 HSP10, белок IncA, белки системы секреции типа III, белок малой цепи рибонуклеотидредуктазы NrdB, плазмидный белок Pgp3, наружный хламидиальный белок N CopN, антиген CT521, антиген CT425, антиген CT043, антиген TC0052, антиген

TC0189, антиген TC0582, антиген TC0660, антиген TC0726, антиген TC0816, антиген TC0828 (*Chlamydia trachomatis*, хламидиоз); белок низкого ответа на кальций E LCrE, наружный хламидиальный белок N CopN, сериновую/треониновую протеинкиназу PknD, переносащий ацил белок S-малонилтрансферазу FabD, связывающий одонитевую ДНК белок Ssb, основной белок наружной мембраны МОМР, белок наружной мембраны 2 Omp2, семейство полиморфных мембранных белков (Pmp1, Pmp2, Pmp3, Pmp4, Pmp5, Pmp6, Pmp7, Pmp8, Pmp9, Pmp10, Pmp11, Pmp12, Pmp13, Pmp14, Pmp15, Pmp16, Pmp17, Pmp18, Pmp19, Pmp20, Pmp21) (*Chlamydomonas pneumoniae*, инфекция *Chlamydomonas pneumoniae*); холерный токсин В СТВ, токсин-корегулируемый пилин А ТсрА, токсин-корегулируемый пилин ТсрF, белок F биосинтеза токсин-корегулируемых пилей ТсрF, субъединицу А холерного энтеротоксина, субъединицу В холерного энтеротоксина, термостабильный энтеротоксин ST, чувствительный к маннозе гемагглютинин MSHA, порин белка наружной мембраны U ompU, порирующий белок В, полиморфный мембранный белок D (*Vibrio cholerae*, холера); пропионил-КоА-карбоксилазу PCC, белок 14-3-3, прогибитин, цистеинпротеазы, глутатионтрансферазы, гельзолин, катепсин-L-протеазу CatL, белок тегумента TP20.8 20,8 кДа, белок тегумента TP31.8 31,8 кДа, фосфатазу лизофосфатидиловой кислоты LPAR, (*Clonorchis sinensis*, клонорхоз); белки поверхностного слоя SLP, антиген глутаматдегидрогеназы GDH, токсин А, токсин В, цистеинпротеазу Cwp84, цистеинпротеазу Cwp13, цистеинпротеазу Cwp19, белок клеточной стенки CwpV, флагеллярный белок FliC, флагеллярный белок FliD (*Clostridium difficile*, инфекция *Clostridium difficile*); риновирусы: капсидные белки VP1, VP2, VP3, VP4; коронавирусы: белки шипа S, белки оболочки E, мембранные белки M, нуклеокапсидные белки N (обычно риновирусы и коронавирусы, простуда (острый вирусный ринофарингит; острая инфекция верхних дыхательных путей)); прионный белок Prp (прион CJD, болезнь Крейтцфельда-Якоба (CJD)); белок оболочки Gc, белок оболочки Gn, нуклеокапсидные белки (вирус геморрагической лихорадки Крым-Конго, геморрагическая лихорадка Крым-Конго (CCHF)); ассоциированную с вирулентностью DEAD-бокс-РНК-геликазу VAD1, галактоксиломаннан-белок GalXM, глюкуроноксидоманнан GXM, маннопротеин MP (*Cryptococcus neoformans*, криптококкоз); кислый рибосомный белок P2 CrP2, антигены муцина Muc1, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5, Muc6, Muc7, белок поверхностной адгезии CP20, белок поверхностной адгезии CP23, поверхностный белок CP12, поверхностный белок CP21, поверхностный белок CP40, поверхностный белок CP60, поверхностный белок CP15, ассоциированные с поверхностью гликопептиды gp40, ассоциированные с поверхностью гликопептиды gp15, белок стенки ооцисты АВ, профилин PRF, апираза (род *Cryptosporidium*, криптоспориоз); связывающий жирные кислоты и ретинол белок-1 FAR-1, тканевой ингибитор металлопротеазы TIMP (TMP), цистеинпротеазу ACEY-1, цистеинпротеазу ACCP-1, поверхностный антиген Ac-16, секретируемый белок 2 ASP-2, металлопротеазу 1 MTP-1, ингибитор аспартилпротеазы API-1, ассоциированный с поверхностью антиген SAA-1, специфичный для взрослых секретируемый фактор Ха, ингибитор сериновой протеазы антикоагулянт AP, катепсин D-подобную аспарагиновую протеазу ARR-1 (обычно *Ancylostoma braziliense*; множество других паразитов, кожная мигрирующая личинка (CLM)); катепсин L-подобные протеазы, антиген 53/25 кДа, членов семейства 8 кДа, белок цистицерка с подобной маргинальному трипсину активностью TsAg5, белок онкосферы TSOL18, белок онкосферы TSOL45-1A, лактатдегидрогеназу A LDHA, лактатдегидрогеназу B LDHB (*Taenia solium*, цистицеркоз); антиген pp65, мембранный белок pp15, белок капсида-проксимального тегумента pp150, белок M45, ДНК-полимеразу UL54, геликазу UL105, гликопротеин gM, глико протеин gN, гликопротеин

Н, гликопротеин В gB, белок UL83, белок UL94, белок UL99 (цитомегаловирус (ЦМВ), цитомегаловирусная инфекция); капсидный белок С, премембранный белок ргМ, мембранный белок М, белок оболочки Е (домен I, домен II, домен II), белок NS1, белок NS2A, белок NS2B, белок NS3, белок NS4A, белок 2K, белок NS4B, белок NS5 (вирусы Денге (DEN-1, DEN-2, DEN-3 и DEN-4)-флавивирусы, лихорадка Денге); белок 39 кДа (*Dientamoeba fragilis*, диентамебиаз); предшественника дифтерийного токсина Tox, дифтерийный токсин DT, пилин-специфичную сортазу SrtA, белок осевого пилина SpaA, белок пилина кончика SpaC, белок минорного пилина SpaB, ассоциированный с поверхностью белок DIP 1281 (*Corynebacterium diphtheriae*, дифтерия); гликопротеин GP, нуклеопротеин NP, минорный белок матрикса VP24, основной белок матрикса VP40, активатор транскрипции VP30, кофактор полимеразы VP35, РНК-полимеразу L (вирус Эбола (EBOV), геморрагическая лихорадка Эбола); прионный белок (прион vCJD, вариант болезни Крейтцфельда-Якоба (vCJD, nvCJD)); белок системы UvrABC В, белок Flp1, белок Flp2, белок Flp3, белок TadA, рецептор гемоглобина HgbA, белок наружной мембраны TdhA, белок CpsRA, регулятор CpxR, белок Sap A, антиген 18 кДа, белок наружной мембраны NcaA, белок LspA, белок LspA1, белок LspA2, белок LspB, компонент наружной мембраны DsrA, лектин DltA, липопротеин Hlp, основной белок наружной мембраны OMP, белок наружной мембраны OmpA2 (*Haemophilus ducreyi*, шанкроид); аспартилпротеазу 1 Pep1, фосфолипазу В PLB, альфа-маннозидазу 1 AMN1, глюканозилтрансферазу GEL1, уреазу URE, белок матрикса пероксисом Pmp1, богатый пролином антиген Pra, реактивный белок Т-клеток человека TcrP (*Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii*, кокцидиоидомикоз); аллерген Tri r2, белок теплового шока 60 Hsp60, катин грибов Act, антиген Tri r2, антиген Tri r4, антиген Tri t1, белок IV, глицерол-3-фосфатдегидрогеназу Gpd1, осмосенсор HwSho1A, осмосенсор HwSho1B, гистидинкиназу HwHhk7B, аллерген Mala s 1, аллерген Mala s 11, тиоредоксин Trx Mala s 13, аллерген Mala f, аллерген Mala s (обычно виды *Trichophyton*, виды *Epidermophyton*, виды *Malassezia*, *Hortaea werneckii*, дерматофитоз); белок EG95, белок EG10, белок EG18, белок EgA31, белок EM18, антиген EPC1, антиген В, антиген 5, белок P29, белок 14-3-3, белок 8 кДа, миофилин, белок теплового шока 20 HSP20, гликопротеин GP-89, связывающий жирные кислоты белок FAPB (род *Echinococcus*, эхинококкоз); основной поверхностный белок 2 MSP2, основной поверхностный белок 4 MSP4, вариант MSP SGV1, вариант MSP SGV2, белок наружной мембраны OMP, белок наружной мембраны 19 OMP-19, основной антигенный белок MAPI, основной антигенный белок MAPI-2, основной антигенный белок MAP1 В, основной антигенный белок MAPI-3, Egm2510- кодирующий белок, белок GroEL, белок GroES, основной белок наружной мембраны 30 кДа, белок GE 100 кДа, белок GE 130 кДа, белок GE 160 кДа (род *Ehrlichia*, эрлихиоз); секретируемый антиген SagA, sagA-подобные белки SalA и SalB, адгезин коллагена Scm, поверхностные белки Fms1 (EbpA(fm), Fms5 (EbpB(fm), Fms9 (EpbC(fm) и Fms10, белок EbpC(fm), иммунозащитный гликопротеин G1 96 кДа (род *Enterococcus*, энтерококковая инфекция); геномный полипротеин, полимеразу 3D, вирусный капсидный белок VP1, вирусный капсидный белок VP2, вирусный капсидный белок VP3, вирусный капсидный белок VP4, протеазу 2A, протеазу 3C (род *Enterovirus*, энтеровирусная инфекция); белки наружной мембраны OM, белок наружной мембраны 60 кДа, антиген клеточной поверхности OmpA, антиген клеточной поверхности OmpB (sca5), белок наружной мембраны 134 кДа, белок наружной мембраны 31 кДа, белок наружной мембраны 29,5 кДа, белок клеточной поверхности SCA4, белок клеточной поверхности Adr1 (RP827), белок клеточной поверхности Adr2 (RP828), белок клеточной поверхности SCA1, инвазивный белок invA, белок клеточного деления fts, семейство белков секреции sec

О, белки вирулентности virB, tlyA, tlyC, парвулино подобный белок Pir, транслоказы пребелка SecA, поверхностный белковый антиген SPA 120 кДа, антиген комплекса 138 кДа, основной белок 100 кДа (белок I), внутрицитоплазматический белок D, защитный поверхностный белковый антиген SPA (*Rickettsia prowazekii*, эпидемический сыпной тиф); ядерные антигены вируса Эпштейна-Барр (EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-лидерный белок (EBNA-LP)), латентные мембранные белки (LMP-1, LMP-2A, LMP-2B), ранний антиген EBV-EA, мембранный антиген EBV-MA, вирусный капсидный антиген EBV-VCA, щелочную нуклеазу EBV-AN, гликопротеин H, гликопротеин gp350, гликопротеин gp110, гликопротеин gp42, гликопротеин gHgL, гликопротеин gB (вирус Эпштейна-Барр (EBV), (инфекционный мононуклеоз, вызванный вирусом Эпштейна-Барр); капсидный белок VP2, капсидный белок VP1, основной белок NS1 (парвовирус B19, инфекционная эритема (болезнь Штиккера)); антиген pp65, гликопротеин 105, основной капсидный белок, гликопротеин оболочки H, белок U51 (вирус герпеса человека 6 (HHV-6) и вирус герпеса человека 7 (HHV-7), внезапная экзантема); тиоредоксин-глутатионредуктазу TGR, катепсины L1 и L2, белок типа Кунитца KTM, лейцинаминопептидазу LAP, цистеинпротеиназу Fas2, сапониноподобный белок-2 SAP-2, тиоредоксинпероксидазы TPx, Prx-1, Prx-2, цистеинпротеазу катепсина I CL3, протеазу катепсина L CL1, фосфоглицераткиназу PGK, секреторный белок 27 кДа, белок HSP35альфа 60 кДа, глутатионтрансферазу GST, антиген тегумента 28,5 кДа, ТА 28,5 кДа, протеазу катепсина B3 CatB3, цистатин стефин-1 типа I, катепсин L5, катепсин L1g и катепсин B, связывающий жирные кислоты белок FABP, лейцинаминопептидазы LAP (*Fasciola hepatica* и *Fasciola gigantica*, фасциолез); прионный белок (прион FFI, спорадическая фатальная инсомния (FFI)); подобный гомологу аллергена яда белок VAL-1, преобладающий транскрипт личинок ALT-1, преобладающий транскрипт личинок ALT-2, тиоредоксинпероксидазу TPX, гомолог аллергена веспид VAN, тиоредоксинпероксидазу 2 TPX-2, антигенный белок SXP (пептиды N, N1, N2 и N3), ассоциированный с активацией белок-1 ASP-1, тиоредоксин TRX, транслутаминазу BmTGA, глутатион-S-трансферазы GST, миозин, гомолог аллергена веспид VAN, коллагеназу 175 кДа, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу GAPDH, кутикулярный коллаген Col-4, секретируемые личиночные кислые белки SLAP, хитиназу CHI-1, связывающий мальтозу белок MBP, гликолитический фермент фруктоза-1,6-бисфосфатаальдозазу Fba, тропомиозин TMY-1, специфичный для нематод генный продукт OvB20, онхоцистатин CPI-2, Сох-2 (надсемейство Filarioidea, филяриоз); фосфолипазу C PLC, термолабильный энтеротоксин B, компонент йота-токсина Ib, белок CPE1281, пируватферредоксиноксидоредуктазу, фактор элонгации G EF-G, перфринголизин O Pfo, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу GapC, фруктоза-бисфосфатаальдозазу Alf2, энтеротоксин *Clostridium perfringens* CPE, альфа-токсин AT, альфа-токсоид ATd, эпсилон-токсоид ETd, белок HP, большой цитотоксин TpeL, эндо-бета-N-ацетилглюкозаминидазу Naglu, фосфоглицеромутазу Pgm (*Clostridium perfringens*, пищевое отравление *Clostridium perfringens*), лейкотоксин IktA, адгезионный FadA, белок наружной мембраны RadD, высокомолекулярный аргининсвязывающий белок (род *Fusobacterium*, инфекция *Fusobacterium*); фосфолипазу C PLC, термолабильный энтеротоксин B, компонент йота-токсина Ib, белок CPE1281, пируватферредоксиноксидоредуктазу, фактор элонгации G EF-G, перфринголизин O Pfo, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу GapC, фруктозобисфосфатаальдозазу Alf2, энтеротоксин *Clostridium perfringens* CPE, альфа-токсин AT, альфа-токсоид ATd, эпсилон-токсоид ETd, белок HP, большой цитотоксин TpeL, эндо-бета-N-ацетилглюкозаминидазу Naglu, фосфоглицеромутазу Pgm (обычно *Clostridium perfringens*; другие виды *Clostridium*,

газовая гангрена (*Clostridial myonecrosis*)); липазу А, липазу В, пероксидазу Dec1 (*Geotrichum candidum*, геотрихоз); прионный белок (прион GSS, синдром Герстмана-Штраусслера-Шейнкера (GSS)); белки стенки цист CWP1, CWP2, CWP3, вариант поверхностного белка VSP, VSP1, VSP2, VSP3, VSP4, VSP5, VSP6, антиген 56 кДа, пируватферредоксиноксиоредуктазу PFOR, алкогольдегидрогеназу E ADHE, альфа-жиардин, альфа8-жиардин, альфа1-жиардин, бета-жиардин, цистеинпротеазы, глутатион-S-трансферазу GST, аргининдеиминазу ADI, фруктоза-1,6-бисфосфатаальдолазу FBA, антигены трофозойта *Giardia* GTA (GTA1, GTA2), орнитинкарбоксилтрансферазу OCT, белок, подобный асепбину исчерченных фибрилл SALP, уридинфосфорил-подобный белок UPL, альфа-тубулин, бета-тубулин (*Giardia intestinalis*, жиардиаз); членов семейства ABC-транспортёров (LolC, OppA, и PotF), предполагаемый трансмембранный белок системы высвобождения липопротеинов LolC/E, флагеллин FliC, белок внутриклеточной подвижности A Burkholderia BimA, бактериальный фактор элонгации-Tu EF-Tu, OmpA-подобный белок 17 кДа, boaA-кодирующий белок (*Burkholderia mallei*, can); циклофилин CyP, белок личинок третьей стадии GS24 24 кДа, продукты экскреции-секреции ESP (40, 80, 120 и 208 кДа) (*Gnathostoma spinigerum* и *Gnathostoma hispidum*, гнатостомиаз); белки пилины, минорная ассоциированная с пилином субъединица pilC, основная субъединица пилина и варианты pilE, pilS, белок вариации фаз porA, порин B PorB, белок TraD, антиген наружной мембраны *Neisseria* H.8, антиген 70 кДа, основной белок наружной мембраны PI, белки наружной мембраны PIA и PIB, W-антиген, поверхностный белок A NspA, трансферринсвязывающий белок TbpA, трансферринсвязывающий белок TbpB, PBP2, mtrR-кодирующий белок, ropA-кодирующий белок, пермеазу мембраны FbpBC, систему белков FbpABC, белки LbpAB, белок наружной мембраны Opa, транспортер наружной мембраны FetA, подавляемый железом регулятор MpeR (*Neisseria gonorrhoeae*, гонорея); белок наружной мембраны A OtpA, белок наружной мембраны C OmpC, белок наружной мембраны K 17 OmpK17 (*Klebsiella granulomatis*, паховая гранулема (донованоз)); фибронектинсвязывающий белок Sfb, фибронектин/фибриноген-связывающий белок FBP54, фибронектинсвязывающий белок FbaA, М-белок типа 1 Emm1, М-белок типа 6 Emm6, иммуноглобулинсвязывающий белок 35 Sib35, поверхностный белок R28 Spr28, супероксиддисмутаза SOD, C5a-пептидазу ScpA, антиген I/II AgI/II, адгезин AspA, G-родственный альфа2-макроглобулинсвязывающий белок GRAB, поверхностный фибриллярный белок M5 (*Streptococcus pyogenes*, стрептококковая инфекция, группа А); β-антиген С-белка, белки аргининдеиминазы, адгезин BibA, белок BPS 105 кДа, поверхностные антигены с, поверхностные антигены R, поверхностные антигены X, резистентный к трипсину белок R1, резистентный к трипсину белок R3, резистентный к трипсину белок R4, поверхностный иммуногенный белок Sip, поверхностный белок Rib, белок с богатыми лейцином повторами LtrG, белок с богатыми серином повторами Srr-2, альфа-антиген С-белка Vca, бета-антиген Bag, поверхностный антиген эпсилон, альфа-подобный белок ALP1, альфа-подобный белок ALP5, поверхностный антиген дельта, альфа-подобный белок ALP2, альфа-подобный белок ALP3, альфа-подобный белок ALP4, белок С-бета Vac (*Streptococcus agalactiae*, стрептококковая инфекция группы В); трансферринсвязывающий белок 2 Tbp2, фосфатазу P4, белок наружной мембраны P6, пептидогликанассоциированный липопротеин Pal, белок D, белок E, белок адгезии и проникновения Nap, белок наружной мембраны 26 Omp26, белок наружной мембраны P5 (фимбрин), белок наружной мембраны D15, белок наружной мембраны OmpP2, 5'-нуклеотидазу NucA, белок наружной мембраны P1, белок наружной мембраны P2, липопротеин наружной мембраны Pcr, липопротеин E, белок наружной мембраны P4, фукулокиназу FucK,

[Cu,Zn]-супероксиддисмутаза SodC, протеазу HtrA, белок O145, альфа-галактозилцерамид (Haemophilus influenzae, инфекция Haemophilus influenzae); полимеразу 3D, вирусный капсидный белок VP1, вирусный капсидный белок VP2, вирусный капсидный белок VP3, вирусный капсидный белок VP4, протеазу 2A, протеазу 3C (энтеровирусы, главным образом вирус Коксаки А и энтеровирус 71 (EV71), болезнь рук, стоп и полости рта (HFMD)); РНК-полимеразу L, белок L, гликопротеин Gn, гликопротеин Gc, нуклеокапсидный белок S, гликопротеин оболочки G1, нуклеопротеин NP, белок N, полипротеин М (вирус Сип Номбре, хантавирус, хантавирусный легочный синдром (HPS)); белок теплового шока HspA, белок теплового шока HspB, цитратсинтазу GltA, белок UreB, белок теплового шока Hsp60, активирующий нейтрофилы белок NAP, каталазу KatA, вакуолизирующий цитотоксин VacA, уреазу альфа UreA, уреазу бета UreB, белок Cpn10, белок groES, белок теплового шока Hsp10, белок MorV, ассоциированный с цитотоксичностью белок CAG 10 кДа, антиген 36 кДа, бета-лактамазу HcpA, бета-лактамазу HcpB (Helicobacter pylori, инфекция Helicobacter pylori); интегральные мембранные белки, склонные к агрегации белки, О-антиген, токсиновые антигены Stx2B, токсиновый антиген Stx1B, фрагмент антигена адгезии Int28, белок EspA, белок EspB, интимин, белок Tir, белок IntC300, белок Eae (Escherichia coli O157: H7, O111 и O104:H4, гемолитико-уремический синдром (HUS)); РНК-полимеразу L, белок L, гликопротеин Gn, гликопротеин Gc, нуклеокапсидный белок S, гликопротеин оболочки G1, нуклеопротеин NP, белок N, полипротеин М (семейство Bunyaviridae, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (HFRS)); гликопротеин G, белок матрикса М, нуклеопротеин N, белок слияния F, полимеразу L, белок W, белок С, фосфопротеин р, неструктурный белок V (хенипавирус (вирус Хендра и вирус Нинах), хенипавирусные инфекции); полипротеин, гликопротеин Gr2, поверхностный антиген гепатита А HBsAg, белок 2A, вирусный белок VP1, вирусный белок VP2, вирусный белок VP3, вирусный белок VP4, белок Р1 В, белок Р2А, белок Р3АВ, белок Р3D (вирус гепатита А, гепатит А); поверхностный антиген гепатита В HBsAg, коровый антиген гепатита В HbcAg, полимеразу, белок Hbx, средний поверхностный белок preS2, поверхностный белок L, большой S-белок, вирусный белок VP1, вирусный белок VP2, вирусный белок VP3, вирусный белок VP4 (вирус гепатита В (ВГВ), гепатит В); гликопротеин оболочки E1 gp32 gp35, гликопротеин оболочки E2 NS1 gp68 gp70, капсидный белок С, коровый белок Core, полипротеин, вирусный белок VP1, вирусный белок VP2, вирусный белок VP3, вирусный белок VP4, антиген G, белок NS3, белок NS5A, (вирус гепатита С, гепатит С); вирусный белок VP1, вирусный белок VP2, вирусный белок VP3, вирусный белок VP4, большой антиген гепатита дельта, малый антиген гепатита дельта (вирус гепатита D, гепатит D); вирусный белок VP1, вирусный белок VP2, вирусный белок VP3, вирусный белок VP4, капсидный белок E2 (вирус гепатита Е, гепатит Е); гликопротеин L UL1, урацил-ДНК-гликозилазу UL2, белок UL3, белок UL4, белок ДНК-репликации UL5, портовый белок UL6, белок созревания вириона UL7, ДНК-геликазу UL8, связывающийся с точкой начала репликации белок UL9, гликопротеин М UL10, белок UL11, щелочную экзонуклеазу UL12, сериновую-треониновую протеинкиназу UL13, белок тегумента UL14, терминазу UL15, белок тегумента UL16, белок UL17, капсидный белок VP23 UL18, основной капсидный белок VP5 UL19, мембранный белок UL20, белок тегумента UL21, глико протеин Н (UL22), тимидинкиназу UL23, белок UL24, белок UL25, капсидный белок Р40 (UL26, VP24, VP22A), гликопротеин В (UL27), белок ICP18.5 (UL28), основной ДНК-связывающий белок ICP8 (UL29), ДНК-полимеразу UL30, белок ядерного матрикса UL31, гликопротеин оболочки UL32, белок UL33, белок внутренней ядерной мембраны UL34, капсидный белок VP26 (UL35), большой белок

