

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390896** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.07.31

(22) Дата подачи заявки
2018.10.31

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)

(54) **ЛИПИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ МОДИФИЦИРОВАННОЙ РНК,
КОДИРУЮЩЕЙ ПОЛИПЕПТИД VEGF-A**

(31) **62/579,671**

(32) **2017.10.31**

(33) **US**

(62) **202090919; 2018.10.31**

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

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

(72) Изобретатель:
**Ханссон Кенни Микаэль (SE),
Бененато Керри (US), Вогберг Мария,
Полссон Анника, Фритше-Даниелсон
Регина (SE)**

(57) Данное изобретение относится к наночастицам, содержащим липидную компоненту и модифицированную РНК, кодирующую полипептид VEGF-A. Аспекты данного изобретения дополнительно относятся к применению наночастиц, содержащих липидную компоненту и модифицированную РНК, кодирующую полипептид VEGF-A, для улучшения заживления ран у субъекта.

A2

202390896

202390896

A2

ЛИПИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ МОДИФИЦИРОВАННОЙ РНК, КОДИРУЮЩЕЙ ПОЛИПЕПТИД VEGF-A

1. ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/579 671, поданной 31 октября 2017 года, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

2. ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[002] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная ASCII-копия, созданная 31 октября 2018 г., имеет название 09963_0092-00304_SL.txt, и ее размер составляет 11 396 байта.

3. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[003] Данное изобретение относится к наночастицам, содержащим липидную компоненту и модифицированную РНК, кодирующую полипептид VEGF-A. Аспекты данного изобретения дополнительно относятся к применению наночастиц, содержащих липидную компоненту и модифицированную РНК, кодирующую полипептид VEGF-A, для улучшения заживления ран у субъекта.

4. ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[004] Сигнальные пути фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) играют центральную роль в процессе заживления ран, включая реваскуляризацию поврежденных тканей, улучшение сосудистой проницаемости и формирование новых кровеносных сосудов (ангиогенез). По-прежнему представляет собой проблему доставка средств, которые усиливают сигнальные пути VEGF-A для перспективного терапевтического воздействия, такого как улучшение заживления ран у субъекта.

[005] Были перепробованы различные способы, чтобы развить адаптируемые клинические подходы к увеличению количества белков VEGF-A в тканях-мишенях. Однако каждый из подходов имеет существенные недостатки. Например, системная доставка белка VEGF-A может привести к значительной гипотонии, и VEGF-A быстро разлагается. Контроль над экспрессией белка инкапсулированных вирусом и «голых» плазмид ДНК VEGF-A ограничен во времени, а эффективность экспрессии *in vivo* может

сильно варьироваться и не зависеть от дозы. Результатом таких недостатков является ограниченная применимость увеличения уровней VEGF-A в качестве терапевтического средства.

[006] Другой недавней разработкой является доставка терапевтических РНК, кодирующих белки VEGF-A. Однако доставка природных РНК в клетки может быть сложной из-за относительной нестабильности и низкой клеточной проницаемости таких молекул РНК. Кроме того, природные РНК могут спровоцировать активацию иммунной системы (см., например, Kaczmarek et al., "Advances in the delivery of RNA therapeutics: from concept to clinical reality," *Genome Med.*, 2017, 9: 60), что ограничивает их использование для доставки белков VEGF-A в ткани-мишени.

[007] Поэтому по-прежнему существует потребность в составах, которые обеспечивали бы эффективную и безопасную доставку РНК, кодирующих белки VEGF-A. Кроме того, по-прежнему существует потребность в альтернативных способах усиления сигнальных путей VEGF-A для перспективного терапевтического воздействия, такого как улучшение заживления ран у субъекта.

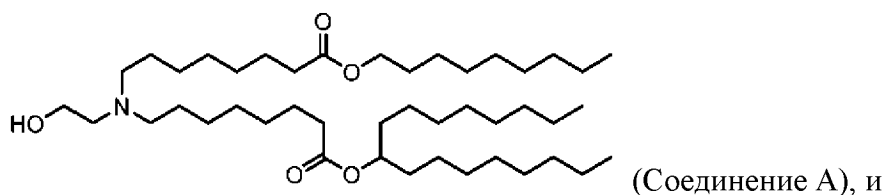
5. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[008] Данное изобретение относится к наночастицам, содержащим липидную компоненту и модифицированную РНК, кодирующую полипептид VEGF-A. Аспекты данного изобретения дополнительно относятся к применениям наночастиц, содержащих липидную компоненту и модифицированную РНК, кодирующую полипептид VEGF-A, для улучшения заживления ран у субъекта.

[009] Конкретные варианты осуществления настоящего изобретения кратко описаны ниже. Данный перечень является только иллюстративным и не исчерпывает все варианты осуществления, представленные в настоящем изобретении.

[010] Вариант осуществления 1. Наночастица, содержащая

(i) липидную компоненту, включающую соединение со структурой



(ii) модифицированную РНК, содержащую любую из последовательностей SEQ ID NO: 1 и 3-5, кодирующих полипептид VEGF-A, имеющий последовательность SEQ ID NO: 2.

[011] Вариант осуществления 2. Наночастица варианта осуществления 1, где липидная компонента дополнительно содержит фосфолипид, структурный липид и/или PEG-липид.

[012] Вариант осуществления 3. Наночастица варианта осуществления 2, где фосфолипид выбран из группы, состоящей из 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DSPC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (DOPE), 1,2-дилинолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DLPC), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-фосфохолина (DMPC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DOPC), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DPPC), 1,2-диундеканоил-sn-глицеро-фосфохолина (DUPC), 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (POPC), 1,2-ди-О-октадеценил-sn-глицеро-3-фосфохолина (18:0 Diether PC), 1-олеоил-2-холестерилгемисукциноил-sn-глицеро-3-фосфохолина (OChemPC), 1-гексадецил-sn-глицеро-3-фосфохолина (C16 Lyso PC), 1,2-дилиноленоил-sn-глицеро-3-фосфохолина, 1,2-диарахидоноил-sn-глицеро-3-фосфохолина, 1,2-дидокозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфохолина, 1,2-дифитаноил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (ME 16.0 PE), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина, 1,2-дилинолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина, 1,2-дилиноленоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина, 1,2-диарахидоноил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина, 1,2-дидокозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина, натриевой соли 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфо-гас-(1-глицерина) (DOPG), сфингомиелина и их смесей;

структурный липид выбран из группы, состоящей из холестерина, фекостерина, ситостерина, эргостерина, кампестерина, стигмастерина, брассикастерина, томатыдина, урсоловой кислоты, альфа-токоферола и их смесей; и/или

PEG-липид выбран из группы, состоящей из PEG-модифицированного фосфатидилэтаноламина, PEG-модифицированной фосфатидной кислоты, PEG-модифицированного церамида, PEG-модифицированного диалкиламина, PEG-модифицированного диацилглицерина, PEG-модифицированного диалкилглицерина и их смесей.

[013] Вариант осуществления 4. Наночастица варианта осуществления 1, где липидная компонента дополнительно содержит фосфолипид, который представляет собой DSPC, структурный липид, который представляет собой холестерин, и/или PEG-липид, который представляет собой PEG-DMG.

[014] Вариант осуществления 5. Наночастица согласно любому из вариантов осуществления 1-4, где отношение N:P составляет от примерно 2:1 до примерно 30:1.

[015] Вариант осуществления 6. Наночастица варианта осуществления 5, где отношение N:P составляет примерно 5,67:1.

[016] Вариант осуществления 7. Наночастица варианта осуществления 5, где отношение N:P составляет примерно 3:1.

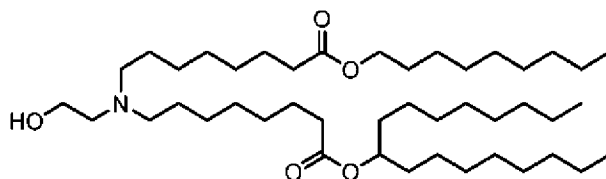
[017] Вариант осуществления 8. Наночастица согласно любому из вариантов осуществления 1-4, где массовое соотношение липидной компоненты и модифицированной РНК составляет от примерно 10:1 до примерно 100:1.

[018] Вариант осуществления 9. Наночастица варианта осуществления 8, где массовое соотношение липидной компоненты и модифицированной РНК составляет примерно 20:1.

[019] Вариант осуществления 10. Наночастица варианта осуществления 8, где массовое соотношение липидной компоненты и модифицированной РНК составляет примерно 10:1.

[020] Вариант осуществления 11. Наночастица согласно любому из вариантов осуществления 1-4, где наночастица имеет средний диаметр от примерно 50 до 100 нм.

[021] Вариант осуществления 12. Фармацевтический состав, содержащий (а) по меньшей мере одну наночастицу, содержащую (i) липидную компоненту,



включающую соединение со структурой

(Соединение А), и (ii) модифицированную РНК, содержащую любую из SEQ ID NO: 1 и 3-5, кодирующую полипептид VEGF-A, имеющий последовательность SEQ ID NO: 2; и (б) фармацевтически приемлемое формообразующее.

[022] Вариант осуществления 13. Фармацевтический состав варианта осуществления 12, где липидная компонента дополнительно содержит фосфолипид, структурный липид и/или PEG-липид.

[023] Вариант осуществления 14. Фармацевтический состав варианта осуществления 13, где фосфолипид выбран из группы, состоящей из 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DSPC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (DOPE), 1,2-дилинолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DLPC), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-фосфохолина (DMPC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DOPC), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DPPC), 1,2-диундеканоил-sn-глицеро-фосфохолина (DUPC), 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (POPC), 1,2-ди-О-октадеценил-sn-глицеро-3-фосфохолина (18:0 Diether PC), 1-олеоил-2-холестерилгемисукциноил-sn-глицеро-3-фосфохолина (OChemPC), 1-гексадецил-sn-глицеро-3-фосфохолина (C16 Lyso PC), 1,2-дилиноленоил-sn-глицеро-3-фосфохолина, 1,2-диарахидоноил-sn-глицеро-3-фосфохолина, 1,2-дидокозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфохолина, 1,2-дифитаноил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (ME 16.0 PE), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина, 1,2-дилинолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина, 1,2-дилиноленоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина, 1,2-диарахидоноил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина, 1,2-дидокозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина, натриевой соли 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфо-гас-(1-глицерина) (DOPG), сфингомиелина и их смесей;

структурный липид выбран из группы, состоящей из холестерина, фекостерина, ситостерина, эргостерина, кампестерина, стигмастерина, брассикастерина, томатыдина, урсоловой кислоты, альфа-токоферола и их смесей; и/или

PEG-липид выбран из группы, состоящей из PEG-модифицированного фосфатидилэтаноламина, PEG-модифицированной фосфатидной кислоты, PEG-модифицированного церамида, PEG-модифицированного диалкиламина, PEG-модифицированного диацилглицерина, PEG-модифицированного диалкилглицерина и их смесей.

[024] Вариант осуществления 15. Фармацевтический состав варианта осуществления 12, где липидная компонента дополнительно содержит фосфолипид, который представляет собой DSPC, структурный липид, который представляет собой холестерин, и/или PEG-липид, который представляет собой PEG-DMG.

[025] Вариант осуществления 16. Фармацевтический состав согласно любому из вариантов осуществления 12-15, где отношение N:P составляет от примерно 2:1 до примерно 30:1.

[026] Вариант осуществления 17. Фармацевтический состав варианта осуществления 16, где отношение N:P составляет примерно 5,67:1.

[027] Вариант осуществления 18. Фармацевтический состав варианта осуществления 16, где отношение N:P составляет примерно 3:1.

[028] Вариант осуществления 19. Фармацевтический состав согласно любому из вариантов осуществления 12-18, где массовое соотношение липидной компоненты и модифицированной РНК составляет от примерно 10:1 до примерно 100:1.

[029] Вариант осуществления 20. Фармацевтический состав варианта осуществления 19, где массовое соотношение липидной компоненты и модифицированной РНК составляет примерно 20:1.

[030] Вариант осуществления 21. Фармацевтический состав варианта осуществления 19, где массовое соотношение липидной компоненты к модифицированной РНК составляет примерно 10:1.

[031] Вариант осуществления 22. Фармацевтический состав согласно любому из вариантов осуществления 12-21, где наночастица имеет средний диаметр от примерно 50 до 100 нм.

[032] Вариант осуществления 23. Фармацевтический состав согласно любому из вариантов осуществления 12-22, где при введении в ткань млекопитающего или субъекту фармацевтический состав приводит к максимальной наблюдаемой концентрации C_{\max} в плазме и/или ткани полипептида VEGF-A, имеющего последовательность SEQ ID NO: 2, до уровня примерно 450 пг/мл плазмы или пг/мг ткани.

[033] Вариант осуществления 24. Фармацевтический состав согласно любому из вариантов осуществления 12-22, где при введении в ткань млекопитающего или субъекту фармацевтический состав дает суммарную площадь под кривой концентрации в плазме и/или ткани AUC_{0-t} полипептида VEGF-A, имеющего последовательность SEQ ID NO: 2, в размере до примерно 5500 пг*ч/мл плазмы или пг*ч/мг ткани.

[034] Вариант осуществления 25. Фармацевтический состав согласно любому из вариантов осуществления 12-22, где при введении в ткань млекопитающего или субъекту фармацевтический состав приводит к получению уровня полипептида VEGF-A, имеющего последовательность SEQ ID NO:2, выше чем примерно 400 пг/мг ткани в течение 8 часов.

[035] Вариант осуществления 26. Фармацевтический состав согласно любому из вариантов осуществления 12-22, где при введении в ткань млекопитающего или субъекту фармацевтический состав приводит к получению уровня полипептида VEGF-A, имеющего последовательность SEQ ID NO:2, выше чем примерно 1 пг/мг ткани в период до 6 дней.

[036] Вариант осуществления 27. Фармацевтический состав варианта осуществления 12, где фармацевтически приемлемое формообразующее выбрано из растворителя, дисперсионной среды, разбавителя, добавки для образования дисперсии, суспензии, поверхностно-активного средства, средства, регулирующего изотоничность, загустителя или эмульгатора, консерванта, полимера, пептида, белка, клетки, гиалуронидазы и их смесей.

[037] Вариант осуществления 28. Способ стимулирования и/или улучшения заживления ран у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества наночастицы согласно любому из вариантов осуществления 1-11 или фармацевтического состава согласно любому из вариантов осуществления 12-27.

[038] Вариант осуществления 29. Способ варианта осуществления 28, где липидная компонента наночастицы дополнительно содержит фосфолипид, структурный липид и PEG-липид.

[039] Вариант осуществления 30. Способ варианта осуществления 29, где фосфолипид выбран из группы, состоящей из 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолина

(DSPC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (DOPE), 1,2-дилинолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DLPC), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-фосфохолина (DMPC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DOPC), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DPPC), 1,2-диундеcanoил-sn-глицеро-фосфохолина (DUPC), 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (POPC), 1,2-ди-О-октадеценил-sn-глицеро-3-фосфохолина (18:0 Diether PC), 1-олеоил-2-холестерилгемисукциноил-sn-глицеро-3-фосфохолина (OChemPC), 1-гексадецил-sn-глицеро-3-фосфохолина (C16 Lyso PC), 1,2-дилиноленоил-sn-глицеро-3-фосфохолина, 1,2-диарахидоноил-sn-глицеро-3-фосфохолина, 1,2-дидокозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфохолина, 1,2-дифитаноил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (ME 16.0 PE), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина, 1,2-дилинолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина, 1,2-дилиноленоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина, 1,2-диарахидоноил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина, 1,2-дидокозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина, натриевой соли 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфо-гас-(1-глицерина) (DOPG), сфингомиелина и их смесей;

структурный липид выбран из группы, состоящей из холестерина, фекостерина, ситостерина, эргостерина, кампестерина, стигмастерина, брассикастерина, томатыдина, урсоловой кислоты, альфа-токоферола и их смесей; и/или

PEG-липид выбран из группы, состоящей из PEG-модифицированного фосфатидилэтаноламина, PEG-модифицированной фосфатидной кислоты, PEG-модифицированного церамида, PEG-модифицированного диалкиламина, PEG-модифицированного диацилглицерина, PEG-модифицированного диалкилглицерина и их смесей.

[040] Вариант осуществления 31. Способ варианта осуществления 28, где липидная компонента дополнительно содержит фосфолипид, который представляет собой DSPC, структурный липид, который представляет собой холестерин, и/или PEG-липид, который представляет собой PEG-DMG.

[041] Вариант осуществления 32. Способ согласно любому из вариантов осуществления 28-31, где отношение N:P в наночастице составляет от примерно 2:1 до примерно 30:1.

[042] Вариант осуществления 33. Способ варианта осуществления 32, где отношение N:P в наночастице составляет примерно 5,67:1.

[043] Вариант осуществления 34. Способ варианта осуществления 32, где отношение N:P в наночастице составляет примерно 3:1.

[044] Вариант осуществления 35. Способ согласно любому из вариантов осуществления 28-34, где массовое соотношение липидной компоненты к модифицированной РНК составляет от примерно 10:1 до примерно 100:1.