тегумента UL36, белок сборки капсида UL37, белок VP19C (UL38),
 рибонуклеотидредуктазу (большая субъединица) UL39, рибонуклеотидредуктазу (малая
 субъединица) UL40, белок тегумента/белок выключения генов хозяина вирионом VHS
 (UL41), фактор процессивности ДНК-полимер азы UL42, мембранный белок UL43,
 5 гликопротеин С (UL44), мембранный белок UL45, белки тегумента VP11/12 (UL46),
 белок тегумента VP13/14 (UL47), белок созревания вириона VP16 (UL48, альфа-TIF),
 белок оболочки UL49, dUTP-дифосфатазу UL50, белок тегумента UL51, белок комплекса
 ДНК-геликаза/праймаза UL52, гликопротеин К (UL53), белок регуляции транскрипции
 IE63 (ICP27, UL54), белок UL55, белок UL56, белок репликации вируса ICP22 (IE68, US1),
 10 белок US2, сериновую/треониновую протеинкиназу US3, гликопротеин G (US4),
 гликопротеин J (US5), гликопротеин D (US6), гликопротеин I (US7), гликопротеин E
 (US8), белок тегумента US9, белок капсида/тегумента US10, белок Vmw21 (US11), белок
 ICP47 (IE12, US12), основной активатор транскрипции ICP4 (IE175, RS1), убиквитинлигазу
 E3 ICP0 (IE110), связанный с латентностью белок 1 LRP1, связанный с латентностью
 15 белок 2 LRP2, фактор нейровирулентности RL1 (ICP34.5), ассоциированный с
 латентностью транскрипт LAT (вирус простого герпеса 1 и 2 (ВПГ-1 и ВПГ-2), простой
 герпес); белок теплового шока Hsp60, белок клеточной поверхности H1C,
 дипептидилпептидазу типа IV DppIV, М-антиген, белок 70 кДа, гистоноподобный белок
 17 кДа (*Histoplasma capsulatum*, гистоплазмоз); связывающий жирные кислоты и ретинол
 20 белок-1 FAR-1, тканевой ингибитор металлопротеиназы TIMP (TMP), цистеинпротеазу
 ACEY-1, цистеинпротеазу ACCP-1, поверхностный антиген Ac-16, секретируемый белок
 2 ASP-2, металлопротеазу 1 MTP-1, ингибитор аспартилпротеазы API-1,
 ассоциированный с поверхностью антиген SAA-1, ассоциированный с поверхностью
 антиген SAA-2, специфичный для взрослых секретируемый фактор Ха, ингибирующий
 25 сериновую протеазу антикоагулянт AP, катепсин D-подобную аспарагиновую протеазу
 ARR-1, глутатион S-трансферазу GST, аспарагиновую протеазу APR-1,
 ацетилхолинэстеразу AChE (*Ancylostoma duodenale* и *Necator americanus*, анкилостомоз);
 белок NS1, белок NP1, белок VP1, белок VP2, белок VP3 (бокавирус человека (HBoV),
 инфекция бокавирусом человека); основной поверхностный белок 2 MSP2, основной
 30 поверхностный белок 4 MSP4, вариант MSP SGV1, вариант MSP SGV2, белок наружной
 мембраны OMP, белок наружной мембраны 19 OMP-19, основной антигенный белок
 MAPI, основной антигенный белок MAPI-2, основной антигенный белок MAP 1B,
 основной антигенный белок MAPI-3, Egm2510-кодирующий белок, белок GroEL, белок
 GroES, основные белки наружной мембраны 30 кДа, белок GE 100 кДа, белок GE 130
 35 кДа, белок GE 160 кДа (*Ehrlichia ewingii*, эрлихиоз человека, вызванный *Ehrlichia ewingii*);
 основные поверхностные белки 1-5 (MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4, MSP5), белки
 системы секреции типа IV VirB2, VirB7, VirB11, VirD4 (*Anaplasma phagocytophilum*,
 гранулоцитарный анаплазмоз человека (HGA)); белок NS1, малый гидрофобный белок
 NS2, SH-белок, белок слияния F, гликопротеин G, белок матрикса М, белок матрикса
 40 M2-1, белок матрикса M2-2, фосфопротеин Р, нуклеопротеин N, полимеразу L
 (метапневмовирус человека (hMPV), инфекция метапневмовирусом человека); основной
 поверхностный белок 2 MSP2, основной поверхностный белок 4 MSP4, вариант MSP
 SGV1, вариант MSP SGV2, белок наружной мембраны OMP, белок наружной мембраны
 19 OMP-19, основной антигенный белок MAPI, основной антигенный белок MAPI-2,
 45 основной антигенный белок MAP1 B, основной антигенный белок MAPI-3, Egm2510-
 кодирующий белок, белок GroEL, белок GroES, основные белки наружной мембраны
 30 кДа, белок GE 100 кДа, белок GE 130 кДа, белок GE 160 кДа (*Ehrlichia chaffeensis*,
 моноцитарный эрлихиоз человека); белок репликации E1, регуляторный белок E2, белок

Е3, белок Е4, белок Е5, белок Е6, белок Е7, белок Е8, основной капсидный белок L1, минорный капсидный белок L2 (вирус папилломы человека (HPV), инфекция вирусом папилломы человека (HPV)); белок слияния F, гемагглютинин-нейраминидазу HN, гликопротеин G, белок матрикса М, фосфопротеин Р, нуклеопротеин N, полимеразу L (вирусы парагриппа человека (HPIV), инфекция вирусом парагриппа человека); гемагглютинин НА, нейраминидазу NA, нуклеопротеин NP, белок матрикса М1, белок матрикса М2, белок NS1, белок NS2 (белок NEP: белок экспорта из ядра), белок PA, белок PB1 (основной белок полимеразы 1), белок PB1-F2 и белок PB2 (семейство Orthomyxoviridae, вирус гриппа (острое респираторное заболевание)); геномный полипротеин, белок E, белок M, капсидный белок C (вирус японского энцефалита, японский энцефалит); токсин RTX, пили типа IV, основная субъединица пилуса PilA, факторы регуляции транскрипции PilS и PilR, белок сигма54, белки наружной мембраны (*Kingella kingae*, инфекция *Kingella kingae*); прионный белок (прион куру, куру); нуклеопротеин N, полимеразу L, белок матрикса Z, гликопротеин CP (вирус Лаоса, лихорадка Ласса); пептидогликанассоциированный липопротеин PAL, шаперон Cpn60 60 кДа (groEL, HspB), пилин типа IV PilE, белок наружной мембраны MIP, основной белок наружной мембраны MompS, цинковую металлопротеазу MSP (*Legionella pneumophila*, легионеллез (болезнь легионеров, лихорадка Понтиак)); нуклеазу P4, белок WD, рибонуклеотидредуктазу M2, поверхностный мембранный гликопротеин Pg46, цистеинпротеазу CP, регулируемый глюкозой белок 78 GRP-78, специфичный для стадии S антигеноподобный белок A2, АТФазу F1, бета-тубулин, белок теплового шока 70 Hsp70, KMP-11, гликопротеин GP63, белок BT1, нуклеозидгидролазу NH, белок клеточной поверхности B1, рибосомный белок P1-подобный белок P1, стерол-24-с-метилтрансферазу SMT, LACK-белок, гистон H1, белок SPB1, тиолспецифичный антиоксидант TSA, белковый антиген STI1, сигнальную пептидазу SP, гистон H2 B, поверхностный антиген PSA-2, цистеинпротеазу b Cpb (род *Leishmania*, лейшманиоз); основной мембранный белок I, богатый серином антиген 45 кДа, шаперонин GroES 10 кДа, HSP-антиген, аминоксононаноатсинтазу AONS, белковую рекомбиназу A RecA, ацетил/про пионил-КоА-карбоксилазу альфа, аланинрацемазу, шаперонин 2 60 кДа, ESAT-6-подобный белок EcxB (L-ESAT-6), белок Lsr2, белок ML0276, гепаринсвязывающий гемагглютинин HBHA, белок теплового шока 65 Hsp65, мусP1-или ML0041-кодирующий белок, htrA2-или ML0176-кодирующий белок, htrA4- или ML2659-кодирующий белок, gcr- или ML0379-кодирующий белок, clpC- или ML0235-кодирующий белок (*Mycobacterium leprae* и *Mycobacterium lepromatosis*, лепра); белок наружной мембраны LipL32, мембранный белок LIC10258, мембранный белок LP30, мембранный белок LIC12238, Отра-подобный белок Lsa66, поверхностный белок LigA, поверхностный белок LigB, основной белок наружной мембраны OmpL1, белок наружной мембраны LipL41, белок LigAni, поверхностный белок LcpA, белок адгезии LipL53, белок наружной мембраны UpL32, поверхностный белок Lsa63, флагеллин FlaB1, мембранный липопротеин LipL21, мембранный белок pL40, поверхностный адгезин лептоспиры Lsa27, белок наружной мембраны OmpL36, белок наружной мембраны OmpL37, белок наружной мембраны OmpL47, белок наружной мембраны OmpL54, ацилтрансферазу LpxA (род *Leptospira*, лептоспироз); предшественника листериолизина O Hly (LLO), ассоциированный с инвазией белок Iap (P60), листериолизин-регулирующий белок РПА, цинковую металлопротеазу Mpi, фосфатидилинозитол-специфичную фосфолипазу C PLC (PlcA, PlcB), О-ацетилтрансферазу Oat, пермеазу ABC-транспортера Im.G_1771, белок адгезии LAP, рецептор LAP Hsp60, адгезин LapB, гемолизин листериолизин O LLO, белок ActA, интерналин A In1A, белок In1B (*Listena*

monocytogenes, листериоз); наружный поверхностный белок A OspA, наружный поверхностный белок OspB, наружный поверхностный белок OspC, декоринсвязывающий белок A DbpA, декоринсвязывающий белок B DbpB, коровый белок флагеллярного филамента Fla 41 кДа, основной мембранный белок A BmpA (иммунодоминантный антиген P39), предшественника липопroteина наружной поверхности 22 кДа (антиген IPLA7), вариабельный поверхностный липопroteин vlsE (обычно *Borrelia burgdorferi* и другие виды *Borrelia*, болезнь Лайма (боррелиоз Лайма)); подобный гомологу аллергена яда белок VAL-1, преобладающий личиночный транскрипт ALT-1, преобладающий личиночный транскрипт ALT-2, тиоредоксинпероксидазу TPX, гомолог аллергена веспид VAN, тиоредоксинпероксидазу 2 TPX-2, антигенный белок SXP (пептиды N, N1, N2 и N3), ассоциированный с активацией белок-1 ASP-1, тиоредоксин TRX, трансглутаминазу BmTGA, глутатион-S-трансферазы GST, миозин, гомолог аллергена веспид VAN, коллагеназу 175 кДа, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу GAPDH, кутикулярный коллаген Col-4, секретируемые кислые личиночные белки SLAP, хитиназу CHI-1, связывающий мальтозу белок MBP, гликолитический фермент фруктоза-1,6-бисфосфатаальдозазу Fba, тропомиозин TMY-1, специфичный для нематод генный продукт OvB20, онхоцистатин CPI-2, белок Cox-2 (*Wuchereria bancrofti* и *Brugia malayi*, лимфатический филяриотоз (эlefантиаз)); гликопротеин GP, белок матрикса Z, полимеразу L, нуклеопротеин N (вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), лимфоцитарный хориоменингит); родственный тромбоспондину безымянный белок TRAP, поверхностный белок 2 спорозоида SSP2, антиген 1 апикальной мембраны AMA1, мембранный антиген роптрий RMA1, антиген с кислыми и основными повторами ABRA, проходящий в клетку белок PF, белок Pvs25, поверхностный белок 1 мерозоида MSP-1, поверхностный белок 2 мерозоида MSP-2, поверхностный антиген инфицированных кольцевыми формами эритроцитов RESA, антиген печеночной стадии 3 LSA-3, белок Eba-175, антиген 5 с сериновыми повторами SERA-5, белок CS циркумспорозоида, поверхностный белок 3 мерозоида MSP3, поверхностный белок 8 мерозоида MSP8, енолазу PF10, белок гепатоцитов и эритроцитов HEP17 17 кДа, мембранный белок 1 эритроцитов EMP1, белок Кбета, поверхностный белок мерозоида 4/5 MSP 4/5, белок теплового шока Hsp90, богатый глутаматом белок GLURP, поверхностный белок мерозоида 4 MSP-4, белок STARP, предшественника антигена, родственного белку циркумспорозоида CRA (род *Plasmodium*, малярия); нуклеопротеин N, ассоциированный с мембраной белок VP24, минорный нуклеопротеин VP30, кофактор полимеразы VP35, полимеразу L, белок матрикса VP40, гликопротеин оболочки GP (вирус Марбург, геморрагическая лихорадка Марбург (МНЕ)); белок С, белок матрикса М, фосфопротеин Р, неструктурный белок V, гликопротеин гемагглютинирина Н, полимеразу L, нуклеопротеин N, белок слияния F (вирус кори, корь); членов семейства ABC-транспортёров (LolC, OppA и PotF), предполагаемый трансмембранный белок системы высвобождения липопroteинов LolC/E, флагеллин FliC, белок внутриклеточной подвижности A Burkholderia BimA, бактериальный фактор элонгации-Tu EF-Tu, OmpA-подобный белок 17 кДа, BoaA-кодирующий белок, boaB-кодирующий белок (*Burkholderia pseudomallei*, мелиоидоз (болезнь Уитмора)); белки пилины, минорную ассоциированную с пилином субъединицу pilC, основную субъединицу пилина и варианты pilE, pilS, белок вариации фаз porA, порин B PorB, белок TraD, антиген наружной мембраны *Neisseria* H.8, антиген 70 кДа, основной белок наружной мембраны PI, белки наружной мембраны PIA и PIB, W-антиген, поверхностный белок A NspA, трансферринсвязывающий белок TbpA, трансферринсвязывающий белок TbpB, PBP2, mtrR-кодирующий белок, ponA-

кодирующий белок, пермеазу мембраны FbpBC, систему белков FbpABC, белки LbpAB, белок наружной мембраны Opa, переносчик наружной мембраны FetA, подавляемый железом регулятор MpeR, фактор H-связывающий белок fHbp, адгезин NadA, белок NhbA, репрессор FarR (*Neisseria meningitidis*, менингококковое заболевание); белок 66 кДа, белок 22 кДа (обычно *Metagonimus yokagawai*, метагонимоз); полярные белки трубочек (34, 75 и 170 кДа у *Glugea*, 35, 55 и 150 кДа у *Encerphalitozoon*), родственный кинезину белок, наибольшую субъединицу РНК-полимеразы II, сходную с интегральным мембранным белком YIPa, белок 1 против сайленсинга, фактор транскрипции теплового шока HSF, протеинкиназу, тимидинкиназу, NOP-2-подобный ядрышковый белок (Microsporidia phylum, микроспоририоз); CASP8 и FADD-подобный регулятор апоптоза, глутатионпероксидазу GPX1, РНК-геликазу NPH-II NPH2, каталитическую субъединицу поли(А)-полимеразы PAPL, основной белок оболочки Р43К, субъединицу 70 кДа раннего фактора транскрипции VETFS, субъединицу 82 кДа раннего фактора транскрипции VETFL, металлоэндопептидазу G1-типа, нуклеозидтрифосфатазу I NPH1, подобный белку репликации A28 MC134L, субъединицу 7 кДа РНК-полимеразы RPO7 (вирус контагиозного моллюска (MCV), контагиозный моллюск (MC)); белок матрикса М, фосфопротеин P/V, малый гидрофобный белок SH, нуклеопротеин N, белок V, гликопротеин слияния F, гемагглютинин-нейраминидазу HN, РНК-полимеразу L (вирус эпидемического паротита, эпидемический паротит); белки наружной мембраны OM, антиген клеточной поверхности OmpA, антиген клеточной поверхности OmpB (sca5), белок клеточной поверхности SCA4, белок клеточной поверхности SCA1, внутрицитоплазматический белок D, белок поверхностного слоя кристаллина SLP, защитный поверхностный белковый антиген SPA (*Rickettsia typhi*, мышинный тиф (эндемический тиф)); адгезин P1, адгезин P30, белок p116, белок P40, белок цитоскелета HMW1, белок цитоскелета HMW2, белок цитоскелета HMW3, MPN152-кодирующий белок, MPN426-кодирующий белок, MPN456-кодирующий белок, MPN-500-кодирующий белок (*Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma pneumonia*); NosA, зависимый от железа регуляторный белок, VarA, VarD, VarF, VarG, казеинолитическую протеазу, ассоциированный с кончиком филамента белок 43 кДа, белок P24, белок P61, белок 15 кДа, белок 56 кДа (обычно *Nocardia asteroides* и другие виды *Nocardia species*, нокардиоз); белок, подобный гомологу аллергена яда VAL-1, преобладающий личиночный транскрипт ALT-1, преобладающий личиночный транскрипт ALT-2, тиоредоксинпероксидазу TPX, гомолог аллергена веспид VАН, тиоредоксинпероксидазу 2 TPX-2, антигенный белок SXP (пептиды N, N1, N2 и N3), ассоциированный с активацией белок-1 ASP-1, тиоредоксин TRX, транслутаминазу BmTGA, глутатион-S-трансферазы GST, миозин, гомолог аллергена веспид VАН, коллагеназу 175 кДа, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу GAPDH, кутикулярный коллаген Col-4, секретируемые личиночные кислые белки SLAP, хитиназу CHI-1, связывающий мальтозу белок MBP, гликолитический фермент Фруктоза-1,6-бисфосфатальдотазу Fba, тропомиозин TMY-1, специфичный для нематод генный продукт OvB20, онхоцистатин CPI-2, ЦОГ-2 (*Onchocerca volvulus*, онхоцеркоз (речная слепота)); секретируемый гликопротеин 43 кДа, гликопротеин gp0, гликопротеин gp75, антиген Pb27, антиген Pb40, белок теплового шока Hsp65, белок теплового шока Hsp70, белок теплового шока Hsp90, белок P10, триозафосфатизомеразу TPI, N-ацетилглюкозаминсвязывающий лектин паракокцин, белок Pb28 28 кДа (*Parascoccidioides brasiliensis*, паракокцидиоидомикоз (южно-американский бластомикоз)); круципаиноподобную цистеиновую протеазу Pw28CCP 28 кДа (обычно *Paragonimus westermani* и другие виды *Paragonimus*, парагонимоз); белок наружной мембраны OmpH, белок наружной мембраны Omp28, белок PM1539, белок

PM0355, белок PM1417, репарационный белок MutL, белок VcbC, белок PM0305, формиатдегидрогеназу-N, белок PM0698, белок PM1422, ДНК-гиразу, липопротейн P1pE, адгезивный белок Cp39, рецептор системы захвата гема HasR, капсулярный белок 39 кДа, регулируемый железом OMP IROMP, белок наружной мембраны OmpA87, белок фимбрий Ptf, белок субъединицы фимбрий PtfA, трансферринсвязывающий белок TbpI, фермент эстеразу MesA, токсин *Pasteurella multocida* PMT, адгезивный белок Cp39 (род *Pasteurella*, пастереллез); филаментный гемагглютинин FhaB, аденилатциклазу CyaA, предшественника субъединицы 4 коклюшного токсина PtxD, предшественника пертактина Prn, субъединицу 1 токсина PtxA, белок Cpn60, белок brkA, предшественника субъединицы 2 коклюшного токсина PtxB, предшественника субъединицы 3 коклюшного токсина PtxC, предшественника субъединицы 5 коклюшного токсина PtxE, пертактин Prn, белок Fim2, белок Fim3 (*Bordetella pertussis*, коклюш (судорожный кашель)); «капсульный антиген F1, ассоциированный с вирулентностью антиген V, секретируемый эффекторный белок LcrV, V-антиген, протеазу наружной мембраны P1a, секретируемый эффекторный белок YopD, предполагаемую секретируемую протеинтирозинфосфатазу YopH, основную субъединицу комплекса иглы YscF, протеинкиназу YopO, предполагаемый белок аутопереносчик YapF, ABC-транспортер внутренней мембраны YbtQ (Irp7), предполагаемый сахарсвязывающий белок YPO0612, белок теплового шока 90 HtpG, предполагаемый белок сульфатазы YdeN, белок-носитель липопroteина наружной мембраны LolA, шаперон секреции YerA, предполагаемый липопротейн YPO0420, белок активатор гемолизина HpmB, рецептор наружной мембраны пестицина/иерсиниябактина Psn, секретируемый эффекторный белок YopE, секретируемый эффекторный белок YopF, секретируемый эффекторный белок YopK, белок наружной мембраны YopN, белок наружной мембраны YopM, предшественника коагулазы/фибринолизина Pla;» (*Yersinia pestis*, чума); белок PhpA, поверхностный адгезин PsaA, пневмолизин Ply, АТФ-зависимую протеазу Clp, липоатпротеинлигазу Lp1A, заякоренный на поверхности клеточной стенки белок psrP, сортазу SrtA, глутамил-ТРНК-синтазу GltX, холинсвязывающий белок A CbpA, пневмококковый поверхностный белок A PspA, пневмококковый поверхностный белок C PspC, 6-фосфоглюконатдегидрогеназу Gnd, связывающий железо белок PiaA, муреингидролазу LytB, протеон LytC, протеазу A1 (*Streptococcus pneumoniae*, пневмококковая инфекция); основной поверхностный белок B, кексиноподобную протеазу KEX1, белок A12, антиген P55 55 кДа, основной поверхностный гликопротеин Msg (*Pneumocystis jirovecii*, плазматочная пневмония (PCP)); геномный полипротеин, полимеразу 3D, вирусный капсидный белок VP1, вирусный капсидный белок VP2, вирусный капсидный белок VP3, вирусный капсидный белок VP4, протеазу 2A, протеазу 3C (вирус полиомиелита, полиомиелит); белок Nfa1, эксендин-3, секреторную липазу, катепсин B-подобную протеазу, цистеинпротеазу, катепсин, пероксиредоксин, белок Cry1Ac (обычно *Naegleria fowleri*, первичный амёбный менингоэнцефалит (РАМ)); агнопротеин, большой Т-клеточный антиген, малый Т-клеточный антиген, основной капсидный белок VP1, минорный капсидный белок Vp2 (вирус JC, прогрессирующая мультифокальная лейкоэнцефалопатия); белок низкого ответа на кальций E LCrE, наружный хламидиальный белок N CopN, сериновую/треониновую протеинкиназу PknD, S-малонилтрансферазу ацил-переносящего белка FabD, связывающий одонитевую ДНК белок Ssb, основной белок наружной мембраны MOMP, белок наружной мембраны 2 Omp2, семейство полиморфных мембранных белков (Pmp1, Pmp2, Pmp3, Pmp4, Pmp5, Pmp6, Pmp7, Pmp8, Pmp9, Pmp10, Pmp11, Pmp12, Pmp13, Pmp14, Pmp15, Pmp16, Pmp17, Pmp18, Pmp19, Pmp20, Pmp21) (*Chlamydomonas psittaci*, орнитоз); белок наружной мембраны

P1, белок теплового шока B HspB, пептид ABC-транспортера, GTP-связывающий белок, белок IcmB, рибонуклеазу R, фосфатазу SixA, белок DsbD, белок наружной мембраны TolC, ДНК-связывающий белок PhoB, АТФазу DotB, белок теплового шока B HspB, мембранный белок ComI, белок 28 кДа, ДНК-3-метиладенингликозидазу I, белок

5 наружной мембраны OmpH, белок наружной мембраны AdaA, Т-белок системы отщепления глицина (*Coxiella burnetii*, Q-риккетсиоз); нуклеопротеин N, большой структурный белок L, фосфопротеин P, белок матрикса M, гликопротеин G (вирус бешенства, бешенство); белок слияния F, нуклеопротеин N, белок матрикса M, белок матрикса M2-1, белок матрикса M2-2, фосфопротеин P, малый гидрофобный белок

10 SH, основной поверхностный гликопротеин G, полимеразу L, неструктурный белок 1 NS1, неструктурный белок 2 NS2 (респираторно-синцитиальный вирус (RSV), инфекция респираторно-синцитиальным вирусом); геномный полипротеин, полимеразу 3D, вирусный капсидный белок VP1, вирусный капсидный белок VP2, вирусный капсидный белок VP3, вирусный капсидный белок VP4, протеазу 2A, протеазу 3C (риновирус,

15 риновирусная инфекция); белок наружной мембраны OM, антиген клеточной поверхности OtrA, антиген клеточной поверхности OmpB (sca5), белок клеточной поверхности SCA4, белок клеточной поверхности SCA1, белок PS120, внутрицитоплазматический белок D, антиген защитного поверхностного белка SPA (род *Rickettsia*, риккетсиозная инфекция); белки наружной мембраны OM, антиген

20 клеточной поверхности OtrA, антиген клеточной поверхности OmpB (sca5), белок клеточной поверхности SCA4, белок клеточной поверхности SCA1, внутрицитоплазматический белок D (*Rickettsia akari*, риккетсиоз); гликопротеин оболочки GP, полимеразу L, нуклеопротеин N, неструктурный белок NSS (вирус лихорадки долины Рифт, лихорадка долины Рифт (RVF)); белки наружной мембраны OM, антиген

25 клеточной поверхности OtrA, антиген клеточной поверхности OmpB (sca5), белок клеточной поверхности SCA4, белок клеточной поверхности SCAT, внутрицитоплазматический белок D (*Rickettsia rickettsii*, пятнистая лихорадка Скалистых гор (RMSF)); «неструктурный белок 6 NS6, неструктурный белок 2 NS2, промежуточный капсидный белок VP6, внутренний капсидный белок VP2, неструктурный белок 3 NS3,

30 РНК-зависимую РНК-полимеразу L, белок VP3, неструктурный белок 1 NS1, неструктурный белок 5 NS5, наружный капсидный гликопротеин VP7, неструктурный гликопротеин 4 NS4, наружный капсидный белок VP4» (ротавирус, ротавирусная инфекция); полипротеин P200, гликопротеин E1, гликопротеин E2, белок NS2, капсидный белок C (вирус краснухи, краснуха); шаперонин GroEL (MorA),

35 инозитолфосфатфосфатазу SopB, белок теплового шока HsIU, шаперонный белок DnaJ, белок TviB, белок IroN, флагеллин FliC, белок инвазии SipC, гликопротеин gp43, белок наружной мембраны LamB, белок наружной мембраны PagC, белок наружной мембраны TolC, белок наружной мембраны NmpC, белок наружной мембраны FadL, транспортный белок SadA, трансферазу WgaP, эффекторные белки SifA, SteC, SseL, SseJ и SseF (род

40 *Salmonella*, сальмонеллез); белок 14, неструктурный белок NSTb, неструктурный белок NS8a, белок 9b, белок 3a, нуклеопротеин N, неструктурный белок NS3b, неструктурный белок NS6, белок 7a, неструктурный белок NS8b, мембранный белок M, малый мембранный белок оболочки EsM, полипротеин репликазы 1a, гликопротеин шипа S, полипротеин репликазы 1 ab; (коронавирус SARS, SARS (тяжелый острый респираторный

45 синдром)); сериновую протеазу, антиген 1 атипичного саркоптеза 1 ASA1, глутатион-S-трансферазы GST, цистеиновую протеазу, сериновую протеазу, аполипопротеин (*Sarcoptes scabiei*, чесотка); глутатион-S-трансферазы GST, параамиозин, гемоглобиназу SM32, основной антиген яйцеклеток, связывающий жирные кислоты белок Sm14 14