[045] Вариант осуществления 36. Способ варианта осуществления 35, где массовое соотношение липидной компоненты к модифицированной РНК составляет примерно 20:1.

[046] Вариант осуществления 37. Способ варианта осуществления 35, где массовое соотношение липидной компоненты к модифицированной РНК составляет примерно 10:1.

[047] Вариант осуществления 38. Способ согласно любому из вариантов осуществления 28-37, где наночастица имеет средний диаметр от примерно 70 нм до примерно 80 нм.

[048] Вариант осуществления 39. Способ варианта осуществления 38, где наночастица имеет средний диаметр примерно 72 нм.

[049] Вариант осуществления 40. Способ согласно любому из вариантов осуществления 28-39, где введение приводит к максимальной наблюдаемой концентрации в плазме и/или ткани C_{\max} полипептида VEGF-A, имеющего последовательность SEQ ID NO:2, вплоть до примерно 450 пг/мл плазмы или пг/мг ткани.

[050] Вариант осуществления 41. Способ согласно любому из вариантов осуществления 28-39, где введение приводит к суммарной площади под кривой концентрации в плазме и/или ткани AUC_{0-t} полипептида VEGF-A, имеющего последовательность SEQ ID NO: 2, в размере до примерно 5500 пг*ч/мл плазмы или пг*ч/мг ткани.

[051] Вариант осуществления 42. Способ согласно любому из вариантов осуществления 28-39, где введение приводит к получению уровня полипептида VEGF-

А, имеющего последовательность SEQ ID NO:2, выше чем примерно 400 пг/мг ткани в течение 8 часов.

[052] Вариант осуществления 43. Способ согласно любому из вариантов осуществления 28-39, где введение приводит к получению уровня полипептида VEGF-A, имеющего последовательность SEQ ID NO:2, выше чем примерно 1 пг/мг ткани в течение 6 дней.

[053] Вариант осуществления 44. Способ согласно любому из вариантов осуществления 28-39, где наночастицу или фармацевтический состав вводят внутрикожно.

[054] Вариант осуществления 45. Способ согласно любому из вариантов осуществления 28-39, где концентрация модифицированной РНК составляет от примерно 0,01 мг/кг до примерно 10 мг/кг.

[055] Вариант осуществления 46. Способ согласно любому из вариантов осуществления 28-39, где введение приводит к увеличению продуцирования полипептида VEGF-A, имеющего последовательность SEQ ID NO:2, в 5–100 раз по сравнению с введением модифицированной РНК в цитратном солевом буфере.

[056] Вариант осуществления 47. Способ согласно любому из вариантов осуществления 28-39, где субъект страдает диабетом.

[057] Вариант осуществления 48. Способ согласно любому из вариантов осуществления 28-39, где рана представляет собой хирургическую рану, ожог, абразивную рану, участок биопсии кожи, хроническую рану, травму (например, травматическую рану), трансплантатную рану, диабетическую рану, диабетическую язву (например, диабетическую язву стопы), пролежневую язву, пролежень и их комбинации.

[058] Вариант осуществления 49. Способ согласно любому из вариантов осуществления 28-39, где фармацевтический состав содержит фармацевтически приемлемое формообразующее, предпочтительно растворитель, дисперсионную среду, разбавитель, добавку для образования дисперсии, суспензии, поверхностно-активное средство, средство, регулирующее изотоничность, загуститель или эмульгатор, консервант, полимер, пептид, белок, клетку, гиалуронидазу и их смеси.

[059] Вариант осуществления 50. Способ индуцирования образования новых кровеносных сосудов в тканях млекопитающего или у субъекта, включающий введение в ткани млекопитающего или субъекту эффективного количества наночастиц согласно любому из вариантов осуществления 1-11 или фармацевтического состава согласно любому из вариантов осуществления 12-27.

[060] Вариант осуществления 51. Способ индуцирования ангиогенеза в тканях млекопитающих или у субъекта, включающий введение в ткани млекопитающего или субъекту эффективного количества наночастиц согласно любому из вариантов осуществления 1-11 или фармацевтического состава согласно любому из вариантов осуществления 12-27.

[061] Вариант осуществления 52. Способ увеличения плотности капилляров и/или артериол в тканях млекопитающего или у субъекта, включающий введение в ткани млекопитающего или субъекту эффективного количества наночастиц согласно любому из вариантов осуществления 1-11 или фармацевтического состава согласно любому из вариантов осуществления 12-27.

6. ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[062] Специалистам в данной области будет понятно, что графические материалы, описанные ниже, приведены исключительно с целью иллюстрации. Графические материалы не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения каким-либо образом.

[063] ФИГ. 1: На ФИГ.1 показано липидное соединение (соединение А), используемое в примерах.

[064] ФИГ. 2А и 2В: Диаграмма структуры (ФИГ. 2А) конструкции модифицированной РНК VEGF-А и последовательность (SEQ ID NO: 1, ФИГ. 2В) типичной модифицированной РНК VEGF-А.

[065] ФИГ. 3: Содержание человеческого белка VEGF-А в биоптатах кожи как функция времени до 144 часов после внутрикожной инъекции 100 мкг модифицированной РНК VEGF-А, приготовленной в цитратном физиологическом растворе (треугольнички, пунктирная линия), и 3 мкг модифицированной РНК VEGF-А, приготовленной в липидных наночастицах (ЛНЧ) (кружочки, сплошная линия), соответственно. Линии представляют медиану в каждый момент времени.

[066] ФИГ. 4: Содержание человеческого белка VEGF-A в биоптатах кожи как функция времени до 48 часов после внутрикожной инъекции 100 мкг модифицированной РНК VEGF-A, приготовленной в цитратном физиологическом растворе (треугольнички, пунктирная линия) и 3 мкг модифицированной РНК VEGF-A, приготовленной в ЛНЧ (кружочки, сплошная линия), соответственно. Линии представляют медиану в каждый момент времени.

[067] ФИГ. 5: Заживление ран в процентном отношении после внутрикожных инъекций следующих составов: (1) состав на основе липидных наночастиц, содержащий 1 мкг модифицированной РНК VEGF-A ($n = 6$), (2) состав на основе липидных наночастиц, содержащий 3 мкг модифицированной РНК VEGF-A ($n = 6$), (3) состав на основе липидных наночастиц, содержащий 3 мкг нетранслируемой РНК VEGF-A ($n = 6$), и (4) состав на основе цитратного физиологического раствора, содержащий 100 мкг модифицированной РНК VEGF-A ($n = 7$).

[068] ФИГ. 6. Заживление ран в процентном отношении после внутрикожных инъекций следующих составов: (1) состав на основе липидных наночастиц, содержащий 3 мкг модифицированной РНК VEGF-A ($n=5$), (2) состав на основе липидных наночастиц, содержащий 3 мкг нетранслируемой модифицированной РНК VEGF-A ($n=5$), и (3) состав на основе цитратного физиологического раствора, который не содержит какой-либо модифицированной РНК ($n=5$).

[069] ФИГ. 7. Заживление ран в процентном отношении после внутрикожных инъекций следующих композиций: (1) состав на основе липидных наночастиц, содержащий 3 мкг модифицированной РНК VEGF-A ($n = 6$), (2) состав на основе липидных наночастиц, который не содержит какой-либо модифицированной РНК ($n = 5$), (3) состав на основе липидных наночастиц, содержащий 3 мкг GFP-модифицированной РНК ($n = 6$), и (4) состав на основе цитратного физиологического раствора, который не содержит какой-либо модифицированной РНК ($n = 6$).

[070] ФИГ. 8. Заживление ран в процентном отношении после внутрикожных инъекций следующих составов: (1) состав на основе липидных наночастиц, содержащий 3 мкг нетранслируемой модифицированной РНК VEGF-A ($n = 7$), (2) состав на основе цитратного физиологического раствора, содержащий 100 мкг модифицированной РНК VEGF-A ($n = 7$), (3) состав на основе цитратного физиологического раствора, содержащий 100 мкг нетранслируемой модифицированной РНК VEGF-A ($n = 7$), и (4)

состав на основе цитратного физиологического раствора, который не содержит какой-либо модифицированной РНК ($n = 7$).

7. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[071] Все ссылки, упомянутые в этом раскрытии, включены во всей их полноте в данный документ путем ссылки.

[072] Специалисту в области, к которой относится настоящее изобретение, получившему преимущество в отношении принципов, представленных в вышеприведенных описаниях и связанных с ними графических материалах, придет на ум множество модификаций и других вариантов осуществления настоящего изобретения, изложенного в данном документе. Поэтому следует понимать, что настоящее изобретение не должно ограничиваться специальными раскрытыми вариантами осуществления, и предусмотрено, что модификации и другие варианты осуществления включены в объем прилагаемой формулы изобретения. Хотя в данном документе используются специальные термины, они применяются исключительно в общем и информативном смысле, а не для целей ограничения.