кДа, основной личиночный поверхностный антиген Р37, антиген тегумента 22,6 кДа, калпаин CANP, трифосфатизомеразу Tim, поверхностный белок 9В, наружный капсидный белок VP2, интегральный мембранный белок Sm23 23 кДа, Cu/Zn-супероксиддисмутазу, гликопротеин Gr, миозин (род *Schistosoma*, шистосоматоз (бильгарциоз)); шаперонин 60 кДа, специфичный для типа антиген 56 кДа, пируватфосфатдикиназу, 4-гидроксibenзоатоктапренилтрансферазу (*Orientia tsutsugamushi*, клещевой тропический тиф); дегидрогеназу GuaB, белок инвазии Spa32, инвазии IpaA, инвазии IpaB, инвазии IpaC, инвазии IpaD, инвазии IpaH, инвазии IpaJ (род *Shigella*, шигеллез (бактериальная дизентерия)); белок P53, гомолог белка вириона US 10, регулятор транскрипции IE63, трансактиватор транскрипции IE62, протеазу P33, белок альфа-трансиндуцирующего фактора 74 кДа, дезоксиуридин-5'-трифосфатнуклеотидгидролазу, трансактиватор транскрипции IE4, гомолог мембранного белка UL43, гомолог ядерного фосфопротеина UL3, гомолог ядерного белка UL4, связывающийся с точкой начала репликации белок, мембранный белок 2, фосфопротеин 32, белок 57, фактор процессивности ДНК-полимеразы, порталый белок 54, ДНК-праймазу, гомолог белка тегумента UL14, гомолог белка тегумента UL21, гомолог белка тегумента UL55, гомолог субъединицы тройной терминазы UL33, гомолог субъединицы тройной терминазы UL15, капсидсвязывающий белок 44, белок упаковки вириона 43 (вирус ветряной оспы (VZV), Shingles (Herpes zoster)); укороченный гомолог 3-бета-гидрокси-5-ен-стероиддегидрогеназы, мембранный белок вириона A13, белок A19, белок A31, укороченный гомолог белка A35, гомолог белка A37.5, белок A47, белок A49, белок A51, семафориноподобный белок A43, ингибитор сериновой протеазы 1, ингибитор сериновой протеазы 2, ингибитор сериновой протеазы 3, белок A6, белок B15, белок C1, белок C5, белок C6, белок F7, белок F8, белок F9, белок F11, белок F14, белок F15, белок F16 (*Variola major* или *Variola minor*, натуральная оспа (оспа)); адгезин/гликопротеин gp70, протеазы (*Sporothrix schenckii*, споротрихоз); связывающий железо гема белок IsdB, коллагеновый адгезин Spa, фактор агглютинации A ClfA, белок MecA, фибронектинсвязывающий белок A FnbA, энтеротоксин типа A EntA, энтеротоксин типа B EntB, энтеротоксин типа C EntC1, энтеротоксин типа C EntC2, энтеротоксин типа D EntD, энтеротоксин типа E EntE, токсин-1 синдрома токсического шока TSST-1, стафилокиназу, пенициллинсвязывающий белок 2a PBP2a (MecA), секреторный антиген SssA (род *Staphylococcus*, стафилококковое пищевое отравление); связывающий железо гема белок IsdB, коллагеновый адгезин Spa, фактор агглютинации A ClfA, белок MecA, фибронектинсвязывающий белок A FnbA, энтеротоксин типа A EntA, энтеротоксин типа B EntB, энтеротоксин типа C EntC1, энтеротоксин типа C EntC2, энтеротоксин типа D EntD, энтеротоксин типа E EntE, токсин-1 синдрома токсического шока TSST-1, стафилокиназу, пенициллинсвязывающий белок 2a PBP2a (MecA), секреторный антиген SssA (род *Staphylococcus*, стафилококковая инфекция); антиген Ss-IR, антиген NIE, стронгиластацин, Na⁺-K⁺-АТФазу Sseat-6, тропомизин SsTmy-1, белок LEC-5, антиген P5 41 кДа, личиночный белок 41 кДа, личиночный белок 31 кДа, личиночный белок 28 кДа (*Strongyloides stercoralis*, стронгилоидоз); глицерофосфодиэфирфосфодиэстеразу GlpQ (Gpd), белок наружной мембраны TmpB, белок Trp92, антиген TrpF1, содержащий повторы белок Trp, содержащий повторы белок F TrpF, содержащий повторы белок G TrpG, содержащий повторы белок I TrpI, содержащий повторы белок J TrpJ, содержащий повторы белок K TrpK, мембранный белок трепонем A TmpA, липопротеин, Trp15 15 кДа, мембранный антиген 47 кДа, миниферритин TrpF1, адгезин Trp0751, липопротеин TP0136, белок TrpN17, белок TrpN47, белок наружной мембраны TP0136, белок наружной мембраны TP0155, белок наружной мембраны TP0326, белок наружной мембраны

TP0483, белок наружной мембраны TP0956 (*Treponema pallidum*, сифилис); катепсин L-подобные протеазы, антиген 53/25 кДа, членов семейства 8 кДа, белок цистицерка с подобной маргинальному трипсину активностью TsAg5, белок онкосфер TSOL18, белок онкосфер TSOL45-1A, лактатдегидрогеназу A LDHA, лактатдегидрогеназу B LDHB
 5 (род *Taenia*, тениоз); столбнячный токсин TetX, столбнячный токсин C TTC, белок S-слоя 140 кДа, бета-субъединицу флавопротеина CT3, фосфолипазу (лецитиназу), белок переносчик фосфора HPr (*Clostridium tetani*, столбняк); геномный полипротеин, белок E, белок M, капсидный белок C (вирус клещевого энцефалита (TBEV), клещевой энцефалит); антиген 58 кДа, антигены 68 кДа, экскреторный-секреторный антиген
 10 личинок *Toxosara* TES, гликопротеин 32 кДа, гликопротеин TES-70, гликопротеин GP31, экскреторный-секреторный антиген TcES-57, антиген околокишечной жидкости Pe, растворимые антигены экстракта Ex, экскреторные-секреторные личиночные антигены ES, антиген TES-120, полипротеиновый аллерген TBA-1, катепсин L-подобную цистеиновую протеазу c-cpl-1, белок 26 кДа (*Toxosara canis* или *Toxosara cati*, токсокароз
 15 (глазная форма синдрома мигрирующей личинки (OLM) и висцеральная форма синдрома мигрирующей личинки (VLM))); белки микронем (MIC1, MIC2, MIC3, MIC4, MIC5, MIC6, MIC7, MIC8), белок роптрий Rop2, белки роптрий (Rop1, Rop2, Rop3, Rop4, Rop5, Rop6, Rop7, Rop16, Rop17), белок SRI, поверхностный антиген P22, основной антиген p24, основной поверхностный антиген p30, белки плотных гранул (GRA1, GRA2, GRA3,
 20 GRA4, GRA5, GRA6, GRA7, GRA8, GRA9, GRA10), антиген 28 кДа, поверхностный антиген SAG1, 8A02-родственный антиген, нуклеозидтрифосфатазу 1, нуклеозидтрифосфатазу 2, белок Stt3, белок, содержащий HesB-подобный домен, ромбоид-подобную протеазу 5, токсомепсин 1 (*Toxoplasma gondii*, токсоплазмоз); секретируемый гликопротеин 43 кДа, секретируемый гликопротеин 53 кДа, парамиозин,
 25 антиген Ts21, антиген Ts87, антиген p46000, TSL-1-антигены, кавеолин-1 CAV-1, личиночный антиген у новорожденных 49 кДа, гомолог просапозина, сериновую протеазу, ингибитор сериновой протеазы, гликопротеин Gp45 45 кДа (*Trichinella spiralis*, трихинеллез); Myb-подобные факторы транскрипции (Myb1, Myb2, Myb3), белок адгезии AP23, белок адгезии AP33, белок адгезии AP33-3, адгезины AP51, адгезии AP65, белок
 30 адгезии AP65-1, альфа-актинин, кинезинассоциированный белок, тенеурин, протеазу 62 кДа, субтилизиноподобную сериновую протеазу SUB1, ген 3 цистеиновой протеазы 3 CP3, альфа-енолазу Enol, цистеиновую протеазу CP30, белки теплового шока (Hsp70, Hsp60), иммуногенный белок P270 (*Trichomonas vaginalis*, трихомоноз); бета-тубулин, белок 47 кДа, секреторную лейкоцитарноподобную протеазу-1 SLP-1, белок TT50 50
 35 кДа, антиген 17 кДа, белок 43/47 кДа (*Trichuris trichiura*, трихоуроз (инфекция власоглавом)); белок ESAT-6 (EsxA), фильтрующий антиген EsxB 10 кДа, секретируемый антиген 85-B FBPB, фибронектинсвязывающий белок A FbpA (Ag85A), сериновую протеазу PerA, белок PPE-семейства PPE18, фибронектинсвязывающий белок D FbpD, иммуногенный белок MPT64, секретируемый белок MPT51, каталаза-
 40 пероксидаза-пероксинитридазу T KATG, периплазматический фосфатсвязывающий липопротеин PSTS3 (PBP-3, Phos-1), регулируемый железом гепаринсвязывающий гемагглютинин Hbha, белок PPE-семейства PPE14, белок PPE-семейства PPE68, белок Mtb72F, белок Ara, иммуногенный белок MPT63, периплазматический фосфатсвязывающий липопротеин PSTS1 (PBP-1), молекулярный шаперон DnaK,
 45 липопротеин клеточной поверхности Mpt83, липопротеин P23, белок пермеазы системы транспорта фосфата pstA, антиген 14 кДа, фибронектинсвязывающий белок C FbpC1, аланиндегидрогеназу TB43, глутаминсинтетазу 1, белок ESX-1, белок CFP10, белок TB10.4, белок MPT83, белок Mtb12, белок Mtb8, Rpf-подобные белки, белок Mtb32,

белок MTB39, кристаллин, белок теплового шока HSP65, белок PST-S (обычно *Mycobacterium tuberculosis*, туберкулез); белок наружной мембраны FobA, белок наружной мембраны FobB, локус внутриклеточного роста IgIC1, локус внутриклеточного роста IgIC2, аминотрансферазу Wbt1, шаперонин GroEL, основной мембранный белок TUL4 17 кДа, липопротейн LpnA, белок семейства хитиназы 18, изоцитратдегидрогеназу, белок семейства Nif3, белок гликозилирования пилей типа IV, белок наружной мембраны tolC, белок FAD-связывающего семейства, мультимерный белок наружной мембраны пилей типа IV, двукомпонентный сенсорный белок KdpD, белок шаперон DnaK, белок TolQ (*Francisella tularensis*, туляремия); «МВ-антиген, уреазу, белок GyrA, белок GyrB, белок PagC, белок PagE, липидассоциированные мембранные белки LAMP, тимидинкиназу ТК, фосфолипазу PL-A1, фосфолипазу PL-A2, фосфолипазу PL-C, экспрессируемый на поверхности антиген 96 кДа;» (*Ureaplasma urealyticum*, инфекция *Ureaplasma urealyticum*); неструктурный полипротеин, структурный полипротеин, капсидный белок CP, белок E1, белок E2, белок E3, протеазу P1, протеазу P2, протеазу P3 (вирус венесуэльского энцефалита лошадей, венесуэльский энцефалит лошадей); гликопротеин GP, белок матрикса Z, полимеразу L, нуклеопротеин N (вирус Гуанарито, венесуэльская геморрагическая лихорадка); полипротеин, белок E, белок M, капсидный белок C, протеазу NS3, белок NS1, белок NS2A, белок AS2B, белок NS4A, белок NS4B, белок NS5 (вирус Западного Нила, лихорадка Западного Нила); капсидный белок CP, белок E1, белок E2, белок E3, протеазу P2 (вирус западного энцефалита лошадей, западный энцефалит лошадей); геномный полипротеин, белок E, белок M, капсидный белок C, протеазу NS3, белок NS1, белок NS2A, белок AS2B, белок NS4A, белок NS4B, белок NS5 (вирус желтой лихорадки, желтая лихорадка); предполагаемый Yop-нацеливающий белок YobB, эффекторный белок YopD, эффекторный белок YopE, белок YopH, эффекторный белок YopJ, белок транслокации YopK, эффекторный белок YopT, белок YpkA, белок биосинтеза жгутиков FlhA, пептидазу M48, систему выкачивания калия KefA, регулятор транскрипции RovA, адгезин Ifp, белок транслокации LcrV, белок PcrV, инвазии Inv, белок наружной мембраны OmpF-подобный порин, адгезии YadA, протеинкиназу C, фосфолипазу C1, белок PsaA, подобный маннозилтрансферазе белок WbyK, белок YscU, антиген YPMa (*Yersinia pseudotuberculosis*, инфекция *Yersinia pseudotuberculosis*); эффекторный белок YopB, шаперонин 60 кДа, белок WbcP, тирозиновую протеинфосфатазу YopH, белок YopQ, энтеротоксин, галактозидпермеазу, редуктазу NrdE, белок YasN, инвазии Inv, адгезии YadA, порин наружной мембраны F OmpF, белок UspA1, белок EibA, белок Hia, белок клеточной поверхности Ail, шаперон SycD, белок LcrD, белок LcrG, белок LcrV, белок SycE, белок YopE, регуляторный белок TyeA, белок YopM, белок YopN, белок YopO, белок YopT, белок YopD, протеазу ClpP, белок MyfA, белок FliA и белок PsaA (*Yersinia enterocolitica*, иерсиниоз) (в скобках указан конкретный патоген или семейство патогенов, из которых происходит (ят) антиген (ы), и инфекционное заболевание, с которым ассоциирован патоген).

В особенно предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения патогенный антиген выбран из

а) антигена р24 ВИЧ, белков оболочки ВИЧ (Gp120, Gp41, Gp160), полипротеина GAG, белка отрицательного фактора Nef, трансактиватора транскрипции Tat, если инфекционное заболевание представляет собой ВИЧ, предпочтительно инфекцию вирусом иммунодефицита человека;

б) основного белка наружной мембраны МОМР, предполагаемого белка наружной мембраны РМРС, белка комплекса наружной мембраны В ОтсВ, белков теплового шока Hsp60 HSP10, белка IncA, белков системы секреции типа III, белка малой цепи

рибонуклеотидредуктазы NrdB, плазмидного белка Pgp3, хламидиального наружного белка N CopN, антигена CT521, антигена CT425, антигена CT043, антигена TC0052, антигена TC0189, антигена TC0582, антигена TC0660, антигена TC0726, антигена TC0816, антигена TC0828, если инфекционное заболевание представляет собой

5 инфекцию, вызванную *Chlamydia trachomatis*;

с) антигена pp65, мембранного белка pp15, белка капсида-проксимального тегумента pp150, белка M45, ДНК-полимеразы UL54, геликазы U1105, гликопротеина gM, гликопротеина gN, гликопротеина H, гликопротеина B gB, белка UL83, белка UL94, белка UL99, если инфекционная болезнь представляет собой цитомегаловирусную

10 инфекцию, предпочтительно инфекцию цитомегаловирусом (ЦМВ);

д) капсидного белка С, премембранного белка ргМ, мембранного белка М, белка оболочки Е (домена I, домена II, домена III), белка NS1, белка NS2A, белка NS2B, белка NS3, белка NS4A, белка 2K, белка NS4B, белка NS5, если инфекционное заболевание представляет собой лихорадку Денге, предпочтительно инфекцию вирусами Денге

15 (DEN-1, DEN-2, DEN-3 и DEN-4) - флавивирусами;

е) поверхностного антигена гепатита В HBsAg, основного антигена гепатита В HbcAg, полимеразы, белка Hbx, промежуточного поверхностного белка preS2, поверхностного белка L, большого белка S, вирусного белка VP1, вирусного белка VP2, вирусного белка VP3, вирусного белка VP4, если инфекционная болезнь представляет собой гепатит

20 В, предпочтительно инфекцию вирусом гепатита В (ВГВ);

ф) репликационного белка E1, регуляторного белка E2, белка E3, белка E4, белка E5, белка E6, белка E7, белка E8, основного белка капсида L1, минорного белка капсида L2, если инфекционное заболевание представляет собой вирус папилломы человека (ВПЧ), предпочтительно инфекцию вирусом папилломы человека (ВПЧ);

25 г) слитого белка F, гемагглютинин-нейраминидазы HN, гликопротеина G, матричного белка M, фосфопротеина Р, нуклеопротеина N, полимеразы L, если инфекционное заболевание представляет собой инфекцию вирусом парагриппа человека, предпочтительно инфекцию вирусами парагриппа человека (HPIV);

h) гемагглютинина (HA), нейраминидазы (NA), нуклеопротеина (NP), белка M1, белка M2, белка NS1, белка NS2 (белка NEP: белок ядерного экспорта), белка PA, белка PB1 (основной белок 1 полимеразы), белка PB1-F2 и белка PB2 (семейство Orthomyxoviridae, вирус гриппа (острое респираторное заболевание));

35 i) нуклеопротеина N, большого структурного белка L, фосфопротеина Р, матричного белка М, гликопротеина G, если инфекционное заболевание представляет собой бешенство, предпочтительно инфекцию вирусом бешенства;

j) слитого белка F, нуклеопротеина N, матричного белка М, матричного белка M2-1, матричного белка M2-2, фосфопротеина Р, малого гидрофобного белка SH, основного поверхностного гликопротеина G, полимеразы L, неструктурного белка 1 NS1, неструктурного белка 2 NS2, если инфекционное заболевание представляет собой

40 респираторно-синцитиальную вирусную инфекцию, предпочтительно инфекцию респираторно-синцитиальным вирусом (RSV);

к) секреторного антигена SssA (род *Staphylococcus*, стафилококковое пищевое отравление); секреторного антигена SssA (род *Staphylococcus*, например, *S. aureus*, стафилококковая инфекция); молекулярного шаперона DnaK, липопротеина клеточной

45 поверхности Mpt83, липопротеина P23, пермеазного белка транспортной системы фосфата pstA, антигена 14 кДа, фибронектинсвязывающего белка С FbpCl, аланиндегидрогеназы TB43, глутаминсинтетазы 1, белка ESX-1, белка CFP10, белка TB10.4, белка MPT83, белка MTB12, белка MTB8, Rpf-подобных белков, белка

MTB32, белка MTB39, кристаллина, белка теплового шока HSP65, белка PST-S, если инфекционное заболевание представляет собой туберкулез, предпочтительно инфекцию *Mycobacterium tuberculosis*;

или геномного полипротеина, белка E, белка M, капсидного белка C, протеазы NS3, белка NS1, белка NS2A, белка AS2B, белка NS4A, белка NS4B, белка NS5, если инфекционное заболевание представляет собой желтую лихорадку, предпочтительно инфекцию вирусом желтой лихорадки.

Примеры

Следующие примеры предназначены для дополнительной иллюстрации настоящего изобретения. Они являются лишь иллюстративными и не предназначены для ограничения объема предмета настоящего изобретения.

Пример 1: Получение композиций согласно настоящему изобретению

Для следующих примеров получали последовательность ДНК, кодирующую люциферазу *Gaussia princeps* (GpLuc), и применяли для последующих реакций транскрипции РНК в условиях *in vitro*. Полученные конструкции иРНК применяли для дальнейших экспериментов в условиях *in vitro* и в условиях *in vivo*. Ниже представлены соответствующие аминокислотные последовательности и последовательности иРНК GpLuc и PpLuc, а также подробная информация об этапах получения.

Аминокислотная последовательность GpLuc (SEQ ID NO: 11):

MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDLDADRGKLPGKKLPLEV
LKEMEANARKAGCTRGCLICLSHIKCTPKMKKFIPGRCHTYEGDKESAQGGIGEAIVDIP
EIPGFKDLEPMEQFIAQVDLCVDCTTGCLKGLANVQCSDLLKKWLPQRCATFASKIQGQ
VDKIKGAGGD

Последовательность иРНК GpLuc (SEQ ID NO: 12), также обозначенная в настоящем документе R2851:

GGGGCGCUGCCUACGGAGGUGGCAGCCAUCUCCUUCUCGGCAUCAAGCUUAC
 CAUGGGCGUGAAGGUCCUGUUCGCCCUCaucUGCAUCGCCGUGGCGGAGGCCAAG
 CCCACCGAGAACAAACGAGGACUUAACAUCGUGGCCGUCGCCAGCAACUUCGCCA
 5 CCACGGACCUGGACGCGGACCGGGGGAAGCUGCCGGGCAAGAAGCUCCCCCUGGA
 GGUGCUGAAGGAGAUGGAGGCCAACGCCCCGAAGGCCGGGUGCACCCGGGGCUGC
 CUCAUCUGCCUGUCCCAUCAAGUGCACCCCCAAGAUGAAGAAGUUCAUCCCCG
 GGCGCUGCCACACCUACGAGGGCGACAAGGAGAGCGCGCAGGGCGGGAUCGGCGA
 10 GGCCAUCGUGGACAUCCCGGAGAUCCCCGGGUUCAAGGACCUGGAGCCCAUGGAG
 CAGUUCAUCGCCCAGGUCGACCUCUGCGUGGACUGCACGACCGGCUGCCUGAAGG
 GGCUGGCCAACGUGCAGUGCUCGACCUCUUGAAGAAGUGGCUGCCCCAGCGGUG
 CGCCACCUUCGCGAGCAAGAUCAGGGCCAGGUCGACAAGAUCAAGGGCGCCGGG
 15 GGCGACUGAGGACUAGUGCAUCACAUUUAAAAGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAA
 UAAGAGAAAGAAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUCaucUCUUUUUCUUUUUCGUU
 GGUGUAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAAACAUAAAUUCUUUAAUCAUUUUGCC
 20 UCUUUUCUCUGUGCUUCAAUUAAUAAAAAAUGGAAAGAACCUAGAUCUAAAAAA
 AA
 AAAAAUGCAUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGCUCUUUCAG
 AGCCACCAGAAUU

Аминокислотная последовательность PpLuc (SEQ ID NO: 18):

MEDAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAFTDAHIEVDITYAE
 YFEMSVRLAEAMKRYGLNTNHRIVVCSENSLQFFMPVLGALFIGVAVAPANDIYNEREL
 30 LNSMGISQPTVVVFSKKGLQKILNVQKKLPPIQKIIMDSKTDYQGFQSMYTFVTSHLPPG
 FNEYDFVPESFDRDKTIALIMNSSGSTGLPKGVALPHRTACVRFSHARDPIFGNQIIPDTAI
 LSVVPFHHGFGMFTTLGYLICGFRVVLMYRFEEELFLRSLQDYKIQSALLVPTLFSFFAKS
 TLIDKYDLSNLHEIASGGAPLSKEVGEAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSAILITPEGDDKP
 35 GAVGKVVPFFEAKVVDLDTGKTLGVNQRGELCVRGPMIMSGYVNNPEATNALIDKDG
 WLHSGDIAYWDEDEHFFIVDRLKSLIKYKGYQVAPAELESILLQHPNIFDAGVAGLPDD
 DAGELPAAVVVLEHGKTMTEKEIVDYVASQVTTAKKLRGGVVVFDEVPKGLTGKLDA
 RKIREILIKAKKGGKIAV

Последовательность иPHK PpLuc (SEQ ID NO: 19):

GGGGCGCUGCCUACGGAGGUGGCAGCCAUCUCCUUCUCGGCAUCAAGCUUGA
GGAUGGAGGACGCCAAGAACAUCAAGAAGGGCCCGGCGCCCUUCUACCCGCUGGA
GGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCUCCACAAGGCCAUGAAGCGGUACGCCCUGGUG
5 CCGGGCACGAUCGCCUUCACCGACGCCCACAUCGAGGUCGACAUCACCUACGCGG
AGUACUUCGAGAUGAGCGUGCGCCUGGCCGAGGCCAUGAAGCGGUACGGCCUGAA
CACCAACCACCGGAUCGUGGUGUGCUCGGAGAACAGCCUGCAGUUCUUAUGCCG
GUGCUGGGGCGCCCUUCUUAUCGGCGUGGCCGUCGCCCCGGCGAACGACAUCUACA
10 ACGAGCGGGAGCUGCUGAACAGCAUGGGGAUCAGCCAGCCGACCGUGGUGUUCGU
GAGCAAGAAGGGCCUGCAGAAGAUAUCUGAACGUGCAGAAGAAGCUGCCCAUCAUC
CAGAAGAUAUCAUCAUGGACAGCAAGACCGACUACCAGGGCUUCCAGUCGAUGU
15 ACACGUUCGUGACCAGCCACCUCCCGCCGGGCUUCAAACGAGUACGACUUCGUCCC
GGAGAGCUUCGACCGGGACAAGACCAUCGCCCUGAUAUGAACAGCAGCGGCAGC
ACCGGCCUGCCGAAGGGGGUGGGCCUGCCGCACCGGACCGCCUGCGUGCGCUUCU
CGCACGCCCCGGGACCCCAUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCCGGACACCGCCAUCCU
20 GAGCGUGGUGCCGUUCCACCACGGCUUCGGCAUGUUCACGACCCUGGGCUACCUC
AUCUGCGGCUUCCGGGUGGUCCUGAUGUACCGGUUCGAGGAGGAGCUGUUCUGC
GGAGCCUGCAGGACUACAAGAUAUCAGAGCGCGCUGCUCGUGCCGACCCUGUUCAG
CUUCUUCGCCAAGAGCACCCUGAUCGACAAGUACGACCUGUCGAACCUGCACGAG
25 AUCGCCAGCGGGGGCGCCCCGCUGAGCAAGGAGGUGGGCGAGGCCGUGGCCAAGC
GGUUCCACCUCCCGGGCAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACCGAGACCACGAGCGC
GAUCCUGAUCACCCCCGAGGGGGACGACAAGCCGGGCGCCGUGGGCAAGGUGGUC
CCGUUCUUCGAGGCCAAGGUGGUGGACCUGGACACCGGCAAGACCCUGGGCGUGA
30 ACCAGCGGGGCGAGCUGUGCGUGCGGGGGCCGAUGAUAUGAGCGGCUACGUGA

35

40

45

ACAACCCGGAGGCCACCAACGCCCUCAUCGACAAGGACGGCUGGCUGCACAGCGG
 CGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCUUCGUCGACCGGCUGAAG
 UCGCUGAUCAAGUACAAGGGCUACCAGGUGGCGCCGGCCGAGCUGGAGAGCAUCC
 5 UGCUCACGACCCCCAACAUUCUUCGACGCGCGGCGUGGCGGGCUGCCGGACGACGA
 CGCCGGCGAGCUGCCGGCCGCGGUGGUGGUGCUGGAGCACGGCAAGACCAUGACG
 GAGAAGGAGAUCGUCGACUACGUGGCCAGCCAGGUGACCACCGCCAAGAAGCUGC
 10 GGGGCGGCGUGGUGUUCGUGGACGAGGUCCCCGAAGGGCCUGACCGGGAAGCUCG
 ACGCCCGGAAGAUCGCGGAGAUCUGAUCUAAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGC
 CGUGUAAGACUAGUGCAUCACAUUUAAAAGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAAUAA
 GAGAAAGAAAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUCUUCUUUUUCUUUUUCGUUGGU
 15 GUAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAAACAUAAAUUUCUUUAAUCAAUUUUGCCUCU
 UUUCUCUGUGCUUCAAUUAAUAAAAAAUGGAAAGAACCUAGAUCUAAAAAAA
 AA
 AAUGCAUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGCUCUUUUCAGAGC
 20 CACCAGAAUU

Получение конструкций ДНК и иРНК

Последовательность ДНК, кодирующую люциферазу *Gaussia princeps*, получали с помощью модификации кодирующей последовательности ДНК дикого типа путем

введения GC-оптимизированной последовательности для стабилизации.

Последовательности вводили в производный вектор pUC19 и модифицировали для включения стабилизирующих последовательностей НТО, происходящих из 32L4-5'-НТО рибосомальной 5'-ТОР НТО (32L4), и 3'-НТО, происходящей из альбумина 7, и последовательность гистоновой структуры «петля-на-стебле», участок из 64 аденозинов в 3'-концевой области (полиА-хвост) и участок из 30 цитозинов в 3'-концевой области (полиС-хвост) вводили в направлении 3'-конца относительно кодирующей последовательности. Последовательность содержала следующие элементы последовательности: кодирующую последовательность, кодирующую люциферазу *Gaussia*; стабилизирующие последовательности, происходящие из 32L4-5'-НТО рибосомальной 5'-ТОР НТО (32L4); 64 остатка аденозина на 3'-конце (полиА-хвост); 5 нуклеотидов, 30 остатков цитозина на 3'-конце (полиС-хвост) и 5 дополнительных нуклеотидов.

R2851, как упомянуто в настоящем документе, сходна с GC-обогащенной последовательностью иРНК, кодирующей люциферазу *Gaussia princeps*, содержащей последовательность полиА с 64 аденилатами, за которой расположены 5 нуклеотидов и затем следует последовательность полиС с 30 цитидилатами и гистоновая последовательность «петля-на-стебле», за которой следуют еще 5 нуклеотидов.

Транскрипция РНК в условиях *in vitro*:

Соответствующие плазмиды ДНК ферментативно линеаризовали и транскрибировали в условиях *in vitro* с использованием ДНК-зависимой РНК-полимеразы Т7 в присутствии смеси нуклеотидов в соответствующих буферных условиях. иРНК GpLuc котранскрипционно кэпировали путем добавления аналога кэпа (m7GpppG) к смеси нуклеотидов.

Очистка конструкций иРНК:

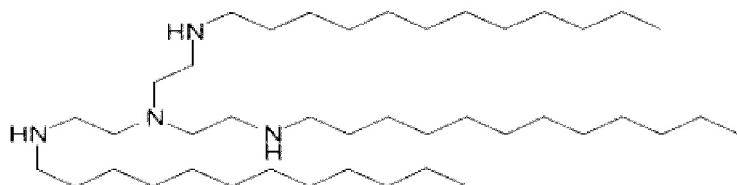
Полученные конструкции иРНК очищали с использованием PureMessenger® (CureVac, Тюбинген, Германия; WO 2008/077592 A1) и применяли для дальнейших экспериментов.

Получение катионного пептида/полимера

PB83, дисульфидсоединенный конъюгат полиэтилен гликоль/пептид получали следующим образом. 20 мг соли пептида ($\text{СННННННRRRRNНННННС-NH}_2$) с ТФУ растворяли в 2 мл боратного буфера, pH=8,5, и перемешивали при комнатной температуре в течение приблизительно 18 часов. Затем 12,6 мг ПЭГ-SH 5000 (Sunbright[®]), растворенного в N-метилпирролидоне, добавляли к раствору пептида, и объем доводили до 3 мл боратым буфером с pH=8,5. После 18 часов инкубации при комнатной температуре реакционную смесь очищали и концентрировали с помощью фильтров Centricon[®] (НОММ 10 кДа), промывали против воды и лиофилизировали. После лиофилизации лиофилизат растворяли в воде ELGA и концентрацию доводили до 10 мг/мл. Полученные полимеры полиэтилен гликоль/пептид (НО-ПЭГ 5000-S-(S-СННННННRRRRNНННННС-S)-)₇-S-ПЭГ 5000-OH) использовали для дальнейших экспериментов по изготовлению и в дальнейшем обозначали PB83.

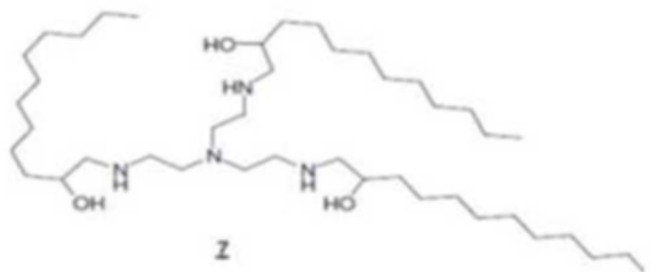
Получение липидоидов

Получали липидоиды



3-C12

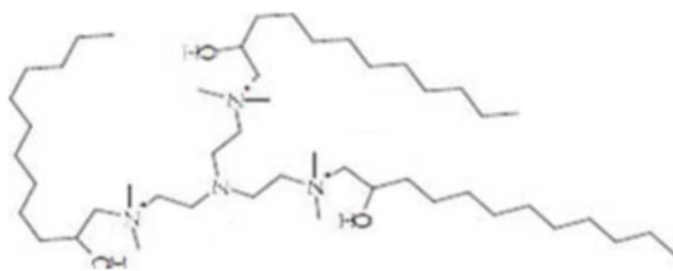
И



3-C12-OH.

Липидоид 3-C12 может быть получен путем ацилирования трис-2-аминоэтитламина с использованием активированного производного лауриновой (C₁₂) кислоты с последующим восстановлением амида. Согласно другому варианту он может быть получен с помощью восстановительного аминирования с использованием соответствующего альдегида. Липидоид 3-C12-ОН получали путем добавления C₁₂ алкила с концевыми эпоксидными группами к тому же олигоамину в соответствии с Love et al., pp. 1864-1869, PNAS, vol. 107 (2010), no. 5 (ср. соединение C12-110).

Липидоид 3-C12-ОН-cat, содержащий катион в соответствии с Формулой IX:



(Формула IX)

получали из 3-C12-ОН с помощью реакции с активированной метальной группой, такой как йодистый метил.

Получение композиций с наночастицами иРНК в комплексе с полимером-липидоидом:

Сначала смешивали лактатный буфер Рингера (RiLa, в качестве альтернативы можно использовать, например, солевой раствор (NaCl) или фосфатно-солевой буфер (ФСБ)), соответствующие количества липидоид а и соответствующие количества полимера (PB83) для получения композиций, содержащих липидоид и пептид или полимер. Затем композиции носителей использовали для сборки наночастиц с иРНК путем смешивания иРНК с соответствующими количествами носителя полимер-липидоид и обеспечения инкубационного периода в течение 10 минут при комнатной температуре, чтобы обеспечить образование комплекса между липидоидом, полимером и иРНК.

Наночастицы затем использовали для дальнейших экспериментов в условиях *in vitro* и в условиях *in vivo*. В данном случае значимые параметры включают количество и вид липидоида, количество и вид полимера, а также соотношение N/P

Для того чтобы охарактеризовать целостность полученных частиц иРНК в комплексе с полимером-липидоидом, проводили исследования задержки электрофоретического сдвига РНК в агарозном геле. Помимо этого, выполняли измерения размера, чтобы оценить однородность профиля размеров полученных наночастиц.

Для исследования задержки электрофоретического сдвига РНК в агарозном геле готовили обычный агарозный гель для РНК и загружали соответствующими частицами иРНК в комплексе с полимером-липидоидом. Полосы в геле визуализировали с использованием Bio Imager. Все исследованные иРНК, образующие комплекс с полимером-липидоидом, были проанализированы, и было установлено, что они являются стабильными в соответствующих условиях (данные не представлены).

Для определения размеров частиц образцы, содержащие иРНК в комплексе с полимером-липидоидом, разводили в лактате Рингера (в другом варианте в солевом растворе) до конечного объема 50 мкл. Измерение размера проводили с использованием устройства Zetasizer[®].

Результаты исследования задержки электрофоретического сдвига в геле и размера частиц свидетельствовали о том, что полученные комплексы полимер-липидоид-иРНК были стабильными и однородными в широком диапазоне соотношений полимер/липидоид.

Пример 2: Влияние различных составов полимер-липидоид на эффективность трансфекции мышечных клеток линии Sol8 в условиях *in vitro*

В этом примере показана эффективность трансфекции различных композиций в соответствии с настоящим изобретением, содержащих иРНК GpLuc (SEQ ID NO: 12), по сравнению с положительным и отрицательным контролями в дифференцированных клетках линии Sol8. Было обнаружено, что добавление даже небольших количеств липидоида (а именно 3-C12 и 3-C12-ОН) к конъюгату катионный полимер-пептид (PB83)

приводило к значительному увеличению эффективности трансфекции, как можно видеть на фигурах 1А-1С.

Трансфекция клеток линии Sol8:

Клетки Sol8 представляют собой линию миогенных клеток, выделенных Daubas et al. из первичных культур подошвенной мышцы, взятой из конечности нормальной мышцы линии СЗН. По 0,2 мл клеток линии Sol8 (20000 клеток) высевали в 96-луночные планшеты со стеклянным дном (Softwell Hydrogel, покрытые коллагеном, эластичность $E=12$ кПа) в 1 день. После удаления среды из каждой лунки в каждую лунку добавляли по 100 мкл среды DMEM (с добавлением 2% лошадиной сыворотки). После этого на 2 день клетки линии Sol8 трансфецировали с использованием 100 мкл трансфекционной смеси (с тремя повторами) комплексов полимер-липидоид, полученных в соответствии с примером 1, и соответствующих контролей (с тремя повторами), и клетки инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 120 минут. После инкубации 150 мкл среды заменяли 150 мкл свежей среды DMEM с добавлением 10% фетальной сыворотки теленка (ФСТ). Через двадцать четыре часа после трансфекции, т.е. на 3 день, по 10 мкл супернатанта из каждой лунки извлекали и использовали для дальнейшего люминесцентного анализа, который выполняли, как описано ниже. Успешная трансфекция грузом приводила к трансляции белка люциферазы и секреции белка люциферазы Gr в супернатант клеточной культуры.

Для анализа люминесценции по 10 мкл супернатанта переносили в 96-луночный планшет для измерения GrLuc. Затем готовили рабочий раствор коэлютеразина (100 мкМ) (1 мл исходного раствора коэлютеразина (4,72 мМ в этаноле) в 49 мл фосфатно-солевого буфера, дополненного 5 мМ NaCl, pH=7,2). В качестве субстрата для GrLuc использовали 100 мкл рабочего раствора коэлютеразина и измеряли через 5 секунд в коммерчески доступном считывателе для микропланшетов.

Пример 3. Влияние различных составов полимер-липидоид на эффективность трансфекции клеток линии HepG2 в условиях *in vitro*

В этом примере показана эффективность трансфекции различных композиций в соответствии с настоящим изобретением, содержащих иРНК GrLuc, по сравнению с положительным и отрицательным контролями в клетках линии HepG2. Было обнаружено, что добавление даже небольших количеств липидоида (3-C12; 3-C12-ОН или 3-C12-ОН-cat) к конъюгату катионный полимер-пептид (PB83) приводило к значительному повышению эффективности трансфекции, как можно видеть на фигурах 2А и 2В.

Эксперименты проводили, как описано в предыдущем примере, за исключением того, что вместо клеток Sol8 трансфецировали клетки линии HepG2. По 0,2 мл клеток линии HepG2 (10000 клеток) высевали в 96-луночный планшет для тканевых культур. После удаления среды из каждой лунки в каждую лунку добавляли по 100 мкл среды RPMI 1640 (с добавлением 1% пенициллина и 1% стрептомицина, 1% L-глутамина). Затем клетки линии HepG2 трансфецировали с использованием 100 мкл смеси для трансфекции (с тремя повторами) комплексов иРНК-полимер-липидоид и соответствующих контролей (с тремя повторами), и клетки инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 90 минут. После инкубации 150 мкл среды заменяли 150 мкл свежей среды RPMI 1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки теленка. Через двадцать четыре часа после трансфекции по 10 мкл супернатанта извлекали из каждой лунки и использовали для дальнейшего люминесцентного анализа.

Пример 4. Стимуляция цитокинов в МКПК человека в условиях *in vitro*

В этом примере оценивали исходную способность наночастиц согласно настоящему

изобретению стимулировать иммунную систему. Для того чтобы оценить влияние состава согласно настоящему изобретению на стимуляцию иммунной системы, измеряли высвобождение цитокинов интерферона-альфа (ИФН- α) и фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α) в моноклеарных клетках периферической крови человека (МКПК) после обработки различными иРНК GrLuc в комплексе с полимером-липидоидом.

Моноклеарные клетки периферической крови человека (МКПК) из периферической крови здоровых доноров выделяли с использованием градиента Ficoll и затем промывали 1× ФСБ (фосфатно-солевой буферный раствор). Выделенные клетки высевали в 96-луночные планшеты для микротитрования (2×10^5 клеток/лунку). МКПК инкубировали в течение 24 ч с 10 мкл соответствующих частиц иРНК в комплексе с полимером-липидоидом (полученных в соответствии с примером 1), или некоторыми контролями (например, оголенной РНК, раствором Рингера с лактатом, CpG2216, RNAdjuvant®) в среде X-VIVO 15 (Lonza) с тремя повторами. Иммуностимулирующий эффект при стимуляции МКПК измеряли путем детектирования выработки цитокинов с использованием специфических антител, детектирующих ИФН- α человека.

Планшеты для микротитрования для ИФА (Nunc Maxisorb) инкубировали в течение ночи (о/н) с буфером для связывания (0,02% NaN₃, 15 mM Na₂CO₃, 15 mM NaHCO₃, pH=9,7), дополнительно содержащим специфические антитела к цитокинам. Затем клетки блокировали 1× ФСБ, содержащим 1% БСА (бычий сывороточный альбумин). Добавляли супернатант клеток и инкубировали в течение 4 ч при 37°C. Затем планшет для микротитрования промывали 1× ФСБ, содержащим 0,05% твин-20, и затем инкубировали с меченым биотином вторичным антителом (BD Pharmingen, Гейдельберг, Германия). В планшет добавляли связанную со стрептавидином пероксидазу хрена. Затем планшет снова промывали 1× ФСБ, содержащим 0,05% Твин-20, и в качестве субстрата добавляли ABTS (2,2'-азино-бис-3-этилбензтиазолин-6-сульфоновую кислоту). Количество цитокинов определяли путем измерения поглощения при 405 нм (OD 405) с использованием стандартной кривой с рекомбинантными цитокинами (BD Pharmingen, Гейдельберг, Германия) с помощью считывателя для ИФА Sunrise от Tecan (Crailsheim, Германия). Одновременно с этим определяли концентрацию GrLuc в супернатанте клеточной культуры.

Полученные результаты указывали на то, что исследованные композиции не стимулировали секрецию цитокинов в МКПК человека, как можно видеть на фигуре 3, это свидетельствует о том, что наночастицы согласно настоящему изобретению имеют лишь очень незначительную исходную способность стимулировать иммунную систему в отсутствие активного положительного контроля, такого как CpG-содержащий олигонуклеотид.

Пример 5: Исследование глаз крысы через 24 ч после субретинальной инъекции иРНК люциферазы методом сканирующей лазерной офтальмоскопии

Комплексы иРНК получали путем смешивания иРНК PpLuc (SEQ ID NO: 19) и раствора катионный полимер-липид или раствора липидоида (например, MC3-cat или 3-C12-ОН) при различных соотношениях зарядов. Животных, получавших буфер Рингера, использовали в качестве контролей. Лиофилизированные составы повторно гидратировали буфером Рингера. Конечная концентрация иРНК составляла 2,5 мкг/мкл. В каждый глаз вводили 2 дозы по 2 мкл. Обработывали по 4 глаза (2 крысы) на группу. Для визуализации сетчатки через 24 ч после обработки использовали неинвазивный метод сканирующей лазерной офтальмоскопии (SLO) (данные не представлены). Раствор люциферина вводили путем инъекции в хвостовую вену крыс,

и глаза исследовали после инкубации в течение 2 минут на протяжении по меньшей мере 10 минут. В течение этого времени крысы дополнительно получали раствор люциферина для дыхания. Для дальнейшего анализа животных затем умерщвляли, глаза извлекали и замораживали. Впоследствии образцы глаз исследовали для

5 определения уровней трансфекции. С этой целью глаза механически разрушали в TissueLyser и лизировали. Активность люциферазы каждого образца количественно исследовали на люминометре.

Результаты субретинальной инъекции иРНК люциферазы (PrLuc иРНК) представлены на фигуре 4 и выражены в виде относительных световых единиц (RLU).

10 Пример 6: Индукция гуморального и клеточного иммунного ответа после внутримышечной вакцинации мышей

Получение конструкций ДНК и иРНК

Для данного примера получали последовательность ДНК, кодирующую белок гемагглютинин (НА) вируса гриппа А (A/Netherlands/602/2009(H1N1)), и использовали

15 для последующих реакций транскрипции в условиях *in vitro*. Соответствующая последовательность иРНК, а также другая подробная информация о схеме вакцинации приведены ниже.

G/C-обогащенная последовательность иРНК R2564, кодирующая белок гемагглютинин (НА) вируса гриппа А (A/Netherlands/602/2009(H1N1)) (SEQ ID NO 17)

GGGGCGCUGCCUACGGAGGUGGCAGCCAUCUCCUUCUCGGCAUCAAGCUUAC
 CAUGAAGGCCAUCCUGGUGGUCCUCCUGUACACCUUCGCCACCGCGAACGCCGAC
 ACGCUGUGCAUCGGCUACACGCCAACAAACAGCACCGACACCGUGGACACCGUGC
 5 UCGAGAAGAACGUCACGGUGACCCACUCCGUGAACCUUGCUGGAGGACAAGCACAA
 CGGGAAGCUCUGCAAGCUGCGGGGCGUCGCCCCGCGUCACCUCCGGGAAGUGCAAC
 AUCGCCGGCUGGAUCCUGGGGAACCCGGAGUGCGAGAGCCUGUCCACCGCGAGCU
 10 CCUGGAGCUACAUCGUGGAGACCUCCAGCUCCGACAACGGCACGUGCUACCCCGG
 CGACUUCAUCGACUACGAGGAGCUCCGCGAGCAGCUGAGCUCCGUGAGCUCCUUC
 GAGCGGUUCGAGAUUCUCCCCAAGACCAGCUCCUGGCCCCAACCACGACAGCAACA
 AGGGGGUACACGCCGCCUGCCCCGCACGCCGGCGCGAAGUCCUUCUACAAGAACCU
 15 GAUCUGGCUCGUGAAGAAGGGGAACAGCUACCCCAAGCUGUCCAAGAGCUACAUC
 AACGACAAGGGCAAGGAGGUGCUGGUCCUCUGGGGGAUCCACCACCCAGCACCU
 CCGCCGACCAGCAGAGCCUGUACCAGAACGCCGACGCCUACGUGUUCGUGGGCUC
 CAGCCGCUACUCCAAGAAGUUCAAGCCCGAGAUCGCCAUCCGGCCGAAGGUCCGC
 20 GACCAGGAGGGCCGGAUGAACUACUACUGGACGCUGGUGGAGCCCGGGGACAAG
 AUCACCUUCGAGGCGACCGGCAACCUCGUGGUCCCCCGCUACGCCUUCGCCAUGG
 AGCGGAACGCCGGGAGCGGCAUCAUCAUCUCCGACACCCCCGUGCACGACUGCAA
 CACGACCUGCCAGACCCCGAAGGGCGCCAUCAACACCAGCCUGCCCUUCCAGAAC
 25 AUCCACCCCAUCACGAUCGGGAAGUGCCCCAAGUACGUGAAGUCCACCAAGCUGC
 GCCUCGCGACCGGCCUGCGGAACGUCCCGAGCAUCCAGUCCCGCGGGCUGUUCGG
 CGCCAUCGCCGGGUUCAUCGAGGGCGGCUGGACCGGGAUGGUGGACGGCUGGUAC
 30 GGGUACCACCACCAGAACGAGCAGGGCAGCGGGUACGCCGCCGACCUCAAGUCCA
 CGCAGAACGCGAUCGACGAGAUCACCAACAAGGUGAACAGCGUCAUCGAGAAGAU
 GAACACCCAGUUCACCGCCGUGGGCAAGGAGUUAACCACCUGGAGAAGCGGAUC
 GAGAACCUGAACAAGAAGGUCGACGACGGCUUCCUCGACAUCUGGACGUACAACG
 35 CCGAGCUGCUGGUGCUCCUGGAGAACGAGCGCACCCUGGACUACCACGACUCCAA
 CGUGAAGAACCUCUACGAGAAGGUCCGGAGCCAGCUGAAGAACAACGCCAAGGAG
 AUCGGGAACGGCUGCUUCGAGUUCUACCACAAGUGCGACAACACCUUGCAUGGAGU
 CCGUGAAGAACGGGACCUACGACUACCCCAAGUACAGCGAGGAGGCCAAGCUGAA
 40 CCGCGAGGAGAUUCGACGGCGUGAAGCUCGAGUCCACGCGGAUCUACCAGAUCCUG
 GCGAUCUACAGCACCGUCGCCAGCUCCUGGUGCUCGUGGUCAGCCUGGGGGCCA
 UCUCUUCUGGAUGUGCAGCAACGGCUCCCUGCAGUGCCGCAUCUGCAUCUGACC
 ACUAGUGCAUCACAUUUAAAAGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAAUAAGAGAAAGA
 45 AAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUAUCUCUUUUUCUUUUUCGUUGGUGUAAAGCC
 AACACCCUGUCUAAAAACAUAUUUUUCUUUAAUCAUUUUUGCCUCUUUUUCUCUG

UGCUUCAAUUAAUAAAAAUGGAAAGAACCUAGAUCUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAUGCAUCC
 CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGCUCUUUCAGAGCCACCAGAAU
 U

В соответствии с первым препаратом получали последовательность ДНК, кодирующую вышеуказанную иРНК. Конструкцию R2564 (SEQ ID NO: 17) получали путем введения 5'-ТОР-НТО, происходящей из рибосомального белка 32L, модификации кодирующей последовательности дикого типа путем введения GC-оптимизированной последовательности для стабилизации с последующим введением стабилизирующей последовательности, происходящей из 3'-НТО альбумина, участка из 64 аденозинов (последовательность полиА), участка из 30 цитозинов (последовательность полиС) и гистоновой структуры «петля-на-стебле».

Получение вакцины

«Оголенную» иРНК R2564 вводили в растворе Рингера с лактатом (RiLa). Совместный состав оголенной иРНК R2564 с PB83 и 3-С12-ОН получали путем смешивания всех компонентов непосредственно перед введением.

Иммунизация

Мышей линии Balb/c (n=8 на группу) вакцинировали внутримышечно (слева в большеберцовую мышцу) на 0 день и повторно иммунизировали на 25 день с использованием 10 мкг НА-иРНК (R2564, SEQ ID NO: 17, «оголенной» НА-иРНК) по отдельности или 10 мкг НА-иРНК, изготовленной совместно с PB83, N/P 0,7, 0,4 3-С12-ОН; см. таблицу 1 ниже. Указанное в таблице количество в мкг относится к массе молекулы нуклеиновой кислоты как таковой.

Таблица 1: Экспериментальные условия

Группа	Обработка	Доза РНК	Путь (объем)	Мыши #
1	Буфер RiLa	10 мкг	в/м (25 мкл)	8
2	Оголенная НА-иРНК	10 мкг	в/м (25 мкл)	8
4	R2564 PB83 N/P 0,7, 0,4 3-С12-ОН	10 мкг	в/м (25 мкл)	8

Все животные получили инъекции для повторной иммунизации на 25 день. Индукцию функциональных гуморальных ответов исследовали на 40 день путем сбора образцов крови и определения титра сывороточного антитела, ингибирующего гемагглютинацию (HI) (см. таблицу 2 ниже), который обычно используют в качестве суррогатного маркера иммунной защиты от вирусной инфекции гриппа. Обычно считается, что титр HI 1:40 или выше обеспечивает защиту. Мышей, получавших буфер Рингера с лактатом (RiLa), использовали в качестве отрицательных контролей.