[073] Единицы измерения, префиксы и символы могут обозначаться в такой форме, как принято в СИ. Если не указано иное, нуклеиновые кислоты записываются слева направо в 5'-3' ориентации; аминокислотные последовательности записываются слева направо в ориентации от аминогруппы до карбоксигруппы соответственно. Числовые интервалы включают числа, определяющие диапазон. Предусматривается, что приведение интервалов значений в данном документе служит исключительно в качестве метода сокращения индивидуального указания каждого отдельного значения, входящего в данный диапазон. Если в данном документе не указано иное, каждое индивидуальное значение включено в настоящее описание, как если бы оно было индивидуально упомянуто в данном документе. Аминокислоты в данном документе могут обозначаться с помощью их общеизвестных трехбуквенных символов или с помощью символов из одной буквы, рекомендованных Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Подобным образом, нуклеотиды могут обозначаться с помощью их общепринятых однобуквенных кодов.

7.1. Определения

[074] Если специально не указано иное, то все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понятно среднему специалисту в области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Если не упомянуто иное, методики, используемые или предусматриваемые в данном документе, представляют собой стандартные методы, хорошо известные рядовому специалисту в данной области. При осуществлении настоящего изобретения на практике, если не указано иное, будут использоваться традиционные методики микробиологии, культивирования тканей, молекулярной биологии, химии, биохимии и технологии рекомбинантной ДНК, которые находятся в пределах компетентности специалиста в данной области. Материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными, а не ограничивающими. Следующее представлено в иллюстративных целях и не предназначено для ограничения объема настоящего изобретения.

[075] В некоторых вариантах осуществления числовые параметры, изложенные в настоящем описании (в которое включена формула изобретения во всей своей полноте), представляют собой приблизительные величины, которые могут варьироваться в зависимости от требуемых свойств, которые должны быть получены в конкретном варианте осуществления. В некоторых вариантах осуществления числовые параметры должны толковаться с учетом количества сообщаемых значащих разрядов и путем применения обычных методик округления. Несмотря на то, что числовые интервалы и параметры, определяющие широкий объем некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения, представляют собой приблизительные величины, числовые значения, указанные в специальных примерах, сообщаются с наибольшей возможной точностью. Числовые значения, представленные в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, могут содержать определенные ошибки, обязательно возникающие вследствие стандартного отклонения, обнаруживаемого в их соответствующих результатах измерений при тестировании. Предусматривается, что приведение диапазонов значений в данном документе служит исключительно в качестве метода сокращения индивидуального указания каждого отдельного значения, входящего в данный диапазон. Если в данном документе не указано иное, каждое индивидуальное значение включено в настоящее описание, как если бы оно было индивидуально упомянуто в данном документе.

[076] Для удобства здесь собраны определенные термины, используемые во всей настоящей заявке (включая описание, примеры и прилагаемую формулу изобретения). Если не определено иное, то все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понятно среднему специалисту в области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение.

[077] В некоторых вариантах осуществления числа, выражающие количества ингредиентов, свойства, такие как молекулярная масса, условия реакции и результаты, и т. д., которые используются для описания и заявления некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения, следует понимать как измененные в некоторых случаях термином «примерно». Специалист в данной области техники поймет значение термина «примерно» в контексте значения, которое он определяет. В некоторых вариантах осуществления термин «примерно» используется для указания того, что значение включает в себя стандартное отклонение от среднего значения для устройства или способа, используемых для определения значения. В некоторых вариантах осуществления числовые параметры, изложенные в настоящем описании (в которое включена формула изобретения во всей своей полноте), представляют собой приблизительные величины, которые могут варьироваться в зависимости от требуемых свойств, которые должны быть получены в конкретном варианте осуществления. В некоторых вариантах осуществления числовые параметры должны толковаться с учетом количества сообщаемых значащих разрядов и путем применения обычных методик округления. Несмотря на то, что числовые интервалы и параметры, определяющие широкий объем некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения, представляют собой приблизительные величины, числовые значения, указанные в конкретных примерах, сообщаются с наибольшей возможной точностью. Числовые значения, представленные в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, могут содержать определенные ошибки, обязательно возникающие вследствие стандартного отклонения, обнаруживаемого в их соответствующих результатах измерений при тестировании.

[078] Используемый здесь термин «введение» относится к помещению наночастицы и/или фармацевтического состава, содержащего по меньшей мере одну наночастицу, в ткани млекопитающего или субъекта способом или путем, который

приводит по меньшей мере к частичной локализации наночастицы и/или состава в желаемом месте или участке ткани. В некоторых вариантах осуществления наночастицы, содержащие липидную компоненту и модифицированную РНК, можно вводить внутрикожным путем. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть белка, экспрессируемого модифицированной РНК, локализуется в желаемом месте ткани-мишени или клетки-мишени посредством внутрикожного введения.

[079] Термин «фармацевтический состав» относится к смеси, которая содержит терапевтически активный(ые) ингредиент(ы) и носитель или формообразующее, такие как фармацевтически приемлемый носитель или формообразующее, которые являются общепринятыми в данной области. Например, фармацевтический состав, используемый в настоящем документе, обычно содержит, по меньшей мере, липидную компоненту, модифицированную РНК согласно изобретению и подходящее формообразующее.

[080] Термин «соединение» включает все изотопы и изомеры изображенной структуры. «Изотопы» относятся к атомам, имеющим одинаковое атомное число, но разные массовые числа вследствие разного числа нейтронов в ядрах. Например, изотопы водорода включают в себя тритий и дейтерий. Кроме того, соединение, соль или комплекс по настоящему изобретению можно получить в комбинации с молекулами растворителя или воды с образованием сольватов и гидратов с помощью стандартных способов. «Изомер» означает любой геометрический изомер, таутомер, цвиттер-ион, стереоизомер, энантиомер или диастереомер соединения. Соединения могут включать один или несколько хиральных центров и/или двойных связей и, таким образом, могут существовать в виде стереоизомеров, таких как изомеры с двойной связью или диастереомеры. Настоящее раскрытие охватывает любые и все изомеры соединений, описанных здесь, в том числе стереомерно чистые формы и энантиомерные и стереоизомерные смеси, например рацематы. Смеси энантиомеров и стереоизомеров соединений и способы их разделения на составляющие их энантиомеры или стереоизомеры хорошо известны в области техники.

[081] Термины «предусматривать», «иметь» и «включать» являются неограничивающими глаголами-связками. Любые формы или времена одного или нескольких из этих слов, такие как «предусматривает», «предусматривающий», «имеет», «имеющий», «включает» и «включающий», также являются

неограничивающими. Например, любой способ, который «предусматривает», «имеет» или «включает» одну или несколько стадий, не ограничивается наличием только таких одной или нескольких стадий и также может охватывать другие не перечисленные стадии. Аналогичным образом, любая композиция, которая «предусматривает», «имеет» или «включает» один или несколько признаков, не ограничивается наличием только данных одного или нескольких признаков и может охватывать другие не перечисленные признаки. Применение любых и всех видов примеров или иллюстративных фраз (например, «такой как»), предусматриваемых в отношении определенных вариантов осуществления в данном документе, предназначено исключительно для лучшего освещения настоящего изобретения, а не для формулирования ограничения объема настоящего изобретения, заявленного иным образом. Никакая фраза в настоящем описании не должна толковаться как указание, что какой-либо незаявленный элемент является существенным для осуществления настоящего изобретения на практике.

[082] Термин «состоящий по существу из» допускает наличие дополнительных материалов или стадий, которые «не оказывают существенного влияния на основное(ые) и новое(ые) свойство(а)» заявленного изобретения.

[083] Термин «состоящий из» относится к составам, способам и их соответствующим ингредиентам/компонентам, описываемым в данном документе, которые исключают любой элемент, не упомянутый в таком описании варианта осуществления.

[084] Термин «доставка» означает обеспечение присутствия интересующего объекта в требуемом местоположении. Например, доставка терапевтического средства субъекту может включать введение фармацевтического состава, содержащего по меньшей мере одну наночастицу, которая включает модифицированную РНК, субъекту (например, внутрикожным путем). Введение фармацевтического состава, содержащего по меньшей мере одну наночастицу, в ткань млекопитающего или субъекта может включать контакт одной или нескольких клеток с фармацевтическим составом.

[085] Термины «заболевание» или «нарушение» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к любому изменению состояния организма или некоторых органов, приостанавливающему или нарушающему выполнение функций и/или вызывающему такие симптомы, как дискомфорт, дисфункция, дистресс или даже смерть пораженного индивидуума или находящихся в контакте с индивидуумом. К

заболеванию или нарушению также может относиться подавленное состояние, недомогание, болезненное состояние, расстройство, дурнота, болезнь, страдание, немощность или поражение.