Таблица 2: График вакцинации

День	Обработка	Отбор образцов
d0	Первичная	
d25	Повторная	
d40	Окончание	Сбор крови + селезенка

Количественное исследование ингибирования гемагглютинации

Для количественного исследования ингибирования гемагглютинации (НИ) сыворотки мышей подвергали тепловой инактивации (56°C, 30 мин), инкубировали с каолином и предварительно адсорбировали в красные кровяные клетки цыпленка (CRBC) (оба продукта от Labor Dr. Merck & Kollegen, Оксенхаузен, Германия). Для количественного исследования НИ по 50 мкл 2-кратных разведений предварительно обработанных сывороток инкубировали в течение 45 мин с 4 единицами гемагглютинации (HAU) инактивированного A/California/5 7/2009 (NIBSC, Поттерс Бар, Великобритания) и добавляли 50 мкл 0,5% CRBC.

Результаты

Как можно видеть на фигуре 5, у всех мышей, вакцинированных составом PB83 N/P 0,7, 0,4 3-С12-ОН, вырабатывались титры $NI \geq 1:40$. На фигуре 5 также показано, что внутримышечная вакцинация составом, содержащим НА-иРНК (R2564) и носитель полимер-липидоид на основе PB83 и 3-ОН-С12, индуцировала более высокие титры антител против белка НА по сравнению с вакцинацией НА-иРНК (R2564) по отдельности.

Пример 7. Эффективность трансфекции других полимеров в комбинации с различными липидами в клетках линии A549

В этом примере описана оценка влияния полимеров, отличных от PB83, в комбинации с различными липидами на эффективность трансфекции клеток линии A549 (линия клеток карциномы легкого человека). С этой целью для эффективной доставки иРНК использовали поликатионный блок-полимер Sunbright AS50-DT-A (NOF Corporation, Токио). В качестве показателя эффективности трансфекции в качестве груза использовали иРНК люциферазы GrLuc из *Gaussia princeps*. Успешная трансфекция грузом приводила к трансляции белка люциферазы и секреции белка люциферазы в супернатант клеточной культуры.

Соответственно, клетки линии A549 высевали в 24-луночные планшеты в плотности 75000 клеток на лунку в среду для культивирования клеток (среда Ham's F-12K (в модификации Kaighn), дополненная 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 1% L-глутамина, 1% пенициллина/стрептомицина, Gibco (ThermoFisher)). Клетки линии A549 трансфецировали с двумя повторами, как описано ниже, различными составами липид-носитель и иРНК, кодирующей GrLuc (SEQ ID NO: 12; R2851). В качестве отрицательного контроля использовали иРНК, кодирующую GrLuc, без носителя PB83. Экспрессию люциферазы определяли количественно через 24 ч.

Таблица 3: Условия трансфекции

#	Полимер	Липид	иРНК	
1	10 мкл Sunbright [10 г/л] в 40 мкл HEPES [10 мМ]	без	2,5 мкл иРНК (1 мкг/мкл) 47,5 мкл HEPES [10 мМ]	До 1 мл средами без сыворотки Добавлено по 200 мкл на лунку
2	8 мкл Sunbright [10 г/л] в 42 мкл NaCl [0,9%]	без	2,5 мкл иРНК (1 мкг/мкл) 47,5 мкл NaCl [0,9%]	
3	8 мкл Sunbright [10 г/л] в 42 мкл NaCl [0,9%]	1мкл 3-C12-OH [100 мкмоль/мл]	2,5 мкл иРНК (1 мкг/мкл) 47,5 мкл NaCl [0,9%]	
6	10 мкл Sunbright [10 г/л] в 40 мкл HEPES [10 мМ]	1мкл DDAB [100 мкмоль/мл]	2,5 мкл иРНК (1 мкг/мкл) 47,5 мкл HEPES [10 мМ]	

Результаты

На Фигуре 6 показана экспрессия белка GrLuc в клетках линии A549, трансфицированных конструкцией иРНК R2851 с использованием полимеров, отличных от PB83, и что исследованные составы с добавленными липидами были более эффективными по сравнению с контрольным полимером Sunbright без добавленных липидов. Это указывает на то, что комбинация иРНК с очень маленькими количествами липида была способна повысить эффективность трансфекции при использовании катионных полимерных систем.

Пример 7. Эффективность трансфекции других полимеров в комбинации с различными липидами в клетках линии ВНК

В этом примере описана оценка влияния полимеров, отличных от PB83, в комбинации с различными липидами на эффективность трансфекции в клетках почки детеныша хомяка (ВНК) и клетках линии Sol8 (скелетная мышца *Mus musculus*). Для этого молекулы -GH5R4H5GC-S-S-CGH5R4H5G («прослойка-димер»; S-S указывает, что блоки ковалентно соединены связями S-S цистеина; Mavis Bioanalytical Instruments AG, Германия/Кельн);

-K(EEEKK)3SGGGGH5R4H5GC-S-S-CGH5R4H5GGGGS(KKEEE)₃K («(KKEEE)₃K-димер»; S-S указывает, что блоки ковалентно соединены связями S-S цистеина; bitavis Bioanalytical Instruments AG, Германия/Кельн);

-поликатионный линейный полисахарид хитозан 95/50 («Хитозан», C AS 9012-76-4; Intavis Bioanalytical Instruments AG, Германия/Кельн);

-(R₁₂C)-(CR₁₂C)-(R₁₂C) («Тример»; блоки R₁₂C и CR₁₂C ковалентно соединены связями S-S цистеина; Intavis Bioanalytical Instruments AG, Германия/Кельн);

-R₁₂C-PEG5000 («R₁₂C-ПЭГ»); и

-(R₁₂CW)₂ (два блока R₁₂CW ковалентно соединены связями S-S цистеина)

применяли для доставки иРНК. В качестве показателя эффективности трансфекции в качестве груза применяли иРНК люциферазы GrLuc *Gaussia princeps*. Успешная трансфекция грузом приводит к трансляции белка люциферазы и секреции белка

люциферазы в супернатант клеточной культуры.

Для клеток линии ВНК, соответственно, клетки высевали в 96-луночные планшеты в плотности 10000 клеток на лунку в среду для культивирования клеток (RPMI, 10% ФСТ 1% L-глутамина, 1% пенициллина/стрептомицина). Клетки линии ВНК

трансфецировали с двумя повторами, как описано ниже, с использованием различных составов носитель-липид и иРНК, кодирующей GpLuc (SEQ ID NO: 12; R2851). В качестве отрицательного контроля использовали иРНК, кодирующую GpLuc, без носителя PB83. Экспрессию люциферазы определяли количественно через 24 ч после трансфекции.

Для клеток линии Sol8 (дифференцированных), соответственно, клетки высевали за 7 дней до трансфекции в 96-луночные планшеты в плотности 10000 клеток на лунку в среду для культивирования клеток (DMEM, 1% пенициллина/стрептомицина, 1% L-глутамина, 1% ФСТ). Среду удаляли, и через один день после высевания к клеткам добавляли DMEM, содержащую 1% ФСТ. Через три дня после высевания среду клеток заменяли (DMEM, 1% ФСТ). На 8 день клетки линии Sol8 трансфецировали с тремя повторами, как описано ниже, с использованием различных составов носитель-липид и иРНК, кодирующей GpLuc (SEQ ID NO: 12; R2851). В качестве отрицательного контроля применяли иРНК, кодирующую GpLuc, без носителя CVCM/PB83. Экспрессию люциферазы определяли количественно через 24 ч после трансфекции.

Для клеток линии HeLa, соответственно, клетки высевали в 96-луночные планшеты в плотности 10000 клеток на лунку в среду для культивирования клеток (RPMI, 10% ФСТ 1% L-глутамина, 1% пенициллина/стрептомицина). Клетки линии HeLa трансфецировали с двумя повторами, как описано ниже, с использованием различных составов носитель-липид и 2 мкг иРНК, кодирующей PpLuc (SEQ ID NO: 19; R2244; см. таблицу ниже). В качестве отрицательного контроля применяли иРНК, кодирующую PpLuc, без носителя PB83. Экспрессию люциферазы определяли количественно через 24 ч после трансфекции.

Таблица 4: Условия трансфекции

Тип CVCM	Вода	(R ₁₂ CW) ₂ (4 г/л)	MC3		20% трегалоза
			1:100	1:10	
			1 мкмоль/мл	10 мкмоль/мл	
CR12 0,8; 0,1 MC3	158,8 мкл	3,2 мкл	3 мкл		75 мкл
CR12 0,8; 0,3 MC3	152,8 мкл	3,2 мкл	9 мкл		75 мкл
CR12 0,8; 1,0 MC3	158,8 мкл	3,2 мкл		3 мкл	75 мкл

Результаты

На фигурах 7А и 7В показано, что белок GpLuc экспрессировался в клетках линии ВНК и дифференцированных клетках линии Sol8, трансфецированных конструкцией иРНК R2851 с использованием полимеров, отличных от PB83, и что исследованные составы с добавленными липидами были более эффективными по сравнению с соответствующими полимерными контролями без добавленных липидов. На фигуре 7С показано, что белок PpLuc экспрессировался в клетках линии HeLa. Это свидетельствует о том, что комбинация иРНК с очень небольшими количествами липида была способна повышать эффективность трансфекции при использовании катионных

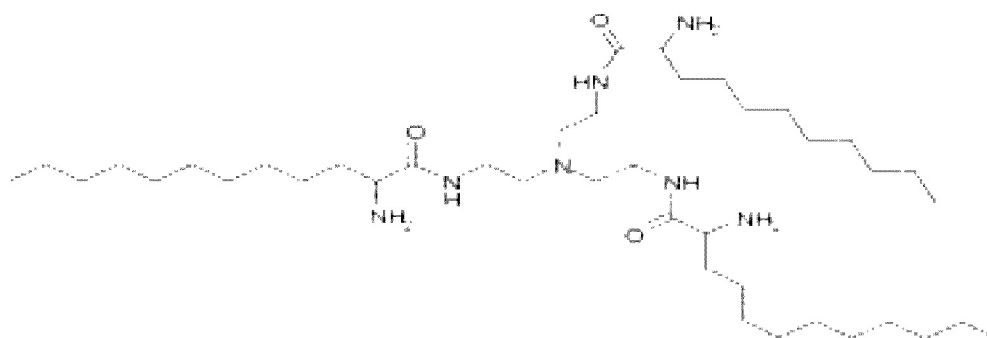
полимерных систем.

Пример 8. Эффективность трансфекции других полимеров в комбинации с 3-С12-амидным липидом

В этом примере описана оценка влияния различных составов полимер-липид на эффективность трансфекции в клетках линии НерG2 без ФСТ. В качестве показателя эффективности трансфекции в качестве груза использовали иРНК люциферазы GrLuc Gaussia princeps. Успешная трансфекция грузом приводит к трансляции белка люциферазы и секреции белка люциферазы в супернатант клеточной культуры.

Соответственно, клетки линии НерG2 высевали в 24-луночные планшеты в плотности 10000 клеток на лунку в среду для культивирования клеток (RPMI 1640 w/ 25 mM HEPES 500 мл, 10% ФСТ, 1% L-глутамина, 1% пенициллина/стрептомицина; Lonza Group AG BE12-115F/6MB205, Базель/Швейцария). Клетки линии НерG2 трансфецировали с двумя повторами, как описано ниже, с использованием различных составов носитель-липид и иРНК, кодирующей GrLuc (SEQ ID NO: 12; R2851), при соотношении N/P 0,7. В качестве отрицательного контроля применяли иРНК, кодирующую GrLuc, без носителя CVCM/PB83. Экспрессию люциферазы определяли количественно через 24 часа.

3-С12-амид (Формула X)



Монометильное производное 3-С12-амида (Формула Ха)

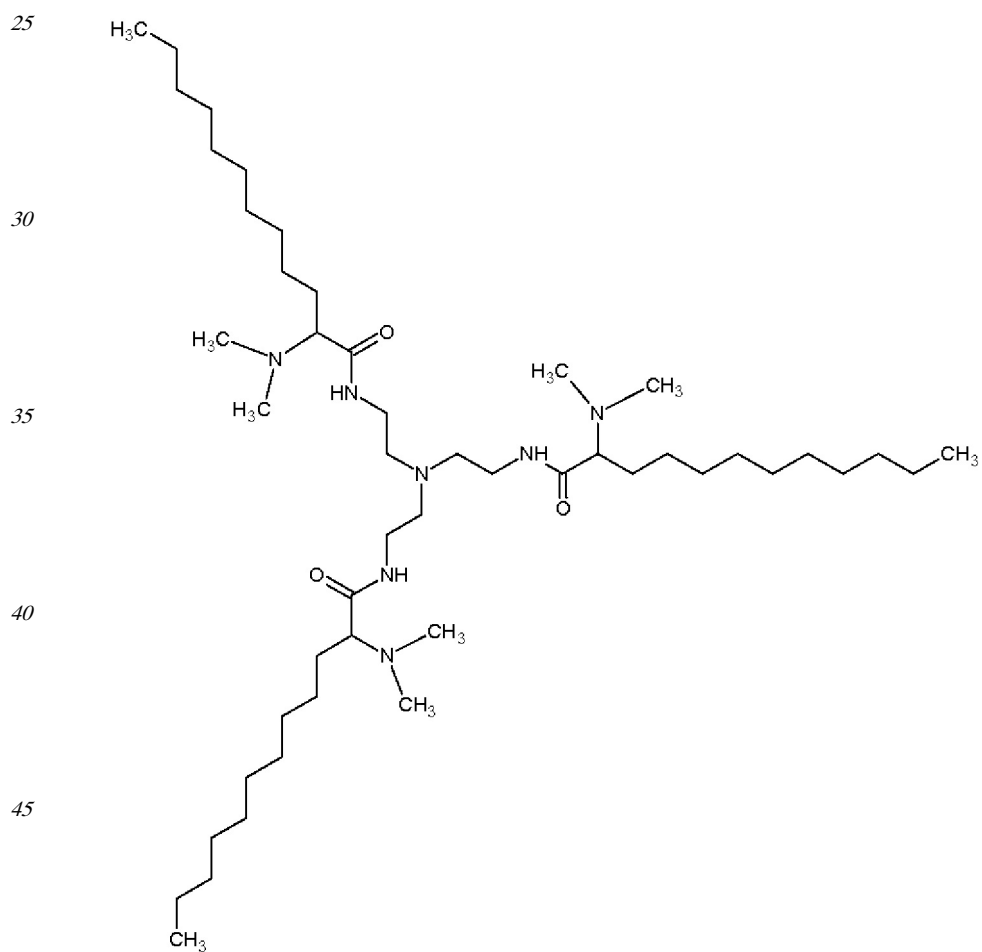
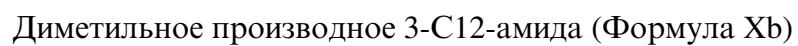


Таблица 5: Условия трансфекции:

	Носитель	Липид	N/P
Условие 1	CVCM/PB83	без	0,7
Условие 2	CVCM/PB83	3-C12-ОН	0,7
Условие 3	CVCM/PB83	3-C12-амид	0,7

Результаты

На фигуре 8 показано, что белок GrLuc экспрессировался в клетках линии HepG2, трансфицированных конструкцией иРНК R2851, и что исследованные составы с добавленными липидами были высокоэффективными по сравнению с контролем без добавленных липидов. Это свидетельствует о том, что комбинация иРНК с очень небольшими количествами липида была способна повышать эффективность трансфекции.

Пример 9. Эффективность трансфекции других полимеров в комбинации с различными липидами при внутривитреальной доставке

В этом примере описана оценка влияния различных составов полимер-липид на эффективность трансфекции при проведении доставки в глаза. В качестве показателя эффективности трансфекции в качестве груза применяли иРНК люциферазы RpLuc *Photinus pyralis*. Успешная трансфекция грузом приводит к трансляции белка люциферазы и секреции белка люциферазы в супернатант клеточной культуры.

Комплексы иРНК получали путем смешивания иРНК RpLuc (SEQ ID NO: 19, R2244) и растворов катионный полимер-липид при одинаковых соотношениях зарядов. Составы готовили в буфере Рингера по схеме, описанной ниже, с получением конечной концентрации иРНК 2 мкг/мкл.

Состав 1 (иРНК RpLuc R2244)

20 мл иРНК (5 г/л) + 25 мл воды + 5 мл 10× RiLa с получением 100 мг иРНК в 50 мл, что эквивалентно 2 мг/мл.

Состав 2 (иРНК RpLuc R2244 в PB83 N/P 0, 7, 0, 4 3-C12-ОН)

20 мл CVCM (PB83, 10 г/л) + 0,4 мл 3-C12-ОН (100 мкмоль/мл) + 4,5 мл воды + 5 мл 10× RiLa добавляли к 20 мл иРНК (R2244 - люцифераза; 5 г/л) с получением 100 мг иРНК в 50 мл, что эквивалентно 2 мг/мл.

По 5 мкл вводили в каждый глаз (внутривитреально). Обработывали 4 глаза на группу. Животных, обработанных иРНК в чистом виде, приготовленной в буфере Рингера, использовали в качестве контролей. Через 24 часа после обработки животных умерщвляли, их глаза извлекали и замораживали. Впоследствии образцы глаза исследовали для определения уровней трансфекции. С этой целью глаза механически разрушали в TissueLyser и лизировали. Активность люциферазы каждого образца исследовали с помощью люминометра. Результаты оценки активности люциферазы выражены в относительных световых единицах (RLU).

Результаты

На фигуре 9 показано, что белок RpLuc экспрессировался при внутривитреальной инъекции и что исследованные составы с добавленными липидами были высокоэффективными по сравнению с контролем без добавленных липидов. Это свидетельствует о том, что комбинация иРНК с очень небольшими количествами липида была способна повышать эффективность внутривитреальной трансфекции.

Пример 10. Эффективность трансфекции различных комбинаций полимер-липид в клетках линии A549

В этом примере описана оценка влияния различных составов полимер-липид на эффективность трансфекции в клетках линии A549 (линия клеток карциномы легкого человека). В качестве показателя эффективности трансфекции в качестве груза применяли иРНК люциферазы GpLuc Gaussia princeps. Успешная трансфекция грузом приводит к трансляции белка люциферазы и секреции белка люциферазы в супернатант клеточной культуры.

Соответственно, клетки линии A549 высевали в 24-луночные планшеты в плотности 75000 клеток на лунку в среду для культивирования клеток (среда Ham's F-12K (в модификации Kaighn), с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 1% L-глутамина, 1% пенициллина/стрептомицина, Gibco (ThermoFisher)). Клетки линии A549 трансфецировали с двумя повторами, как описано ниже, с использованием различных составов носитель-липид и иРНЕ, кодирующей GpLuc (SEQ ID NO: 12, R2851). В качестве отрицательного контроля применяли иРНЕ, кодирующую GpLuc, без носителя CVCM/RB83. Экспрессию люциферазы определяли количественно через 24 часа.

В этом рабочем примере использовали катионный липид DDAB (диметилдидециламмоний, номер CAS 3700-67-2, Avanti Polar Lipids, Алабастер, США):

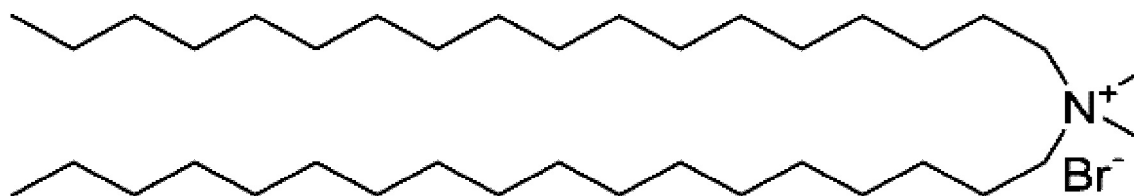


Таблица 6: Условия трансфекции:

	Этап 1 (добавление CV CM/PB83, приготовленного в воде)	Этап 2 (добавление буфера или иРНК)	Этап 3 (добавление буфера или иРНК)	Этап 4 (доведение объема и распределение)
Условие 1 (без липида)	30 мкл CV CM [1 мкг/мкл, разведенного в воде]	20 мкл RiLa	2,5 мкл иРНК (1 мкг/мкл)	До 1 мл средами без сыворотки Добавлено по 200 мкл на лунку
Условие 2	30 мкл CV CM [1 мкг/мкл, разведенного в воде] + 1 мкл DDAB (1 мкмоль/мл)	20 мкл RiLa	2,5 мкл иРНК (1 мкг/мкл)	
Условие 3	30 мкл CV CM [1 мкг/мкл, разведенного в воде] + 1 мкл DDAB (1 мкмоль/мл)	2,5 мкл иРНК (1 мкг/мкл)	20 мкл RiLa	
Условие 4	30 мкл CV CM [1 мкг/мкл, разведенного в воде] + 1 мкл DDAB (1 мкмоль/мл)	10 мкл RiLa	2,5 мкл иРНК (1 мкг/мкл) в 10 мкл RiLa	
Условие 5	30 мкл CV CM [1	20 мкл RiLa	2,5 мкл иРНК	
	мкг/мкл, разведенного в воде] + 1 мкл 3-C12-ОН (1:100)		(1 мкг/мкл)	

Результаты

На фигуре 10 показано, что белок GrLuc экспрессировался в клетках линии A549, трансфицированных конструкцией иРНК R2851, и что исследованные составы с добавленными липидами были высокоэффективными по сравнению с контролем без добавленных липидов. Это свидетельствует о том, что комбинация иРНК с очень небольшими количествами липида была способна повышать эффективность трансфекции.

Пример 11. Эффективность трансфекции различных комбинаций полимер-ПЭГ-липид в клетках линии A549

В этом примере описана оценка влияния различных составов полимер-липид на эффективность трансфекции в клетках линии A549 (линия клеток карциномы легкого человека). В качестве показателя эффективности трансфекции в качестве груза применяли иРНК люциферазы GrLuc *Gaussia princeps*. Успешная трансфекция грузом приводит к трансляции белка люциферазы и секреции белка люциферазы в супернатант клеточной культуры.

Соответственно, клетки линии A549 высевали в 24-луночные планшеты в плотности 75000 клеток на лунку в среду для культивирования клеток (среда Ham's F-12K (в модификации Kaighn), с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 1% L-глутамина, 1% пенициллина/стрептомицина, Gibco (ThermoFisher)). Клетки линии A549 трансфецировали с двумя повторами, как описано ниже, с использованием различных составов носитель-липид и иРНК, кодирующей GpLuc (SEQ ID NO: 12; R2851). В качестве отрицательного контроля применяли иРНК, кодирующую GpLuc, без носителя CVCM/PB83. Экспрессию люциферазы определяли количественно через 24 часа.

В этом рабочем примере в качестве полимера-носителя применяли $(R_{12}CW)_2$ (два блока R12CW, ковалентно соединенных связями S-S цистеина) и пегилированный липид 3-C12-OH (ChiroBlock, Биттерфельд-Вольфен, Германия):

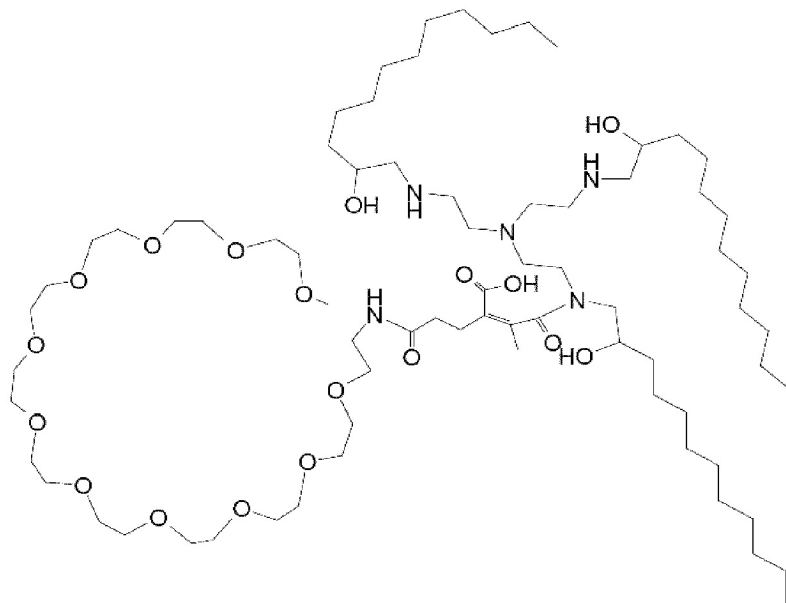


Таблица 7: Условия трансфекции

	Носитель	Липид	иРНК	N/P	
Условие 1	15 мкл $(R_{12}CW)_2$ [0,25 г/л]	без	2,5 мкл GpLuc иРНК [5 г/л]	0,7	+ 20 мкл RiLa
Условие 2	без	5 мкл пегилированного 3-C12-OH [100 мкмоль/мл]	2,5 мкл GpLuc иРНК [5 г/л]	0,7	Доведено до 1 мл средами без сыворотки
Условие 3	15 мкл $(R_{12}CW)_2$ [0,25 г/л]	5 мкл пегилированного 3-C12-OH [100 мкмоль/мл]	2,5 мкл GpLuc иРНК [5 г/л]	0,7	Добавлено 200 мкл на лунку

Во второй части в качестве полимера-носителя применяли $(R_{12}CW)_2$ (две блока R12CW, ковалентно соединенных связями S-S цистеина), и пегилированный липид (ChiroBlock, Биттерфельд-Вольфен, Германия):

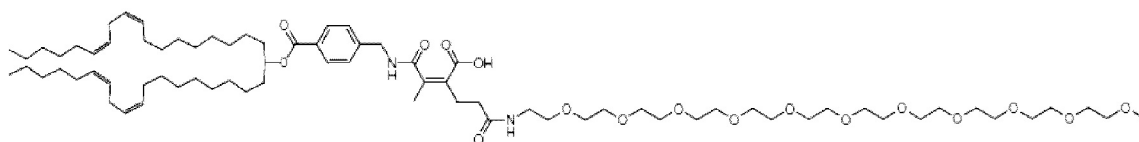


Таблица 8: Условия трансфекции:

	Носитель	Липид	иРНК	N/P	
Условие 4	45 мкл (R ₁₂ CW) ₂ [0,25 г/л]	без	2,5 мкл GrLuc иРНК [5 г/л]	0,7	+ 20 мкл RiLa
Условие 5	без	5 мкл пегилированного липида [100 мкмоль/мл]	2,5 мкл GrLuc иРНК [5 г/л]	0,7	Доведено до 1 мл средами без сыворотки
Условие 6	45 мкл (R ₁₂ CW) ₂ [0,25 г/л]	5 мкл пегилированного липида [100 мкмоль/мл]	2,5 мкл GrLuc иРНК [5 г/л]	0,7	Добавлено 200 мкл на лунку

Результаты

На фигурах 11А и 11В показано, что белок GpLuc экспрессировался в клетках линии А549, трансфицированных конструкцией иРНК R2851, и что исследованные составы с добавленным пегилированным липидом были высокоэффективными по сравнению с контролем без добавленных липидов. Это свидетельствует о том, что комбинация иРНК с очень небольшими количествами пегилированного липида была способна повышать эффективность трансфекции.