[086] Используемый в данном документе термин «эффективное количество» относится к количеству терапевтического средства (например, модифицированной РНК) или фармацевтического состава, достаточному для уменьшения по меньшей мере одного или нескольких симптомов заболевания или нарушения или для обеспечения требуемого эффекта. Например, это может быть количество, которое вызывает терапевтически значимое уменьшение симптома или клинического показателя, связанного с заживлением раны.

[087] В данном контексте «экспрессия» последовательности нуклеиновой кислоты относится к одному или нескольким следующим событиям: (1) образованию РНК-матрицы за счет последовательности ДНК (например, посредством транскрипции); (2) процессингу РНК-транскрипта (например, посредством сплайсинга, редактирования, образования 5'-кэпа и/или процессинга 3'-конца); (3) трансляции РНК в полипептид или белок и (4) посттрансляционной модификации полипептида или белка.

[088] В данном контексте термин «липидная компонента» означает ту компоненту наночастицы, которая включает один или несколько липидов. Например, липидная компонента может включать один или несколько катионных/ионизируемых, пегилированных, структурных или других липидов, таких как фосфолипиды. В одном варианте осуществления липидная компонента включает соединение А (ФИГ. 1).

[089] В данном контексте термин «модифицированная РНК» относится к молекулам РНК, содержащим одну, две или более двух нуклеозидных модификаций по сравнению с аденозином (А) ((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-(6-амино-9*H*-пурин-9-ил)-5-(гидроксиметил)оксолан-3,4-диол), гуанозином (G) (2-амино-9-[3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)оксолан-2-ил]-3*H*-пурин-6-он), цитидином (С) (4-амино-1-[3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-ил]пиримидин-2-он) и уридином (U) (1-[(3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)оксолан-2-ил]пиримидин-2,4-дион) или по сравнению с АМР, GMP, CMP и UMP в молекулах РНК или их части. Неограничивающие примеры нуклеозидных модификаций представлены в другом разделе настоящего описания. Когда нуклеотидная последовательность конкретной заявленной РНК во всем остальном идентична последовательности встречающейся в

природе молекулы РНК, подразумевается, что модифицированная РНК представляет собой молекулу РНК с по меньшей мере одной модификацией, отличной от существующих у природного аналога. Отличие может заключаться либо в химическом изменении нуклеозида/нуклеотида, либо в положении данного изменения в пределах последовательности. В одном варианте осуществления модифицированная РНК представляет собой модифицированную матричную РНК (или «модифицированную мРНК»). В некоторых вариантах осуществления модифицированная РНК включает в себя, по меньшей мере, один UMP, который модифицирован с образованием N1-метил-псевдо-UMP. В некоторых вариантах осуществления все UMP в модифицированной РНК были заменены на N1-метил-псевдо-UMP.

[090] В данном контексте термин «наночастица» представляет собой частицу, содержащую один или несколько липидов и один или несколько терапевтических средств. Размер наночастиц, как правило, измеряется микрометрами или меньше, и они могут быть двуслойными липидными частицами. В некоторых вариантах осуществления средний диаметр наночастицы (например, гидродинамический диаметр) составляет от примерно 50 до примерно 100 нм, например, от примерно 60 до примерно 90 нм, от 70 до 80 нм в диаметре, что измеряется методом динамического светорассеяния (см. NIST Special Publication 1200-6, "Measuring the Size of Nanoparticles in Aqueous Media Using Batch Mode Dynamic Light Scattering"). В некоторых вариантах осуществления средний гидродинамический диаметр наночастицы составляет примерно 71 нм, 72 нм, 73 нм, 74 нм, 75 нм, 76 нм, 77 нм, 78 нм, 79 нм, 80 нм, 81 нм, 82 нм, 83 нм, 84 нм, 85 нм, 86 нм, 87 нм, 88 нм, 89 нм или 90 нм. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство представляет собой модифицированную РНК. В некоторых вариантах осуществления наночастицы содержат Соединение А, как показано на ФИГ. 1, и модифицированную РНК.

[091] В данном контексте термин «коэффициент полидисперсности (pDI)» представляет собой меру распределения размеров наночастиц в образце наночастиц (см. NIST Special Publication 1200-6, "Measuring the Size of Nanoparticles in Aqueous Media Using Batch Mode Dynamic Light Scattering"). В некоторых вариантах осуществления значение коэффициента полидисперсности равно от примерно 0,10 до примерно 0,20, например, примерно 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19 или 0,20.

[092] В данном контексте термин «отношение N:P» представляет собой молярное отношение ионизируемых (в физиологическом интервале pH) атомов азота в липидных и фосфатных группах в РНК, например, в наночастице, включающей липидную компоненту и модифицированную РНК.

[093] Используемый в данном документе термин «нуклеиновая кислота» в своем самом широком смысле включает любое соединение и/или вещество, которое входит в состав полимера из нуклеотидов, соединенных фосфодиэфирной связью. Такие полимеры часто называют олигонуклеотидами или полинуклеотидами в зависимости от размера. Термины «полинуклеотидная последовательность» и «нуклеотидная последовательность» используются в данном документе взаимозаменяемо.

[094] Используемый здесь термин «PEG-липид» или «пэгилированный липид» относится к липиду, содержащему компоненту полиэтиленгликоля.

[095] Фраза «фармацевтически приемлемый» используется в данном документе для обозначения тех соединений, материалов, составов и/или лекарственных форм, которые по результатам тщательной медицинской оценки являются подходящими для применения в контакте с тканями людей и животных, при этом не вызывают чрезмерную токсичность, раздражение, аллергическую реакцию или другие проблемы или осложнения, соизмеримые с обоснованным соотношением польза/риск. Разрешительные органы регистрации лекарственных средств (например, EMA, US-FDA) предоставляют руководство и одобряют фармацевтически приемлемые соединения, материалы, составы и/или лекарственные формы. Примеры перечислены в Фармакопеех.

[096] Фраза «фармацевтически приемлемое формообразующее» используется в данном документе для обозначения фармацевтически приемлемого материала, выбранного из растворителя, дисперсионной среды, разбавителя, добавки для образования дисперсии, суспензии, поверхностно-активного средства, средства, регулирующего изотоничность, загустителя или эмульгатора, консерванта, полимера, пептида, белка, клетки, гиалуронидазы и их смесей. В некоторых вариантах осуществления растворитель представляет собой водный растворитель.

[097] Используемый здесь термин «фосфолипид» представляет собой липид, который включает фосфатный фрагмент и одну или несколько углеродных цепей, таких как цепи ненасыщенных жирных кислот. Фосфолипид может включать одну или

несколько кратных (например, двойных или тройных) связей (например, одну или несколько ненасыщенных связей). Определенные фосфолипиды могут облегчать слияние с мембраной. Например, катионный фосфолипид может взаимодействовать с одним или несколькими отрицательно заряженными фосфолипидами мембраны (например, клеточной или внутриклеточной мембраны). Слияние фосфолипида с мембраной может обеспечивать прохождение одной или нескольких составляющих частей липидосодержащего состава через мембрану, что позволяет, например, осуществлять доставку одной или нескольких составляющих частей в клетку.

[098] Используемый в данном документе «полипептид» означает полимер из аминокислотных остатков (природных или неприродных), связанных вместе, чаще всего, пептидными связями. Термин, используемый в данном документе, относится к белкам, полипептидам и пептидам любого размера, структуры или функции. Полипептид может представлять собой одиночную молекулу или может представлять собой мультимолекулярный комплекс, такой как димер, тример или тетрамер. Они также могут предусматривать полипептиды с одиночной цепью или многоцепочечные полипептиды, такие как антитела или инсулин, и могут быть ассоциированными или связанными. Дисульфидные связи чаще всего обнаруживаются в многоцепочечных полипептидах. Термин "полипептид" также может применяться в отношении полимеров из аминокислот, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой искусственные химические аналоги соответствующих встречающихся в природе аминокислот.

[099] Используемый в данном документе «белок» представляет собой полимер, состоящий фактически из любой из 20 аминокислот. Хотя термин «полипептид» зачастую используется при ссылке на относительно большие полипептиды, а термин «пептид» зачастую используется при ссылке на небольшие полипептиды, использование этих терминов в уровне техники перекрывается и варьирует. Термины «пептид(ы)», «белок(белки)» и «полипептид(ы)» иногда используются в данном документе взаимозаменяемо.