Перечень последовательностей

<110> CureVac AG
<120> Гибридные носители для нуклеиновой кислоты-груза
<130> CRV16P02PC2 - CV146 - P231
<160> 19
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 60
<212> РНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Формула_V
<400> 1
uagcgaagcu cuuggaccua gguuuuuuuu uuuuuuuuggg ugcguuccua gaaguacacg
<210> 2
<211> 120
<212> РНК
<213> Искусственная последовательность
<220>

	<223>	Формула_V		
	<400>	2		
		uacsgaagcsi cuugdgassua gguuuuuuuuu uuuuuuuuggg ugcguuissua gaaguacascg	60	
		aucsguiscga gaassuggau csaaaaaaaa aaaaaaassc ascgaaggau cuucaugugc	120	
5	<210>	3		
	<211>	229		
	<212>	РНК		
	<213>	Искусственная последовательность		
	<220>			
10	<223>	Формула_V		
	<400>	3		
		gggagaaaagc ucaagcuugg agsaaugccс gcasaуuag agaaaccgagu ugcаuаuсuс	60	
		аgаgаuаuugg cccccguua gguuauuuuu gacagacagu ggagcuuuu cacucccagg	120	
		aucsgagucg саиасиасgg uacugguagac agaccuaggu cguсaguuаg ccaguccgcc	180	
15		асиаgасguг агиссгисаа агсагиага uгуиасасис uаuuаgаuс	229	
	<210>	4		
	<211>	547		
	<212>	РНК		
	<213>	Искусственная последовательность		
20	<220>			
	<223>	Формула_V		
	<400>	4		
		gggagaaaagc ucaagcuugg agsaaugccс gcasaуuag agaaaccgagu ugcаuаuсuс	60	
		аgаgаuаuugg cccccguua gguuauuuuu gacagacagu ggagcuuuu cacucccagg	120	
25		aucsgagucg саиасиасgg uacugguagac agaccuaggu cguсaguuаg ccaguccgcc	180	
		асиаgасguг агиссгисаа агсагиага uгуиасасис uаuuаgаuсu cggauuacag	240	
		cuggaaggag caggaguagu гуиуиuгсис uааgиaccga гугугcccaa uacccgauca	300	
		гсиuаиuаас гаасггсисс иссисиага cugcagcgua агугсггаu cuggggauca	360	
		ааииасигас угссиггаиу асссисггас аиаиаассиу гуагсасгсu гуугсигуаи	420	
30		aggugaccaa cгсссасисг агуаgассаg сисисиуагу cгггасаауг аиaggaggcg	480	
		cгггисааиси асиисиггси агуиаагау аггсигсасс гассисиаиа агуагсгуги	540	
		ссисиаг	547	
	<210>	5		
	<211>	1083		
35	<212>	РНК		
	<213>	Искусственная последовательность		
	<220>			
	<223>	Формула_V		
	<400>	5		
40		gggagaaaagc ucaagcuugg agsaaugccс gcasaуuag agaaaccgagu ugcаuаuсuс	60	
		аgаgаuаuugg cccccguua gguuauuuuu gacagacagu ggagcuuuu cacucccagg	120	
		aucsgagucg саиасиасgg uacugguagac agaccuaggu cguсaguuаg ccaguccgcc	180	
		асиаgасguг агиссгисаа агсагиага uгуиасасис uаuuаgаuсu cggauuacag	240	
		cuggaaggag caggaguagu гуиуиuгсис uааgиaccga гугугcccaa uacccgauca	300	
45		гсиuаиuаас гаасггсисс иссисиага cugcagcgua агугсггаu cuggggauca	360	
		ааииасигас угссиггаиу асссисггас аиаиаассиу гуагсасгсu гуугсигуаи	420	
		aggugaccaa cгсссасисг агуаgассаg сисисиуагу cгггасаауг аиaggaggcg	480	
		cгггисааиси асиисиггси агуиаагау аггсигсасс гассисиаиа агуагсгуги	540	

	ccucuagagc uacgcagguu cgcauuaaaa gcguugauua gugugcauag aacagaccuc	600
	uuauucggug aaacgccaga augcuaaaau ccaauaacuc uucccaaaac gcguacggcc	660
	gaagacgcgc gcuuaucuug uguacguucu cgcacaugga agaauacagcg ggcauggugg	720
	uagggcaaua ggggagcugg guagcagcga aaaaggggccc cugcgcacgu agcuucgcug	780
5	uucgucigaa acaaccscgc auccguugua gcgaucccgu uaucaguguu auucuuuguc	840
	gcacuaagau ucaugguigua gucgacaaua acagcgucuu ggcauguucu ggucacgugc	900
	ccuaugcccg ggcuugugcc ucucagguugc acagcgauac uuaaagccuu caagguacuc	960
	gacgugggua ccgaucugug acacuuccua agauuuaucc acuguguuag ccccgacccg	1020
	ccgaccuaaa cugguiccaa guauacgcau ucgcugagcg gaucgaauau aaaagcuuga	1080
10	auu	1083
	<210> 6	
	<211> 229	
	<212> РНК	
	<213> Искусственная последовательность	
15	<220>	
	<223> Формула_V	
	<400> 6	
	gggagaaaagc ucaagcuuau ccaaguaggc uggucaccug uacaacguag ccgguauuuu	60
	uuuuuuuuuu uuuuuuuuga ccgucisaag guccaaguua gucugccuau aaaggugcgg	120
20	ауссасагси гаугааагас иугугсггуа сггуиаауси ссссиuuuuu uuuuuuuuuu	180
	uuuuuагуаа аугсгисиас игаауссасг гаугаугсуг gcccagauc	229
	<210> 7	
	<211> 547	
	<212> РНК	
25	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Формула_V	
	<400> 7	
	gggagaaaagc ucaagcuuau ccaaguaggc uggucaccug uacaacguag ccgguauuuu	60
30	uuuuuuuuuu uuuuuuuuga ccgucisaag guccaaguua gucugccuau aaaggugcgg	120
	ауссасагси гаугааагас иугугсггуа сггуиаауси ссссиuuuuu uuuuuuuuuu	180
	uuuuuагуаа аугсгисиас игаауссасг гаугаугсуг gcccagauc ucgaccacaa	240
	гугсауауаг уагисаусга gggucgccuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uggcccaguu	300
	сугагасиуc гсуагaгаси асaгуиасaг сугсaгуагу аaccacugcg гсуауугсaг	360
35	гаааусссгсг uсаггуиууу uuuuuuuuuu uuuuuucccg ucacuaugau uaagaaccag	420
	гуггaгугугс асугсисисг аггисисасг агагсгсисг ауаcагуccу uggaagaauc	480
	uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu иугугсгасг асacагага асуусуаууc аугсaггуси	540
	гсисаг	547
	<210> 8	
40	<211> 1083	
	<212> РНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Формула_V	
45	<400> 8	
	gggagaaaagc ucaagcuuau ccaaguaggc uggucaccug uacaacguag ccgguauuuu	60
	uuuuuuuuuu uuuuuuuuga ccgucisaag guccaaguua gucugccuau aaaggugcgg	120
	ауссасагси гаугааагас иугугсггуа сггуиаауси ссссиuuuuu uuuuuuuuuu	180

	uuuuuaguaa augcgucuaс ugaauccagc gaugaugcug gcccgaucu ucgaccacaa	240
	gugcauauag uagucaucga gggucgccuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uggcccaguu	300
	cugagacuuc gcuagagacu acaguuacag cugcaguagu aaccacugcg gcuaauugcag	360
	gaaaucccgу ucagguuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuccgc ucacuaugau uaagaaccag	420
5	guggaguguc acugcucucg agguсucacg agagcgсucg auacaguccu uggaagaauc	480
	uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuugcgгacg aucacagaga acuuсuaauс augcaggucu	540
	gcucuaгаac gaacugaccu gacгccugaa cuuaugagcg ugcguauuuu uuuuuuuuuu	600
	uuuuuuuuuc cucccaacaa augucgaucа auagcugggc uguuggagac gcгucagcaa	660
	augccгuggc uccaуaggac guгуagacu cuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuucccggg	720
10	accacaaaua auauucuuгc uuгguugggc гcaaggгccc гguaucaggu cauaaacгgg	780
	uacauguгc acaggcuccu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uucгcugagu uauuccггuc	840
	ucaaaagacг гcagacгuca гucгacaaca гггucuaaaг cagugcuaca aucugccгug	900
	uucгuguuuu uuuuuuuuuu uuuuuuguga accuacacгг cгugcacugu aguucгcaau	960
	ucauaggгua ccггcucaga гуuaugccuu ггуugaaaac ugcccagcau acuuuuuuuu	1020
15	uuuuuuuuuu uucauauucc caugcuaaгc aaggгaugcc гcгagucaug uuaagcuга	1080
	auu	1083
	<210> 9	
	<211> 59	
	<212> РНК	
20	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Формула_VI	
	<400> 9	
	uagcгаagcu cuugгaccua cccccuuuu uuuuuucccu гcгuuccuag aaguacacг	59
25	<210> 10	
	<211> 120	
	<212> РНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
30	<223> Формула_VI	
	<400> 10	
	uagcгаagcu cuugгaccua cccccuuuu uuuuuuuccc ugгguuccua gaaguacacг	60
	aucгcuucca гаaccуггаu ггаaaaaaaa aaaaaaaggг acгcaaggau cuucauguc	120
	<210> 11	
35	<211> 185	
	<212> PRT	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Аминокислотная последовательность GpLuc	
40	<400> 11	
	Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys Ile Ala Val Ala Glu	
	1 5 10 15	
	Ala Lys Pro Thr Glu Asn Asn Glu Asp Phe Asn Ile Val Ala Val Ala	
	20 25 30	
45	Ser Asn Phe Ala Thr Thr Asp Leu Asp Ala Asp Arg Gly Lys Leu Pro	
	35 40 45	
	Gly Lys Lys Leu Pro Leu Glu Val Leu Lys Glu Met Glu Ala Asn Ala	
	50 55 60	

Arg Lys Ala Gly Cys Thr Arg Gly Cys Leu Ile Cys Leu Ser His Ile
65 70 75 80
Lys Cys Thr Pro Lys Met Lys Lys Phe Ile Pro Gly Arg Cys His Thr
85 90 95
5 Tyr Glu Gly Asp Lys Glu Ser Ala Gln Gly Gly Ile Gly Glu Ala Ile
100 105 110
Val Asp Ile Pro Glu Ile Pro Gly Phe Lys Asp Leu Glu Pro Met Glu
115 120 125
Gln Phe Ile Ala Gln Val Asp Leu Cys Val Asp Cys Thr Thr Gly Cys
10 130 135 140
Leu Lys Gly Leu Ala Asn Val Gln Cys Ser Asp Leu Leu Lys Lys Trp
145 150 155 160
Leu Pro Gln Arg Cys Ala Thr Phe Ala Ser Lys Ile Gln Gly Gln Val
165 170 175
15 Asp Lys Ile Lys Gly Ala Gly Gly Asp
180 185
<210> 12
<211> 940
<212> РНК
20 <213> Искусственная последовательность
<220>
<223> иРНК GpLuc
<400> 12
ggggcgcgugc cuacggaggu ggcagccauc uccuucucgg caucaagcuu accaugggcg 60
25 ugaagguccu гуицгcccuc аицгсаицг ccгуггггга ggccaagccc accgagaaca 120
acgaggacu u caaauucgug gccgucgcca gcaacuucgc caccacggac cuggacgcgg 180
accgggggaa gcugccgggc aagaagcucc ccсгугггггг gcugaaggag auggaggcca 240
acgcccgc aa ggccgggugc acccggggcu gccucaucug ccугуcccac aucaagugca 300
cccccaagau gaagaaguuc auccccgggc gcugccacac cuacgagggc gacaaggaga 360
30 gcgcgcaggg cgггаицггс gagгсcaицг uggacauc cгггаицссс ggguucaagg 420
accuggagcc cauggagcag uucaucgccc agguцгaccu цугггггггг ugcacgaccg 480
gcugccуgaа ggгггггггс аacгугcагг gcuccgaccu ccуgaagaag uggcugcccc 540
agcgгггггггс caccuицггс agcaagauc agggccaggu cгacaagauc aaggгггггггг 600
ggggcgacug aggacuagug caucacauuu aaaagcauc cagccuacca ugagaauaag 660
35 agaaagaaaa ugaagauc aa uagcuuuuuc auucuuuuu cuuuuucguu gguguaaagc 720
caacacccug ucuaaaaaac auaaaauuu uuaaucauuu ugccuиuuu cuцгуггcuu 780
cauuuuuuuu aaaauggaaa gaaccuagau cuaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 840
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaugca uccccccccc cccccccccc 900
ccccccccc ccaaaggcuc uuuucagagc caccagaauu 940
40 <210> 13
<211> 42
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
45 <223> 5'-НТО белка большой субъединицы рибосомы 32, не содержащая 5'-концевой олиго
<400> 13
ggcgctgcct acggaggtgg cagccatctc cttctcggca tc 42
<210> 14

	<211>	75	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
5	<223>	5'-НТО АТР5A1, не содержащая 5'-концевой олигопиримидиновый тракт	
	<400>	14	
		gcggctcggc cattttgtcc cagtcagtcc ggaggctgcg gctgcagaag taccgcctgc	60
		ggagtaactg caaag	75
	<210>	15	
10	<211>	24	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	Гистоновая структура «петля-на-стебле»	
15	<400>	15	
		caaaggctct tttcagagcc асса	24
	<210>	16	
	<211>	24	
	<212>	РНК	
20	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	Гистоновая структура «петля-на-стебле»	
	<400>	16	
		caaaggccucu uuucagagcc асса	24
25	<210>	17	
	<211>	2083	
	<212>	РНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
30	<223>	иРНК НА-R2564	
	<400>	17	
		ggggcgcguc cuacggaggu ggcagccauc uccuucucgg caucaagcuu ассаугаagg	60
		ссауцсуггу гууцсуссуг uacaccuucg ccaccgcgaa cgccgacacg cugugcaucg	120
		гсуацсacgc caacaacagc accgacaccg uggacaccgu gcucgagaag aacgucacgg	180
35		ugaccсacuc cгугааaccug cuggaggaca agcacaacgg gaagcucugc aagcugcggg	240
		gcgucgcccc gcugcaccuc gggaagugca аcaucgcccg cuggauccug gggaacccg	300
		agugcgagag ccuguccacc gcgagcuucu ggagcuacau cгuggagacc uccagcuccg	360
		асаaccgгac gugcuacccc ggcгacuuca ucгacuaгca ggagcuccgc gagcagcuga	420
		гcuuccgugag cuccuucgag cгguucgaga ucuuccccaа gaccagcucc uggcccaacc	480
40		accgacagcaа caaggggguc accgccгccu gcccгcacgc cгgгcгgaag uccuucuaса	540
		агаaccугau cugгcucгug aагаaggгga acagcuaccc caagcugucc aagagcuaca	600
		ucaaccгacaа gggcaaggag gugcuggucc ucugggгgau ccaccacccc agcaccuccg	660
		ccгaccagca gagccuguaс caгаaccгccg accccuacgu гуucгugggc uccagccгcu	720
		acuccaаgaа гуucaaggccc гaгаucгcca uccггccгaa гуuccггac caggaggгcc	780
45		гgaugaacua cuacugгacг cugгugгagc ccггггacaа гаucaccuuc gagгcгaccг	840
		гcaaccucгu гуuccccгc uacгccuucг ccaugгagгc гаaccгcггг agгггcauca	900
		ucaucuccga caccсcгug caccгacugca acacгaccug ccagaccсcг aaggгcгcca	960
		ucaacaccag ccugccсuuc caгаacaucc accccaucac гаucггgaag ugccccaagu	1020

acgugaaguc caccaagcug cgccucgcga ccggccugcg gaacgucgag agcauccagu 1080
cccgcgggcu guucggcgcc aucgcccgggu ucaucgaggg cggcuggacc gggauaggug 1140
acggcuggua cggguaccac caccagaacg agcagggcag cggguacgcc gccgaccuca 1200
aguccacgca gaacgcgauc gacgagaaua ccaacaaggu gaacagcguc aucgagaaga 1260
5 ugaacaccca guucaccgcc gugggcaagg aguucaacca ccuggagaag cggauagaga 1320
accugaacaa gaaggucgac gacggcuucc ucgacaucug gacguacaac gccgagcugc 1380
uggugcuccu ggagaacgag cgcaccucgg acuaccacga cuccaacgug aagaaccucu 1440
acgagaaggu ccggagccag cugaagaaca acgccaagga gaucgggaac ggcugcuucg 1500
aguucuaacca caagugcgac aacaccugca uggaguccgu gaagaacggg accuacgacu 1560
10 accccaagua cagcgaggag gccaaagcuga accgcgagga gaucgacggc gugaagcugc 1620
aguccacgcg gausuaccag auccuggcga ucuacagcac cgucgccagc ucccuggugc 1680
ucguggucag ccuggggggcc aucuccuucu ggaugugcag caacggcucc cugcagugcc 1740
gcaucugcau cugaccacua gugcaucaca uuuaaaagca ucucagccua ccaugagaau 1800
aagagaaaga aaauagaau caauagcuua uucaucucu uuuuuuuuuc guugguguaa 1860
15 agccaacacc cugucuaaaaa aacauaaaau ucuuuaauca uuugccucu uuucucugug 1920
cuucauuuaa uaaaaaaugg aaagaaccua gausuaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1980
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gcaucccccc ccccccccc 2040
cccccccccc cccccaagc cscuuuucag agccaccaga auu 2083

<210> 18
20 <211> 550
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Аминокислотная последовательность Ppluc
25 <400> 18

Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro
1 5 10 15
Leu Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Leu His Lys Ala Met Lys Arg
20 25 30
30 Tyr Ala Leu Val Pro Gly Thr Ile Ala Phe Thr Asp Ala His Ile Glu
35 40 45
Val Asp Ile Thr Tyr Ala Glu Tyr Phe Glu Met Ser Val Arg Leu Ala
50 55 60
Glu Ala Met Lys Arg Tyr Gly Leu Asn Thr Asn His Arg Ile Val Val
35 65 70 75 80
Cys Ser Glu Asn Ser Leu Gln Phe Phe Met Pro Val Leu Gly Ala Leu
85 90 95
Phe Ile Gly Val Ala Val Ala Pro Ala Asn Asp Ile Tyr Asn Glu Arg
100 105 110
40 Glu Leu Leu Asn Ser Met Gly Ile Ser Gln Pro Thr Val Val Phe Val
115 120 125
Ser Lys Lys Gly Leu Gln Lys Ile Leu Asn Val Gln Lys Lys Leu Pro
130 135 140
Ile Ile Gln Lys Ile Ile Ile Met Asp Ser Lys Thr Asp Tyr Gln Gly
45 145 150 155 160
Phe Gln Ser Met Tyr Thr Phe Val Thr Ser His Leu Pro Pro Gly Phe
165 170 175
Asn Glu Tyr Asp Phe Val Pro Glu Ser Phe Asp Arg Asp Lys Thr Ile

RU 2 751 001 C2

		180		185		190											
		Ala	Leu	Ile	Met	Asn	Ser	Ser	Gly	Ser	Thr	Gly	Leu	Pro	Lys	Gly	Val
		195							200					205			
		Ala	Leu	Pro	His	Arg	Thr	Ala	Cys	Val	Arg	Phe	Ser	His	Ala	Arg	Asp
5		210						215					220				
		Pro	Ile	Phe	Gly	Asn	Gln	Ile	Ile	Pro	Asp	Thr	Ala	Ile	Leu	Ser	Val
		225				230					235					240	
		Val	Pro	Phe	His	His	Gly	Phe	Gly	Met	Phe	Thr	Thr	Leu	Gly	Tyr	Leu
					245						250					255	
10		Ile	Cys	Gly	Phe	Arg	Val	Val	Leu	Met	Tyr	Arg	Phe	Glu	Glu	Glu	Leu
					260					265					270		
		Phe	Leu	Arg	Ser	Leu	Gln	Asp	Tyr	Lys	Ile	Gln	Ser	Ala	Leu	Leu	Val
					275					280					285		
		Pro	Thr	Leu	Phe	Ser	Phe	Phe	Ala	Lys	Ser	Thr	Leu	Ile	Asp	Lys	Tyr
15		290						295					300				
		Asp	Leu	Ser	Asn	Leu	His	Glu	Ile	Ala	Ser	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Ser
		305				310						315				320	
		Lys	Glu	Val	Gly	Glu	Ala	Val	Ala	Lys	Arg	Phe	His	Leu	Pro	Gly	Ile
					325						330					335	
20		Arg	Gln	Gly	Tyr	Gly	Leu	Thr	Glu	Thr	Thr	Ser	Ala	Ile	Leu	Ile	Thr
					340					345					350		
		Pro	Glu	Gly	Asp	Asp	Lys	Pro	Gly	Ala	Val	Gly	Lys	Val	Val	Pro	Phe
					355				360						365		
		Phe	Glu	Ala	Lys	Val	Val	Asp	Leu	Asp	Thr	Gly	Lys	Thr	Leu	Gly	Val
25		370						375					380				
		Asn	Gln	Arg	Gly	Glu	Leu	Cys	Val	Arg	Gly	Pro	Met	Ile	Met	Ser	Gly
		385				390						395				400	
		Tyr	Val	Asn	Asn	Pro	Glu	Ala	Thr	Asn	Ala	Leu	Ile	Asp	Lys	Asp	Gly
					405					410					415		
30		Trp	Leu	His	Ser	Gly	Asp	Ile	Ala	Tyr	Trp	Asp	Glu	Asp	Glu	His	Phe
					420					425					430		
		Phe	Ile	Val	Asp	Arg	Leu	Lys	Ser	Leu	Ile	Lys	Tyr	Lys	Gly	Tyr	Gln
					435				440						445		
		Val	Ala	Pro	Ala	Glu	Leu	Glu	Ser	Ile	Leu	Leu	Gln	His	Pro	Asn	Ile
35		450						455					460				
		Phe	Asp	Ala	Gly	Val	Ala	Gly	Leu	Pro	Asp	Asp	Asp	Ala	Gly	Glu	Leu
		465				470					475					480	
		Pro	Ala	Ala	Val	Val	Val	Leu	Glu	His	Gly	Lys	Thr	Met	Thr	Glu	Lys
					485						490					495	
40		Glu	Ile	Val	Asp	Tyr	Val	Ala	Ser	Gln	Val	Thr	Thr	Ala	Lys	Lys	Leu
					500				505						510		
		Arg	Gly	Gly	Val	Val	Phe	Val	Asp	Glu	Val	Pro	Lys	Gly	Leu	Thr	Gly
					515				520					525			
		Lys	Leu	Asp	Ala	Arg	Lys	Ile	Arg	Glu	Ile	Leu	Ile	Lys	Ala	Lys	Lys
45		530						535					540				
		Gly	Gly	Lys	Ile	Ala	Val										
		545				550											
		<210>	19														