[0100] Термин «субъект» относится к животному, например человеку, которому предоставляется лечение, включая профилактическое лечение, с использованием способов и составов, описываемых в настоящем документе. В случае лечения состояний

или болезненных состояний, специфических для конкретного животного, такого как субъект-человек, термин «субъект» относится к такому конкретному животному.

[0101] Термин «ткань» относится к группе или слою подобных специализированных клеток, которые совместно выполняют определенные специальные функции.

[0102] В данном контексте термины «лечить», «лечение» или «проводить лечение» относятся к улучшению или устранению заболевания или расстройства или по меньшей мере одного их явного симптома. В некоторых вариантах осуществления «лечение» или «проводить лечение» относится к улучшению или устранению по меньшей мере одного измеримого физического параметра, необязательно различаемого пациентом.

[0103] Следует учитывать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными методами, протоколами, реагентами и т. п., описываемыми в данном документе, и соответственно их можно варьировать. Терминология, используемая в данном документе, приведена исключительно с целью описания конкретных вариантов осуществления, и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который определяется исключительно формулой изобретения.

7.2. Липидные компоненты

[0104] Наночастицы содержат липидную компоненту, включающую Соединение А (ФИГ. 1). Дополнительные соединения раскрыты в WO 2017/049245 A2 (см., например, соединения 1-147 в WO 2017/049245 A2), которая полностью включена в настоящее описание путем ссылки. Липидные компоненты могут также включать множество других липидов, таких как фосфолипид, структурный липид и/или PEG-липид.

Фосфолипиды

[0105] Липидная компонента наночастицы может включать один или несколько фосфолипидов, таких как один или несколько (поли)ненасыщенных липидов. Фосфолипиды могут собираться в один или несколько двойных липидных слоев. Как правило, фосфолипиды могут содержать фосфолипидный фрагмент и один или несколько фрагментов жирных кислот.

[0106] Фосфолипид, полезный для применения в составах и способах, можно выбирать из неограничивающей группы, состоящей из 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DSPC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолamina (DOPE), 1,2-дилинолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DLPC), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-фосфохолина (DMPC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DOPC), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DPPC), 1,2-диундеканоил-sn-глицеро-фосфохолина (DUPC), 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (POPС), 1,2-ди-О-октадеценил-sn-глицеро-3-фосфохолина (18:0 Diether PC), 1-олеоил-2-холестерилгемисукциноил-sn-глицеро-3-фосфохолина (OChemсPC), 1-гексадецил-sn-глицеро-3-фосфохолина (C16 Lyso PC), 1,2-дилиноленоил-sn-глицеро-3-фосфохолина, 1,2-диарахидоноил-sn-глицеро-3-фосфохолина, 1,2-дидокозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфохолина, 1,2-дифитаноил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолamina (ME 16.0 PE), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолamina, 1,2-дилинолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолamina, 1,2-дилиноленоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолamina, 1,2-диарахидоноил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолamina, 1,2-дидокозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолamina, натриевой соли 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфо-гac-(1-глицерина) (DOPG) и сфингомиелина. В некоторых вариантах осуществления липидная компонента включает DSPC. В некоторых вариантах осуществления липидная компонента включает DOPE. В некоторых вариантах осуществления липидная компонента включает как DSPC, так и DOPE.

Структурные липиды

[0107] Липидная компонента наночастицы может включать один или несколько структурных липидов. Структурные липиды можно выбирать, но не ограничиваясь ими, из холестерина, фекостерина, ситостерина, эргостерина, кампестерина, стигмастерина, брассикастерина, томатидина, томатина, урсоловой кислоты, альфа-токоферола и их смесей. В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой холестерин. В некоторых вариантах осуществления структурный липид включает холестерин и кортикостероид (такой как преднизолон, дексаметазон, преднизон и гидрокортизон) или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления липидная компонента включает холестерин.

PEG-липиды.

[0108] Липидная компонента наночастицы может включать один или несколько PEG или модифицированных с помощью PEG липидов. Такие липиды могут иначе называться пэгилированными липидами. PEG-липид представляет собой липид, модифицированный полиэтиленгликолем. PEG-липид можно выбирать из неограничивающей группы, состоящей из PEG-модифицированных фосфатидилэтаноламинов, PEG-модифицированных фосфатидных кислот, PEG-модифицированных церамидов, PEG-модифицированных диалкиламинов, PEG-модифицированных диацилглицеринов, PEG-модифицированных диалкилглицеринов и их смесей. Например, PEG-липид может представлять собой PEG-c-DMG-, PEG-DMG- (1,2-димиристоил-ОТ-глицерин метоксиполиэтиленгликоль, полученный от Avanti Polar Lipids, Алабастр, Алабама), PEG-DLPE-, PEG-DMPE-, PEG-DPPC- или PEG-DSPE-липид. В некоторых вариантах осуществления липидная компонента включает PEG-DMG.

7.3. Модифицированные РНК, кодирующие полипептиды VEGF-A

[0109] В области терапевтических средств, диагностических средств, реагентов и биологических анализов большой интерес представляет возможность доставки нуклеиновой кислоты, например, рибонуклеиновой кислоты (РНК), внутрь клетки, будь то *in vitro*, *in vivo*, *in situ* или *ex vivo*, таким образом, чтобы обеспечить внутриклеточную трансляцию нуклеиновой кислоты и продуцирование кодируемого полипептида, представляющего интерес.

[0110] РНК, встречающиеся в природе, синтезированы из четырех основных рибонуклеотидов: АТР, СТР, УТР и ГТР, но могут содержать нуклеотиды, подвергнутые посттранскрипционной модификации. Кроме того, в РНК было идентифицировано примерно сто разных нуклеозидных модификаций (Rozenski, J, Crain, P, and McCloskey, J., The RNA Modification Database: 1999 update, Nucl Acids Res, (1999) 27: 196-197).

[0111] Согласно настоящему изобретению такие РНК предпочтительно модифицировать, чтобы избежать недостатков других молекул РНК из уровня техники (например, активации ответа со стороны врожденной иммунной системы и быстрого разложения при введении). Следовательно, такие полинуклеотиды называются модифицированной РНК. В некоторых вариантах осуществления модифицированная РНК после введения субъекту не вызывает реакцию со стороны врожденной иммунной

системы. В некоторых вариантах осуществления период полувыведения модифицированной РНК по сравнению с немодифицированной РНК продлен.

[0112] В предпочтительных вариантах осуществления молекула РНК представляет собой матричную РНК (мРНК). Используемый в данном документе термин «матричная РНК» (мРНК) относится к любому полинуклеотиду, который кодирует представляющий интерес полипептид и который может быть транслирован для продуцирования кодируемого полипептида, представляющего интерес, *in vitro*, *in vivo*, *in situ* или *ex vivo*.

[0113] Как показано на ФИГ. 2А, основные компоненты молекулы мРНК обычно включают по меньшей мере кодирующий участок, 5'-нетранслируемый участок (UTR), 3'-нетранслируемый участок (UTR), 5'-кэп и поли-(А) хвост. Опираясь на эту модульную структуру дикого типа, настоящее изобретение расширяет объем функциональных возможностей традиционных молекул мРНК за счет предоставления полинуклеотидов или конструкций первичной РНК, которые сохраняют модульную организацию, но которые содержат одну или несколько структурных и/или химических модификаций или изменений, которые придают полинуклеотиду полезные свойства, включая, в некоторых вариантах осуществления, отсутствие индуцирования значительной реакции со стороны врожденной иммунной системы в клетке, в которую введен данный полинуклеотид.

[0114] Модифицированные РНК могут включать любую пригодную модификацию относительно стандартной нуклеотидной цепи РНК, такую как модификация сахара, нуклеотидного основания (например, одна или несколько модификаций нуклеотидного основания, такие как замена или замещение атома в пиримидиновом нуклеотидном основании на необязательно замещенную аминогруппу, необязательно замещенный тиол, необязательно замещенный алкил (например, метил или этил) или галоген (например, хлор или фтор)), или межнуклеозидной связи (например, одна или несколько модификаций в фосфодиэфирном остове).

[0115] В качестве неограничивающих примеров, в некоторых вариантах осуществления модифицированная РНК может включать, например, по меньшей мере один уридинмонофосфат (UMP), который модифицирован с образованием N1-метил-псевдо-UMP. В некоторых вариантах осуществления N1-метил-псевдо-UMP присутствует вместо UMP в процентном отношении от UMP в последовательности,

составляющем 0,1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99,9%, и 100%. В некоторых вариантах осуществления все UMP были заменены на N1-метил-псевдо-UMP.

[0116] В некоторых вариантах осуществления модифицированные РНК содержат модификацию в 5'-кэпе, такую как 5'-дигуанозиновый кэп. В некоторых вариантах осуществления модифицированные РНК содержат модификацию в кодирующем участке. В некоторых вариантах осуществления модифицированные РНК содержат модификацию в 5'-UTR. В некоторых вариантах осуществления модифицированные РНК содержат модификацию в 3'-UTR. В некоторых вариантах осуществления модифицированные РНК содержат модификацию в поли-(А) хвосте. В некоторых вариантах осуществления модифицированные РНК содержат любую комбинацию модификаций в кодирующем участке, 5'-кэпе, 5'-UTR, 3'-UTR или поли-(А) хвосте. В некоторых вариантах осуществления модифицированная РНК необязательно может быть обработана щелочной фосфатазой.

[0117] В некоторых вариантах осуществления модифицированная РНК кодирует полипептид фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) - любой из большого семейства белков VEGF, которые обычно играют центральную роль в регуляции заживления ран. Функции VEGF также предусматривают роль в активации передачи сигнала с участием оксида азота (NO), ангиогенезе во время эмбрионального развития и постнатальном ангиогенезе, опухолевом ангиогенезе, артериогенезе, эндотелиальной репликации, и в качестве переключателя клеточной дифференцировки у мультипотентных сердечно-сосудистых клеток-предшественников.

[0118] Специалистам в данной области будет понятно, что для любого конкретного гена VEGF может существовать один или несколько вариантов или изоформ. Неограничивающие примеры полипептидов VEGF-A согласно настоящему изобретению перечислены в Таблице 1. Специалистам в данной области будет понятно, что последовательности, раскрытые в Таблице 1, содержат потенциальные фланкирующие участки. Они закодированы в каждой нуклеотидной последовательности либо в направлении 5' (против хода транскрипции), либо в направлении 3' (по ходу транскрипции) от открытой рамки считывания. Открытая рамка считывания определенно и специально раскрыта путем заявления нуклеотидной эталонной последовательности. Также можно дополнительно охарактеризовать 5'- и 3'-

фланкирующие участки, используя одну или несколько доступных баз данных или алгоритмов. В базах данных аннотированы признаки, свойственные фланкирующим участкам последовательностей в NCBI, и они доступны из уровня техники.

Таблица 1. Изоформы мРНК VEGF-A *Homo sapiens*

Описание	№ по NM	№ по NP
мРНК фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) <i>Homo sapiens</i> , вариант транскрипта 1	NM_001171623,1	NP_001165094,1
мРНК фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) <i>Homo sapiens</i> , вариант транскрипта 1	NM_001025366,2	NP_001020537,2
мРНК фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) <i>Homo sapiens</i> , вариант транскрипта 2	NM_001171624,1	NP_001165095,1
мРНК фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) <i>Homo sapiens</i> , вариант транскрипта 2	NM_003376,5	NP_003367,4
мРНК фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) <i>Homo sapiens</i> , вариант транскрипта 3	NM_001171625,1	NP_001165096,1
мРНК фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) <i>Homo sapiens</i> , вариант транскрипта 3	NM_001025367,2	NP_001020538,2
мРНК фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) <i>Homo sapiens</i> , вариант транскрипта 4	NM_001171626,1	NP_001165097,1
мРНК фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) <i>Homo sapiens</i> , вариант транскрипта 4	NM_001025368,2	NP_001020539,2
мРНК фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) <i>Homo sapiens</i> , вариант транскрипта 4	NM_001317010,1	NP_001303939,1

мРНК фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) <i>Homo sapiens</i> , вариант транскрипта 5	NM_001171627,1	NP_001165098,1
мРНК фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) <i>Homo sapiens</i> , вариант транскрипта 5	NM_001025369,2	NP_001020540,2
мРНК фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) <i>Homo sapiens</i> , вариант транскрипта 6	NM_001171628,1	NP_001165099,1
мРНК фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) <i>Homo sapiens</i> , вариант транскрипта 6	NM_001025370,2	NP_001020541,2
мРНК фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) <i>Homo sapiens</i> , вариант транскрипта 7	NM_001171629,1	NP_001165100,1
мРНК фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) <i>Homo sapiens</i> , вариант транскрипта 7	NM_001033756,2	NP_001028928,1
мРНК фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) <i>Homo sapiens</i> , вариант транскрипта 8	NM_001171630,1	NP_001165101,1
мРНК фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) <i>Homo sapiens</i> , вариант транскрипта 8	NM_001171622,1	NP_001165093,1
мРНК фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) <i>Homo sapiens</i> , вариант транскрипта 9	NM_001204385,1	NP_001191314,1
мРНК фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) <i>Homo sapiens</i> , вариант транскрипта 9	NM_001204384,1	NP_001191313,1

мРНК фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) <i>Homo sapiens</i> , вариант транскрипта 10	NM_001287044,1	NP_001273973,1
--	----------------	----------------

[0119] Специалистам в данной области будет понятно, что молекулы РНК, кодирующие полипептиды VEGF-A, например, полипептид VEGF-A человека, могут быть разработаны согласно изоформам мРНК VEGF-A, перечисленным в Таблице 1. Рядовому специалисту в данной области обычно известны многочисленные изоформы остальных представителей семейства VEGF.

[0120] В одном варианте осуществления настоящего изобретения представлена модифицированная РНК, кодирующая полипептид VEGF-A (например, SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах осуществления модифицированная РНК кодирует полипептид VEGF-A, при этом модифицированная РНК содержит любую из последовательностей SEQ ID NO: 1 и 3-5. В некоторых вариантах осуществления модифицированная РНК дополнительно содержит 5'-кэп, 5'-UTR, 3'-UTR, поли(А) хвост или любые их комбинации. В некоторых вариантах осуществления 5'-кэп, 5'-UTR, 3'-UTR, поли(А) хвост или любые их комбинации могут включать один или несколько модифицированных нуклеотидов.

[0121] В некоторых вариантах осуществления модифицированная РНК, кодирующая полипептид VEGF-A, может иметь структуру, изображенную на ФИГ. 2В, которая представляет собой SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления модифицированная РНК, кодирующая полипептид VEGF-A, может содержать любую из последовательностей SEQ ID NO: 3-5.

7.4. Составы, содержащие липидную компоненту и модифицированную РНК

[0122] Некоторые варианты осуществления относятся к наночастицам, которые содержат липидную компоненту и модифицированную РНК.

[0123] В некоторых вариантах осуществления липидная компонента наночастицы может включать в себя Соединение А (ФИГ. 1). В некоторых вариантах осуществления липидная компонента наночастицы может дополнительно включать в себя фосфолипид, структурный липид и/или PEG-липид, как раскрывается в данном

документе. Например, в некоторых вариантах осуществления липидная компонента наночастицы может включать в себя DSPC, холестерин, PEG-DMG и их смеси.

[0124] Составляющие части липидной компоненты могут быть представлены в определенных долях. В некоторых вариантах осуществления липидная компонента наночастицы включает в себя Соединение А, фосфолипид, структурный липид и PEG-липид. В некоторых вариантах осуществления липидная компонента наночастицы включает в себя от примерно 30 мол.% до примерно 60 мол.% Соединения А, от примерно 0 мол.% до примерно 30 мол.% фосфолипида, от примерно 18,5 мол.% до примерно 48,5 мол.% структурного липида и от примерно 0 мол.% до примерно 10 мол.% PEG-липида, при условии, что суммарный мольный % не превышает 100%. В некоторых вариантах осуществления липидная компонента наночастицы включает в себя от примерно 35 мол.% до примерно 55 мол.% Соединения А, от примерно 5 мол.% до примерно 25 мол.% фосфолипида, от примерно 30 мол.% до примерно 40 мол.% структурного липида и от примерно 0 мол.% до примерно 10 мол.% PEG-липида. В некоторых вариантах осуществления липидная компонента включает в себя примерно 50 мол.% Соединения А, примерно 10 мол.% фосфолипида, примерно 38,5 мол.% структурного липида и примерно 1,5 мол.% PEG-липида. В некоторых вариантах осуществления фосфолипид может представлять собой DOPE. В некоторых вариантах осуществления структурный липид может представлять собой холестерин. В некоторых вариантах осуществления PEG-липид может представлять собой PEG-DMG.

[0125] В некоторых вариантах осуществления компонента наночастицы - модифицированная РНК может включать в себя модифицированную РНК, кодирующую полипептид VEGF-A, как описано в настоящем документе (например, последовательность SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах осуществления компонента наночастицы - модифицированная РНК может включать в себя модифицированную РНК, содержащую любую из последовательностей SEQ ID NO: 1 и 3-5. В некоторых вариантах осуществления модифицированная РНК дополнительно содержит 5'-кэп, 5'-UTR, 3'-UTR, поли(А) хвост или любые их комбинации. В некоторых вариантах осуществления 5'-кэп, 5'-UTR, 3'-UTR, поли(А) хвост или любые их комбинации могут включать один или несколько модифицированных нуклеотидов.