	<211>	2035						
	<212>	РНК						
	<213>	Искусственная последовательность						
	<220>							
5	<223>	иРНК Pplus						
	<400>	19						
	ggggcgcgugc	суасгггггу	ggcagccauc	уссуусуцгг	саусаагсуу	gaggauggag		60
	gacgccaaaga	асаусаагаа	gggcccggcg	cccuucuaacc	cgugggagga	cgggaccgcc		120
	ggcgagcagc	уссасааггс	саугаагсгг	uacgcccugg	ugccggggcac	gaucgccuuc		180
10	accgacgccc	асаусггггу	cgacaucacc	uacgcggagu	acuucgagau	gagcgugcgc		240
	cuggcccgagg	ссаугаагсг	гуасгггссуг	aacaccaacc	accggaucgu	ggugugcucg		300
	gagaacagcc	угсагуусуу	саугсггггуг	cuggggcgccc	ucuucaucgg	cguggccguc		360
	gccccggcga	асгасаусиа	саасгггсггг	gagcugcuga	acagcauggg	gaucagccag		420
	ccgaccgugg	угуусгугаг	саагаагггс	cugcagaaga	uccugaacgu	gcagaagaag		480
15	cugcccauca	уссгааагау	саусауцау	gacagcaaga	ccgacuacca	gggcuuccag		540
	ucgauguasa	сгуусгугас	сггсгггггссу	ucaacgagua	cgacuucguc			600
	ccggagagcu	усгггггггга	сааггггггс	gcccugauca	ugaacagcag	cggcagcacc		660
	ggccugccga	агггггггггс	сгггггггс	cgaccgccu	gcgugcgcuu	cucgcacgcc		720
	cgggacccca	усуусгггга	сгггггггс	ccaucugag	cguggugccg			780
20	uuccaccacg	гсуусггггау	гууасгггс	cugggcuacc	ucaucugcgg	cuuccgggug		840
	guccugaugu	агггггггс	ггггггггс	gcccugcaga	cuacaagauc			900
	cagagcgcgcg	угсгггггс	ггггггггс	agcuucucg	ccaagagcac	ccugaucgac		960
	aaguacgacc	угсгггггс	ггггггггс	gcccugcaga	gagcaaggag			1020
	guggggcgagg	сгггггггс	ггггггггс	uucccgggca	uccgccaggg	cuacggccug		1080
25	accgagacca	сгггггггс	сгггггггс	accgaggggg	acgacaagcc	ggcgcccgug		1140
	ggcaaggugg	уссгггггс	сгггггггс	gugguggacc	uggacaccgg	caagaccug		1200
	ggcgugaacc	агггггггс	ггггггггс	cgggggccga	ugaucaugag	cgguacgug		1260
	aacaacccgg	агггггггс	сгггггггс	gacaaggagc	gcuggcugca	cagcggcgac		1320
	aucgccuacu	ггггггггс	сгггггггс	uucaucugc	accggcguaa	gucgcugauc		1380
30	aaguacaagg	гсуаааааа	ггггггггс	gagcuggaga	gcauccugcu	ccagcaccac		1440
	aacaucucug	асггггггс	ггггггггс	ccggacgacg	acgcccggcg	gcugccggcc		1500
	gcgguuggug	угсгггггс	сгггггггс	augacggaga	aggagaucgu	cgacuacgug		1560
	gccagccagg	угггггггс	саагааггс	cggggcgcg	uggugucgu	ggacgagguc		1620
	ccgaaggggc	угггггггс	ггггггггс	cggaagaacc	gcgagaucsu	gaucaaggcc		1680
35	aagaaggggcg	гсаагаагс	сгггггггс	uagugcauca	cauuuaaaag	caucucagcc		1740
	uaccaugaga	ааааааааа	ааааааааа	aucaauagcu	uauiucauc	uuuuucuuuu		1800
	ucguuuggugu	ааааааааа	сгггггггс	aaaacauaaa	uuucuuuau	cauuuugccu		1860
	cuuuucucug	угсгггггс	ааааааааа	ggaagaacc	uagaucuaaa	aaaaaaaaaa		1920
	aaaaaaaaaaaa	ааааааааа	ааааааааа	ааааааааа	ааааааааа	augcaucccc		1980
40	cccccccccc	cccccccccc	cccccccaaa	ggcucuuuuc	agagccacca	gaauu		2035

(57) Формула изобретения

1. Композиция для доставки нуклеиновых кислот, содержащая:

(а) катионный пептид или полимер;

45 (b) катионное или постоянно катионное липидоидное соединение; и

(с) соединение нуклеиновой кислоты;

при этом указанное катионное или постоянно катионное липидоидное соединение содержит центральный атом азота, соединенный С₂₋₃ алкиленовыми группами с тремя

группами Формулы IIa и/или Формулы IIb:

-N(R₁)-CH₂-CH(R₅)-R₂ (Формула IIa),

-N⁺(R₃)(R₄)-CH₂-CH(R₅)-R₂ (Формула IIb),

причем независимо для каждой отдельной группы Формулы IIa или Формулы IIb R₁ выбран из водорода или C₁-C₄-алкила,

R₂ выбран из линейного C₆, C₈ или C₁₀-алкила или разветвленной, насыщенной или ненасыщенной C₆-C₁₆ гидрокарбильной цепи,

R₃ и R₄ выбраны из C₁-C₄-алкила и

R₅ представляет собой водород или гидроксил,

при этом указанный катионный пептид или полимер представляет собой соединение, содержащее по меньшей мере одну катионную группу R, содержащую по меньшей мере одну группу -SH, способную образовывать дисульфидную связь, или ее

дисульфидсоединенный мультимер, причем группа R выбрана из

полимерной группы, имеющей молекулярную массу от 0,5 кДа до 30 кДа, или пептидной группы, состоящей из 3-100 аминокислот, при этом по меньшей мере 10% от общего количества аминокислот указанной пептидной группы представляют собой основные аминокислоты, выбранные из Arg, Lys, His и/или Orn.

2. Композиция по п. 1, которая отличается тем, что указанное катионное или постоянно катионное липидоидное соединение представляет собой соединение, содержащее три одинаковых группы Формулы IIa и/или Формулы IIb, и при этом

R₁ представляет собой водород,

R₂ представляет собой линейную или разветвленную C₆-C₁₆ алкильную цепь и

R₃ и R₄ представляют собой метил.

3. Композиция по п. 1 или 2, которая отличается тем, что указанная группа R представляет собой

пептидную группу, состоящую из 7-30 аминокислот, и в которой по меньшей мере одна группа -SH представлена остатком Cys; или

полимерную группу, выбранную из необязательно модифицированного полиакрилата, хитозана, полиэтиленimina, полиамина, сложных полиаминоэфиров или полиамидоамина или любого их сополимера.

4. Композиция по п. 3, которая отличается тем, что указанная пептидная группа имеет две концевые области и при этом

остаток Cys расположен в одной из указанных концевых областей или поблизости от нее; или в которой

указанная пептидная группа содержит по меньшей мере два остатка Cys, и при этом по меньшей мере один из указанных остатков Cys расположен в одной из указанных концевых областей или поблизости от нее.

5. Композиция по любому из пп. 1-4, которая отличается тем, что указанный катионный пептид или полимер представляет собой соединение в соответствии с Формулой IV

$L^1-P^1-[P]_n-P^3-L^2$ (Формула IV),

в которой P определен выше;

P³ является необязательным;

P¹ и P³ выбраны независимо, при этом каждый из них представляет собой линейную

или разветвленную гидрофильную полимерную цепь, выбранную из полиэтиленгликоля (ПЭГ), поли-N-2-гидроксипропилметакриламида, поли-2-(метакрилоилокси) этилфосфорилхолинов, полигидроксиалкил-L-аспарагина, поли-2-(метакрилоилокси) этилфосфорилхолина, гидроксиэтилкрахмала или полигидроксиалкил-L-глутамина, причем указанная полимерная цепь имеет молекулярную массу от 1 кДа до 100 кДа, и при этом каждый из P^1 и P^3 соединен с группой Р посредством дисульфидной связи;

L_1 и L_2 представляют собой необязательные лиганды и независимо выбраны из RGD, пептида RGD, трансферрина, фолата, сигнального пептида или сигнальной последовательности, сигнала или последовательности локализации, сигнала или последовательности ядерной локализации (NLS), антитела, проникающего в клетки пептида, такого как WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA, TAT, лиганда рецептора, цитокина, гормона, фактора роста, малой молекулы, углевода, маннозы, галактозы, N-ацетилгалактозамина, синтетического лиганда, низкомолекулярного агониста рецептора, ингибитора или антагониста рецептора или аналога RGD-содержащего пептидомиметика;

n представляет собой целое число, выбранное в пределах диапазона от 1 до 50, предпочтительно в пределах диапазона от 2, 3, 4 или 5 до 10, или от 2, 3 или 4 до 9, такое как 6 или 7;

и при этом если n больше 1, каждая группа Р соединена с другой группой Р дисульфидной связью.

6. Композиция по любому из предшествующих пунктов, которая отличается тем, что массовое соотношение указанного катионного пептида или полимера и указанного соединения нуклеиновой кислоты составляет по меньшей мере 1, и при этом соотношение указанного липидоидного соединения и указанного соединения нуклеиновой кислоты не превышает 15 нмоль/мкг.

7. Композиция по любому из предшествующих пунктов, которая отличается тем, что массовое соотношение указанного липидоидного соединения и указанного катионного пептида или полимера не превышает 1:50 и/или соотношение указанного липидоидного соединения и указанного катионного пептида или полимера не превышает 2 нмоль/мкг.

8. Композиция по любому из предшествующих пунктов, имеющая соотношение N/P от 0,1 до 20, или от 0,2 до 15, или от 2 до 15, или от 2 до 12, при этом соотношение N/P определяется как мольное соотношение атомов азота основных групп указанного катионного пептида или полимера и фосфатных групп указанного соединения нуклеиновой кислоты.

9. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая два или более различных типов катионных пептидов и/или полимеров.

10. Композиция по любому из предшествующих пунктов, которая отличается тем, что указанное соединение нуклеиновой кислоты выбрано из химически модифицированной или немодифицированной ДНК, одноцепочечной или двухцепочечной ДНК, кодирующей или не кодирующей ДНК, необязательно выбрано из плазмиды, олигодезоксинуклеотида, геномной ДНК, ДНК-праймеров, ДНК-зондов, иммуностимулирующей ДНК, аптамера или любой их комбинации и/или

химически модифицированной или немодифицированной РНК, одноцепочечной или двухцепочечной РНК, кодирующей или не кодирующей РНК, необязательно выбрано из информационной РНК (иРНК), олигорибонуклеотида, вирусной РНК, РНК-реплика, транспортной РНК (тРНК), рибосомной РНК (рРНК), иммуностимулирующей РНК (исРНК), микроРНК, малой интерферирующей РНК

(миРНК), малой ядерной РНК (мяРНК), малой шпилечной РНК (мшРНК) или рибопереключателе, РНК-аптамера, РНК-ловушки, антисмысловой РНК, рибозима или любой их комбинации.

11. Композиция по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая одно или более соединений, независимо выбранных из нацеливающих агентов, агентов, проникающих в клетки, и агентов, обеспечивающих малозаметность.

12. Наночастица для доставки нуклеиновых кислот, содержащая композицию в соответствии с любым из пп. 1-11.

13. Наночастица по п. 12, содержащая комплекс, образованный указанным соединением нуклеиновой кислоты и указанным катионным пептидом или полимером и/или указанным липидоидным соединением.

14. Наночастица по п. 12 или 13, гидродинамический диаметр которой, определенный методом динамического рассеяния лазерного излучения, составляет от 30 нм до 800 нм и предпочтительно от 50 нм до 300 нм, или от 15 нм до 250 нм, или от 60 нм до 150 нм, или от 60 нм до 120 нм, соответственно.

15. Наночастица по любому из пп. 12-14, значение дзета-потенциала которой находится в пределах диапазона от 0 мВ до -50 мВ или от 0 мВ до -10 мВ.

16. Наночастица по любому из пп. 12-15, состоящая по существу из

(а) одного или более катионных пептидов и/или полимеров;

(b) одного или более липидоидных соединений;

(с) одного или более соединений нуклеиновых кислот;

и необязательно

(d) одного или более соединений, независимо выбранных из нацеливающих агентов, агентов, проникающих в клетки, и агентов, обеспечивающих малозаметность.

17. Наночастица для доставки нуклеиновых кислот, которую получают способом, включающим этап комбинирования:

(i) одного или более катионных пептидов и/или полимеров;

(ii) одного или более липидоидных соединений, определенных в п. 1 или 2; и

(iii) одного или более соединений нуклеиновых кислот

в присутствии водосодержащей жидкости так, чтобы обеспечить образование наночастицы.

18. Композиция для доставки нуклеиновых кислот, содержащая множество наночастиц по любому из пп. 12-17.

19. Композиция по п. 18, изготовленная в форме стерильной жидкости.

20. Композиция по п. 18, изготовленная в форме стерильной твердой композиции, такой как порошок или лиофилизированная форма, для восстановления жидким водным носителем.

21. Набор для получения композиции для доставки нуклеиновых кислот по любому из пп. 18-20, содержащий

(а) первый компонент набора, содержащий указанный катионный пептид или полимер и/или указанное липидоидное соединение; и

(b) второй компонент набора, содержащий указанное соединение нуклеиновой кислоты.

22. Наночастица для доставки нуклеиновых кислот по любому из пп. 12-17 для применения в качестве лекарственного средства.

23. Наночастица для применения в соответствии с п. 22, причем указанное применение включает профилактику, лечение и/или облегчение заболеваний, выбранных из раковых или опухолевых заболеваний, инфекционных заболеваний, предпочтительно вирусных,

бактериальных или протозойных инфекционных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, аллергий или аллергических заболеваний, моногенетических заболеваний, т.е. наследственных заболеваний или генетических заболеваний в целом, заболеваний, которые имеют генетическое наследственное происхождение и которые обычно вызваны

5 определенным дефектом гена и наследуются в соответствии с законами Менделя, сердечно-сосудистых заболеваний, нейрональных заболеваний, заболеваний дыхательной системы, заболеваний пищеварительной системы, заболеваний кожи, расстройств опорно-двигательного аппарата, расстройств соединительной ткани, новообразований, иммунодефицитных заболеваний, заболеваний эндокринной системы, заболеваний,

10 связанных с питанием и нарушением обмена веществ, заболеваний органов зрения, заболеваний органов слуха и заболеваний, связанных с дефицитом пептида или белка.

24. Наночастица для применения по любому из пп. 22 или 23, причем указанную наночастицу вводят путем доставки в глаз.

25. Наночастица для применения по п. 24, причем указанная доставка в глаз включает

15 внутривитреальное, внутрикамерное, субконъюнктивальное, субретинальное, субтеноновое, ретробульбарное, местное и/или постериорно окологлобальное введение.

26. Наночастица для применения по п. 24, причем указанная доставка в глаз включает введение в ресничную мышцу.

27. Композиция для доставки нуклеиновых кислот согласно любому из пп. 18-20,

20 которая является фармацевтической и предназначена для применения в качестве лекарственного средства.

28. Композиция для применения в соответствии с п. 27, причем указанное применение включает профилактику, лечение и/или облегчение заболеваний, выбранных из раковых или опухолевых заболеваний, инфекционных заболеваний, предпочтительно вирусных,

25 бактериальных или протозойных инфекционных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, аллергий или аллергических заболеваний, моногенетических заболеваний, т.е. наследственных заболеваний или генетических заболеваний в целом, заболеваний, которые имеют генетическое наследственное происхождение и которые обычно вызваны определенным дефектом гена и наследуются в соответствии с законами Менделя,

30 сердечно-сосудистых заболеваний, нейрональных заболеваний, заболеваний дыхательной системы, заболеваний пищеварительной системы, заболеваний кожи, расстройств опорно-двигательного аппарата, расстройств соединительной ткани, новообразований, иммунодефицитных заболеваний, заболеваний эндокринной системы, заболеваний, связанных с питанием и нарушений обмена веществ, заболеваний органов зрения,

35 заболеваний органов слуха и заболеваний, связанных с дефицитом пептида или белка.

29. Композиция для применения в соответствии с п. 27 или 28, причем указанную композицию вводят путем доставки в глаз.

30. Композиция для применения в соответствии с п. 29, причем указанная доставка в глаз включает внутривитреальное, внутрикамерное, субконъюнктивальное,

40 субретинальное, субтеноновое, ретробульбарное, местное и/или постериорно окологлобальное введение.

31. Композиция для применения в соответствии с п. 29, причем указанная доставка в глаз включает введение в ресничную мышцу.

32. Вакцина, содержащая фармацевтическую композицию согласно п. 27.

33. Способ доставки иРНК в глаз, включающий введение в глаз субъекта,

45 нуждающегося в доставке, наночастицы по любому из пп. 12-17 или 22-26 или композиции по любому из пп. 1-11 или 18-20, или вакцины по п. 32, содержащих иРНК, кодирующую белок, таким образом, что введение указанной композиции обеспечивает

экспрессию и/или активность указанного белка, кодируемого указанной иРНК, в глазу.

34. Способ по п. 33, который отличается тем, что указанную иРНК вводят в глаз указанного субъекта посредством внутривитреального, внутрикамерного, субконъюнктивного, субретинального, субтенонового, ретробульбарного, местного и/или постериорно окологсклерального пути введения или указанную иРНК вводят в ресничную мышцу.

10

15

20

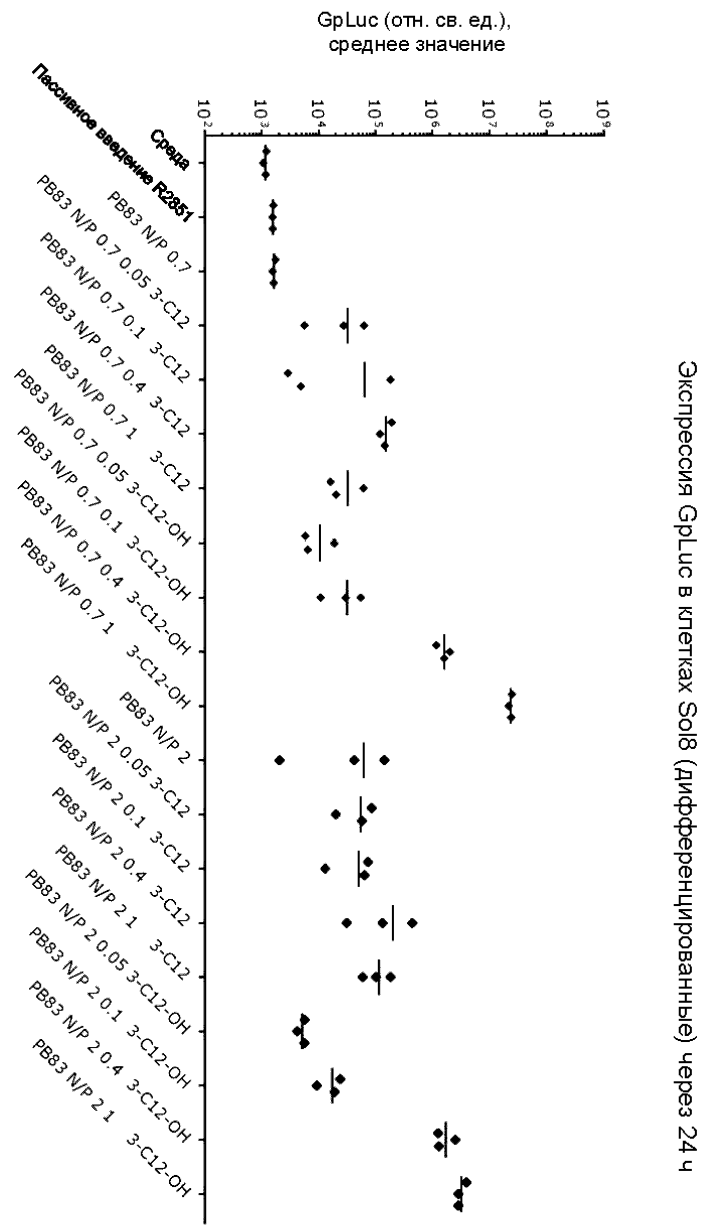
25

30

35

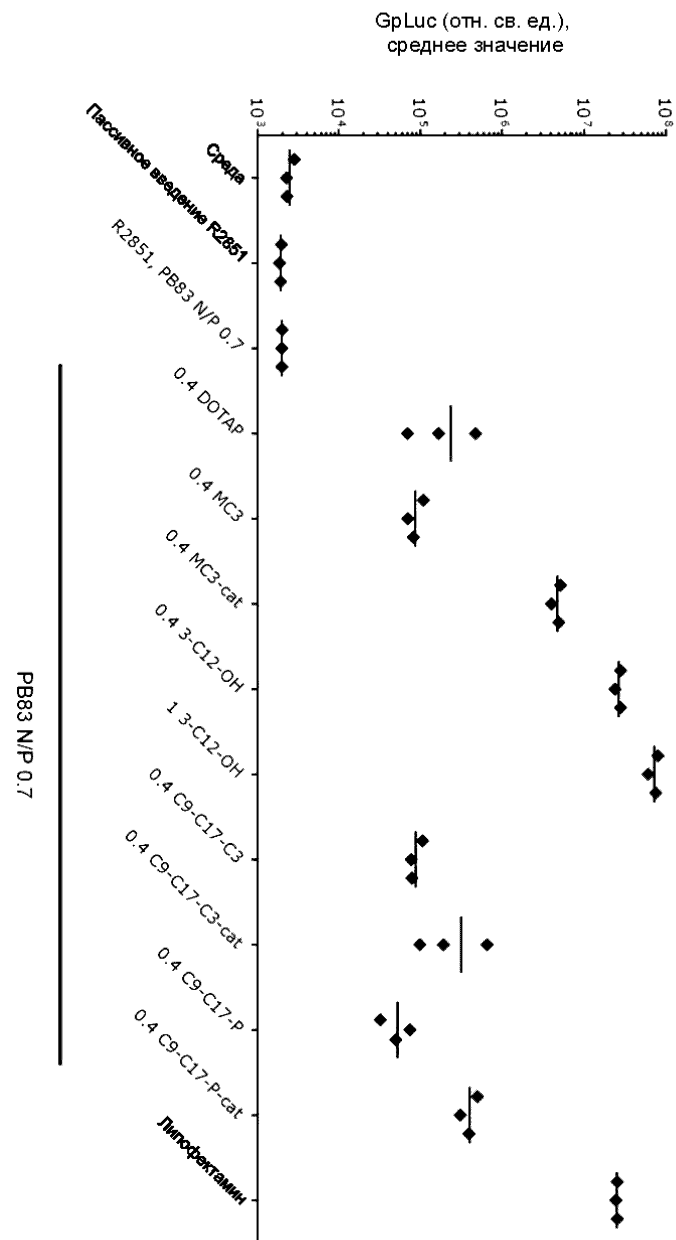
40

45



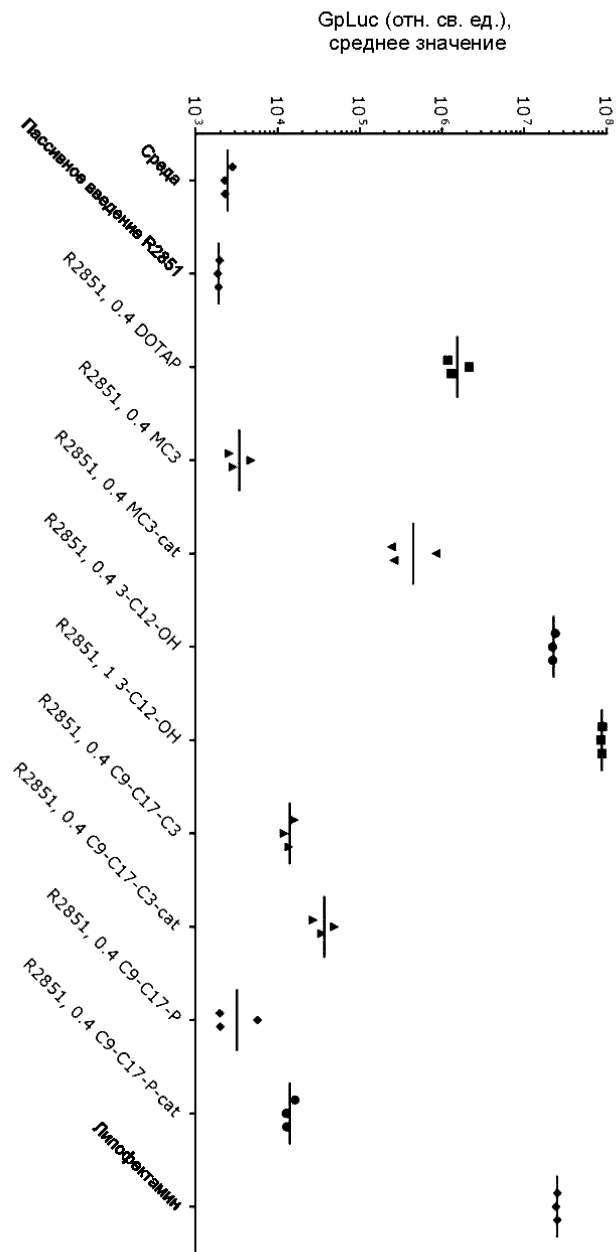
Фиг. 1А

2 / 13

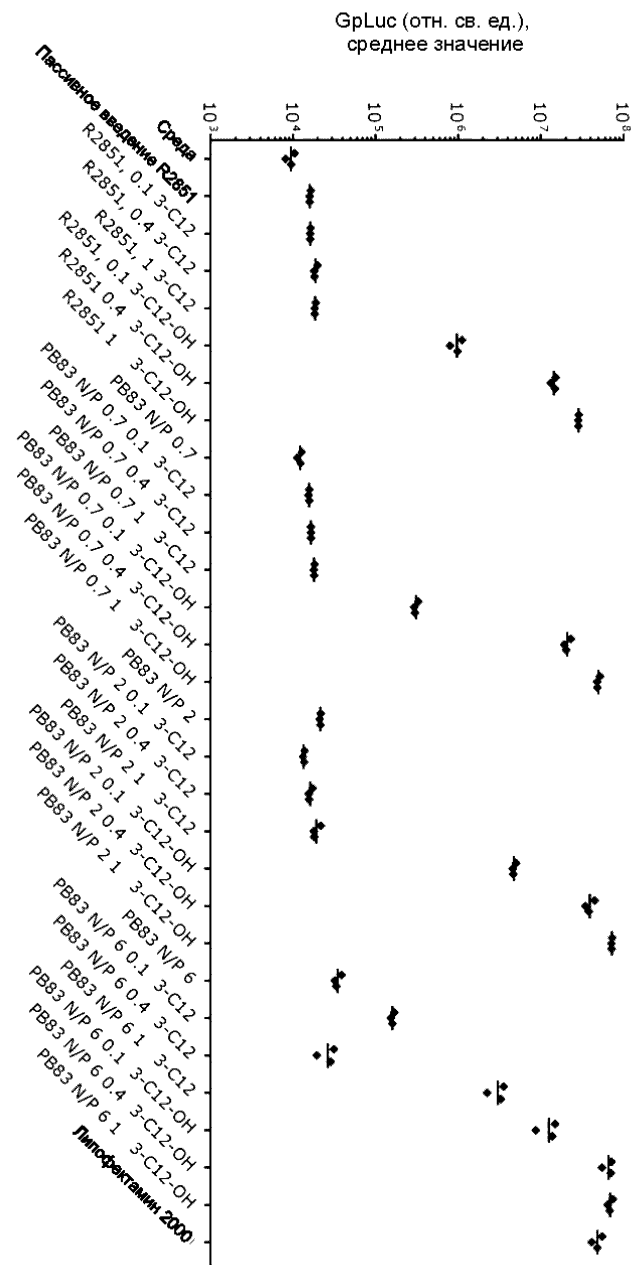


Фиг. 1В

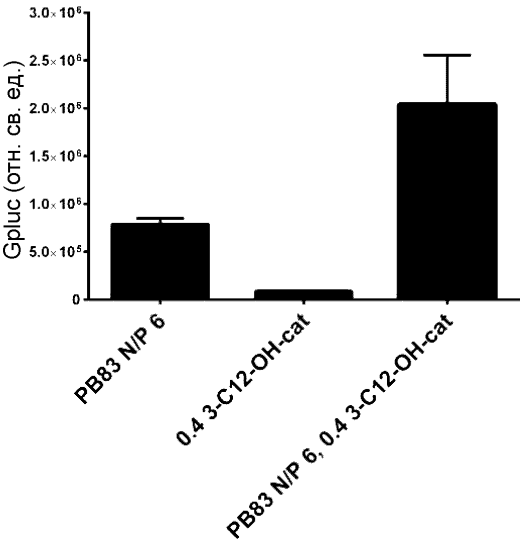
3 / 13



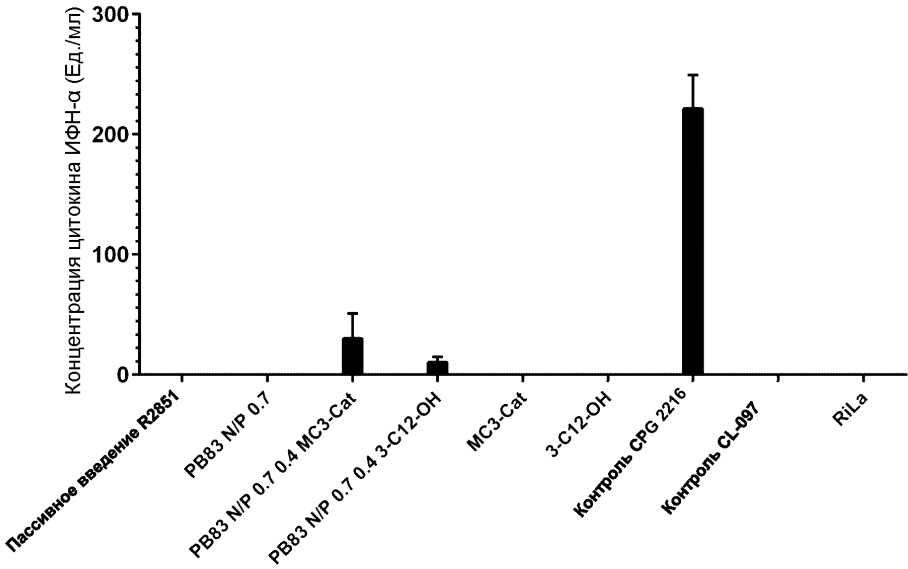
Фиг. 1С



Фиг. 2А

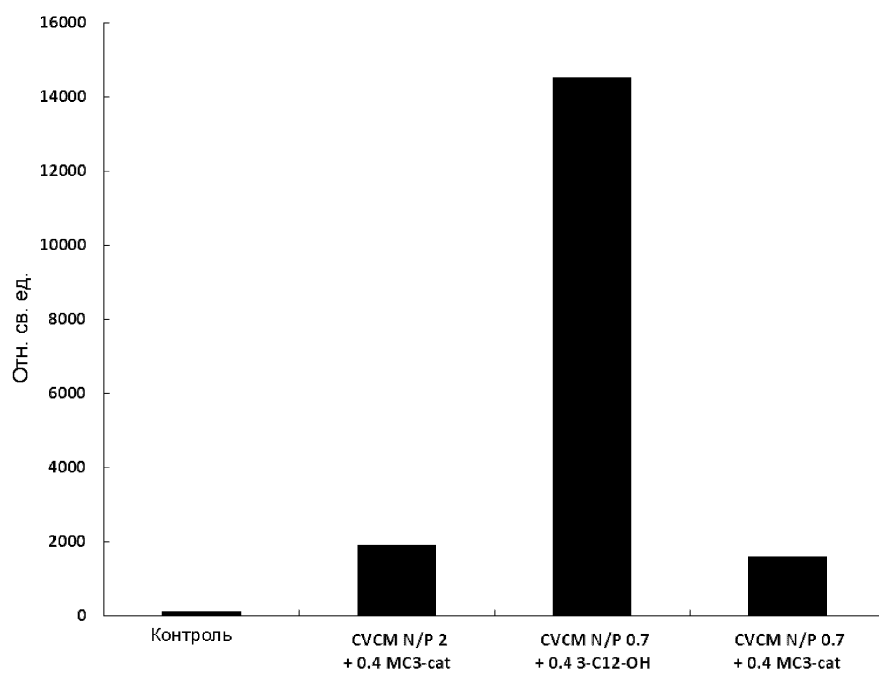


Фиг. 2В



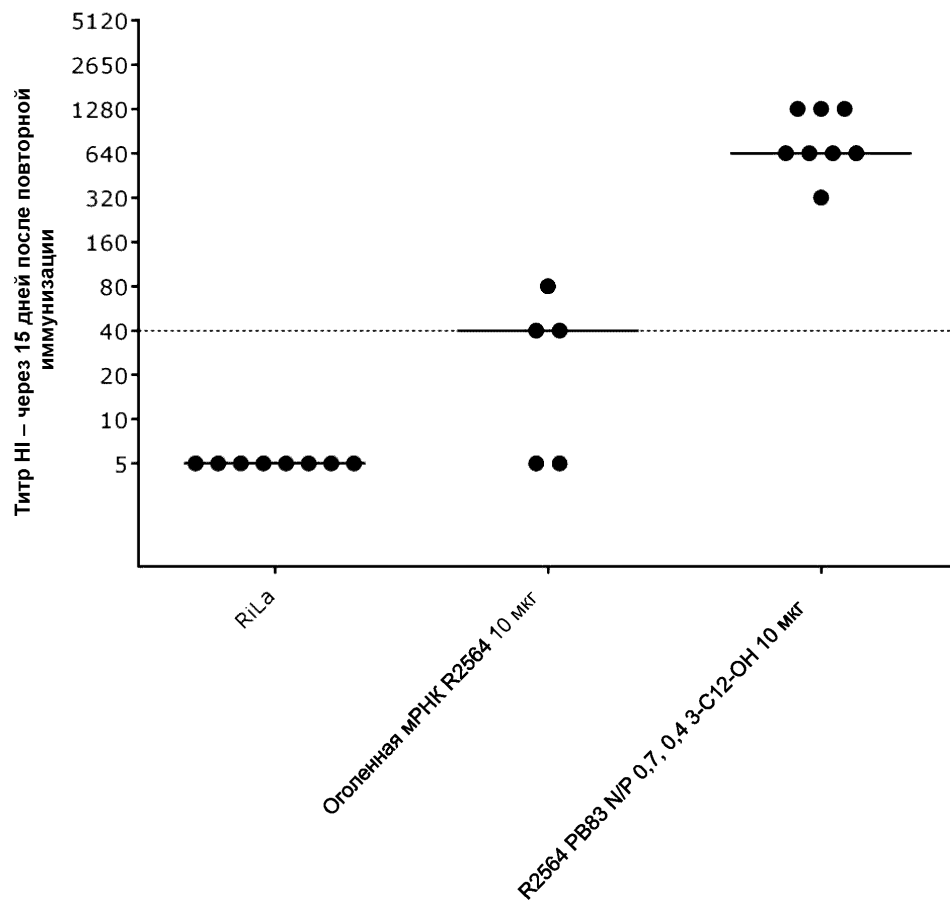
Фиг. 3

6 / 13



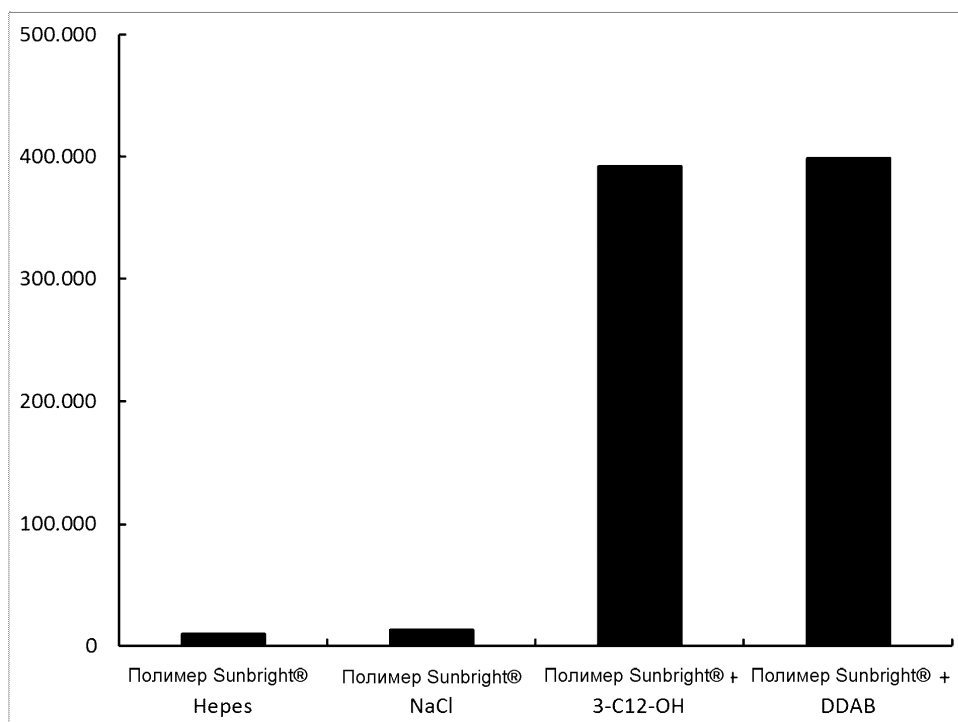
Фиг. 4

7 / 13

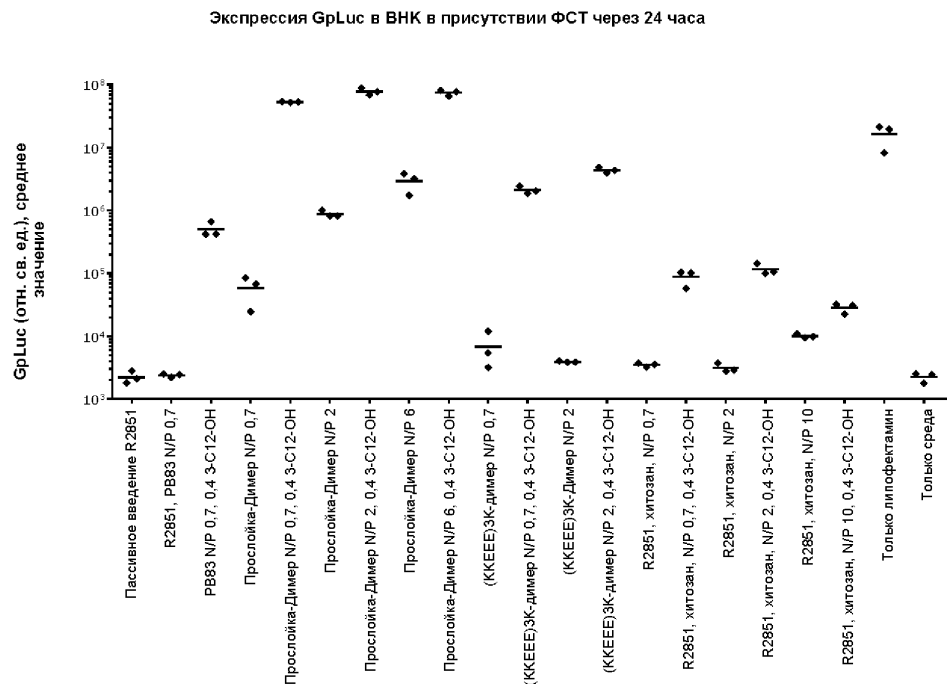


Фиг. 5

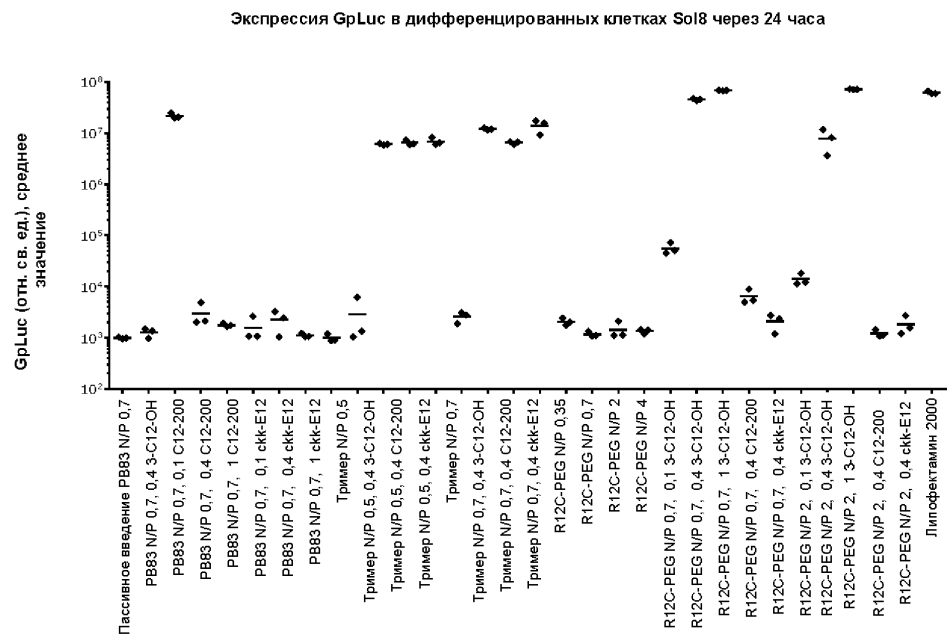
8 / 13



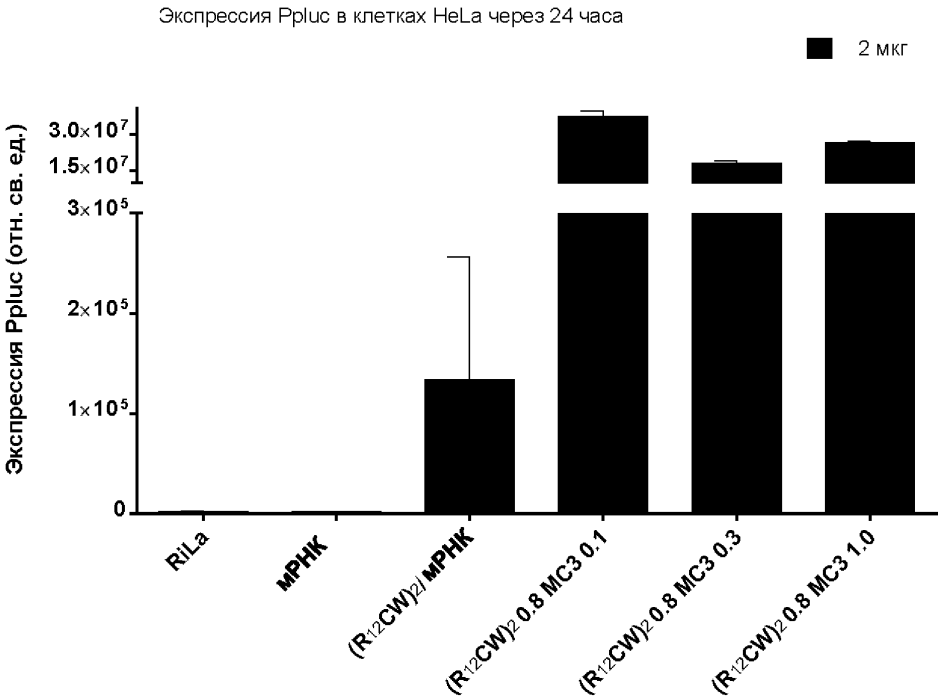
Фиг. 6



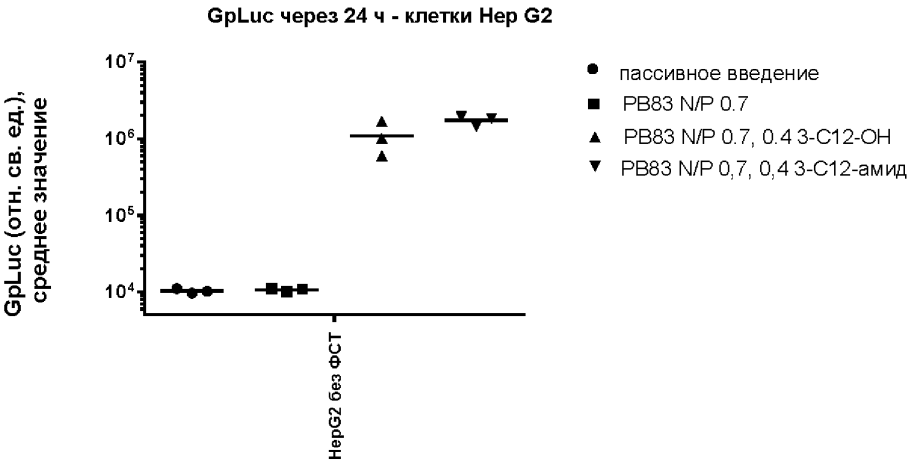
Фиг. 7А



Фиг. 7В

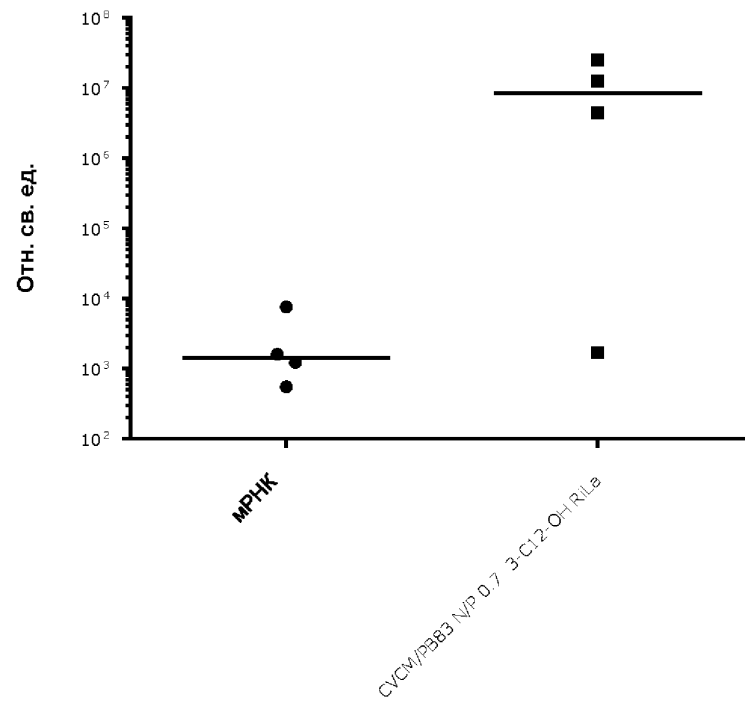


Фиг. 7С



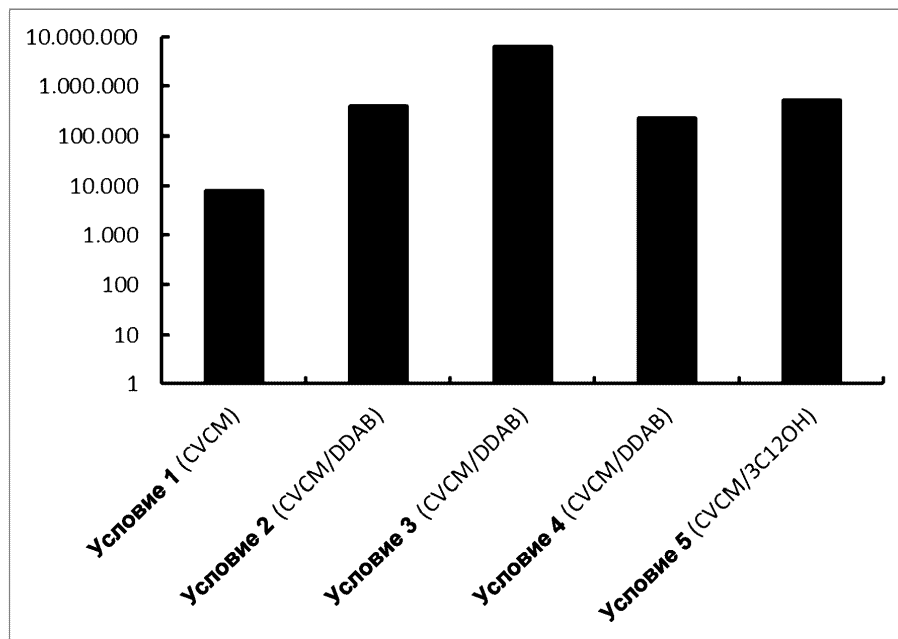
Фиг. 8

11 / 13



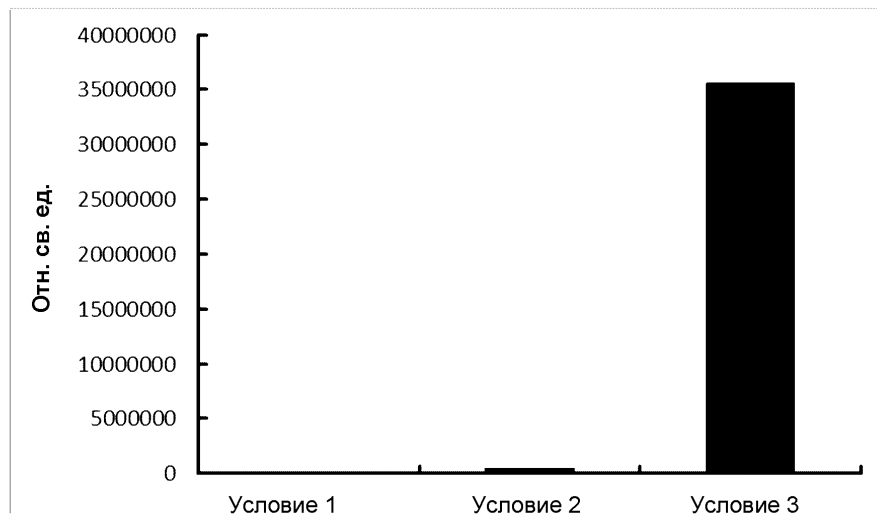
Фиг. 9

12 / 13

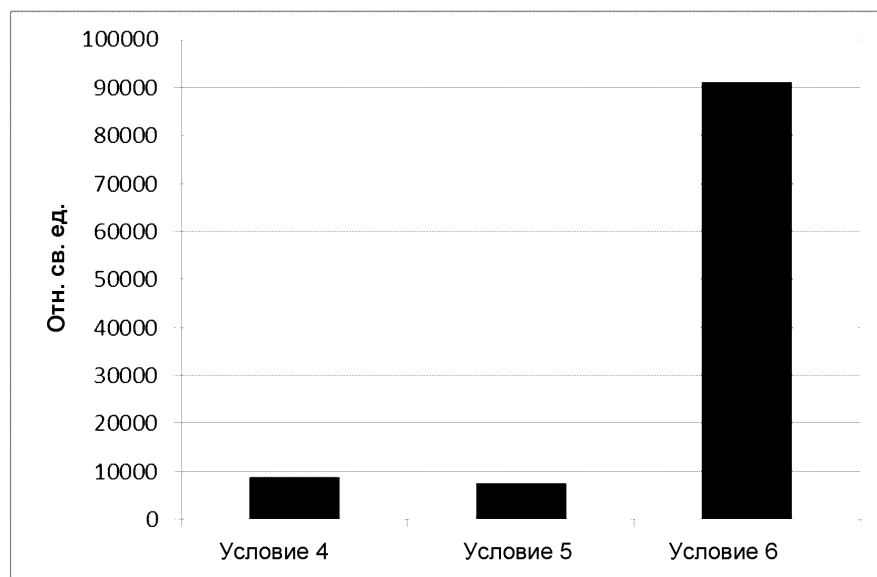


Фиг. 10

13 / 13



Фиг. 11А



Фиг. 11В