[0126] В некоторых вариантах осуществления относительные количества липидной компоненты и модифицированной РНК в наночастице могут варьироваться. В

некоторых вариантах осуществления массовое соотношение липидной компоненты и модифицированной РНК в наночастице может составлять от примерно 5:1 до примерно 100:1, например 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, и 100:1. Например, массовое соотношение липидного компонента и модифицированной РНК может составлять от примерно 10:1 до примерно 40:1. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение составляет примерно 20:1. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение составляет примерно 10:1.

[0127] В некоторых вариантах осуществления относительные количества липидной компоненты и модифицированной РНК в наночастице могут определяться конкретным отношением N:P. Отношение N:P в составе относится к молярному отношению атомов азота в одном или нескольких липидах к числу фосфатных групп в РНК. Как правило, предпочтительным является более низкое отношение N:P. В некоторых вариантах осуществления отношение N:P может составлять от примерно 2:1 до примерно 30:1, например, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 12:1, 14:1, 16:1, 18:1, 20:1, 22:1, 24:1, 26:1, 28:1, или 30:1. В некоторых вариантах осуществления отношение N:P может составлять от примерно 2:1 до примерно 8:1. Например, отношение N:P может составлять примерно 3,0:1, примерно 3,5:1, примерно 4,0:1, примерно 4,5:1, примерно 5,0:1, примерно 5,5:1, примерно 5,67:1, примерно 6,0:1, примерно 6,5:1 или примерно 7,0:1. В некоторых вариантах осуществления отношение N:P может составлять примерно 3:1. В некоторых вариантах осуществления отношение N:P может составлять примерно 5,67:1.

[0128] Липидные наночастицы можно получать, используя хорошо известные в данной области методы (см., например, Belliveau et al., "Microfluidic synthesis of highly potent limit-size lipid nanoparticles for in vivo delivery of siRNA", *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 2012, 1(8):e37; Zhigaltsev et al., Bottom-up design and synthesis of limit size lipid nanoparticle systems with aqueous and triglyceride cores using millisecond microfluidic mixing, " *Langmuir*, 2012, 28(7):3633-3640).

[0129] В некоторых вариантах осуществления наночастицы могут дополнительно содержать фармацевтически приемлемое формообразующее, которое в том виде, в котором оно используется в данном изобретении, включает без ограничения любые и все виды растворителей, дисперсионных сред, разбавителей или других жидких

сред-носителей, добавок для образования дисперсии или суспензии, поверхностно-активных средств, средств, регулирующих изотоничность, загустителей или эмульгаторов, консервантов и т. п., подходящих для конкретной требуемой лекарственной формы. Вспомогательные вещества также могут включать без ограничения полимеры, наночастицы типа сердцевина/оболочка, пептиды, белки, клетки, гиалуронидазу, имитаторы наночастиц и их комбинации. Различные вспомогательные вещества для составления фармацевтических композиций и методики получения композиции известны из уровня техники (см. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition, Edited by Allen, Loyd V., Jr, Pharmaceutical Press; который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В пределах объема настоящего изобретения может предусматриваться применение традиционной среды-вспомогательного вещества, за исключением случаев, когда какая-либо традиционная среда-вспомогательное вещество может быть несовместима с веществом или его производными, например, осуществляет какой-либо нежелательный биологический эффект или иным образом взаимодействует вредным образом с любым(и) другим(и) компонентом(ами) фармацевтической композиции.

[0130] В некоторых вариантах осуществления наночастицы могут содержать фармацевтически эффективное количество липидной компоненты и модифицированной РНК, причем составы дополнительно содержат фармацевтически приемлемое формообразующее. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество выбрано из растворителя, дисперсионной среды, разбавителя, добавки для образования дисперсии, суспензии, поверхностно-активного средства, средства, регулирующего изотоничность, загустителя или эмульгатора, консерванта, наночастиц типа сердцевина/оболочка, полимера, пептида, белка, клетки, гиалуронидазы и их смесей. В некоторых вариантах осуществления растворитель представляет собой водный растворитель. В некоторых вариантах осуществления растворитель представляет собой неводный растворитель.

[0131] В настоящем изобретении также предусмотрено то, что фармацевтический состав содержит одну или несколько липидных наночастиц, содержащих липидную компоненту и модифицированную РНК, как раскрывается в данном документе, и фармацевтически приемлемое формообразующее. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические составы содержат множество липидных

наночастиц согласно описанию, данному здесь, и фармацевтически приемлемое формообразующее. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемое формообразующее выбрано из растворителя, дисперсионной среды, разбавителя, добавки для образования дисперсии, суспензии, поверхностно-активного средства, средства, регулирующего изотоничность, загустителя или эмульгатора, консерванта, наночастиц типа сердцевина/оболочка, полимера, пептида, белка, клетки, гиалуронидазы и их смесей. В некоторых вариантах осуществления растворитель представляет собой водный растворитель. В некоторых вариантах осуществления растворитель представляет собой неводный растворитель.

7.5. Улучшение заживления ран у субъекта

[0132] Сигнальные пути VEGF-A играют центральную роль в процессах заживления ран, включая реваскуляризацию поврежденных тканей, улучшение сосудистой проницаемости и формирование новых кровеносных сосудов. Целью настоящего изобретения является лечение субъектов, которые страдают от заболеваний, возникающих в результате нарушенных процессов заживления ран.

[0133] В некоторых вариантах осуществления наночастицы согласно этому изобретению вводят субъекту, который страдает от заболевания, которое поражает сосудистые структуры. Сосудистые структуры чаще всего поражаются при проникающей травме, ожогах или хирургическом вмешательстве. Диабет отрицательно влияет на многочисленные компоненты, служащие для заживления раны, и пациент с заживлением диабетической раны обычно характеризуется измененным током крови из-за сосудистой дисфункции. Поэтому у субъекта с язвой на коже, в том числе с диабетическими язвами, заживление раны обычно ослаблено или замедлено. В некоторых вариантах осуществления наночастицы, раскрываемые в данном документе, вводят субъекту, страдающему диабетом. В контексте данного изобретения рана может представлять собой, например, хирургическую рану, ожог, абразивную рану, участок биопсии кожи, хроническую рану, травму (например, травматическую рану), трансплантатную рану, диабетическую рану, диабетическую язву (например, диабетическую язву стопы), пролежневую язву, пролежень и их комбинации.

[0134] В некоторых вариантах осуществления наночастицы, содержащие липидную компоненту и модифицированную РНК (например, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:

3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5) можно использовать для улучшения заживления ран в тканях млекопитающего или у субъекта.

[0135] В некоторых вариантах осуществления наночастицы, раскрываемые в данном документе, можно использовать для индуцирования образования новых кровеносных сосудов в тканях млекопитающего или у субъекта. В некоторых вариантах осуществления наночастицы, раскрываемые в данном документе, можно использовать для индуцирования ангиогенеза в тканях млекопитающего или у субъекта.

[0136] В некоторых дополнительных вариантах осуществления наночастицы, раскрываемые в данном документе, можно использовать для лечения повреждения сосудов в результате травмы или хирургического вмешательства. В некоторых вариантах осуществления наночастицы, раскрываемые в данном документе, можно использовать для лечения заболевания, включающего пересадку кожи и пересадку ткани.

[0137] Другие аспекты данного изобретения относятся к введению наночастиц субъектам, нуждающимся в этом. В некоторых вариантах осуществления наночастицы, раскрываемые в данном документе, вводят внутрикожным путем для улучшения заживления ран в тканях млекопитающего или у субъекта.

[0138] В определенных вариантах осуществления наночастицы, раскрываемые в данном документе, можно вводить при уровнях дозы, достаточных для доставки от примерно 0,0001 мг/кг до примерно 100 мг/кг, от примерно 0,001 мг/кг до примерно 0,05 мг/кг, от примерно 0,005 мг/кг до примерно 0,05 мг/кг, от примерно 0,001 мг/кг до примерно 0,005 мг/кг, от примерно 0,05 мг/кг до примерно 0,5 мг/кг, от примерно 0,01 мг/кг до примерно 50 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до примерно 40 мг/кг, от примерно 0,5 мг/кг до примерно 30 мг/кг, от примерно 0,01 мг/кг до примерно 10 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до примерно 10 мг/кг или от примерно 1 мг/кг до примерно 25 мг/кг модифицированной РНК в сутки в расчете на массу тела субъекта, один или несколько раз в сутки, для получения требуемого терапевтического эффекта.

[0139] В некоторых вариантах осуществления наночастицы, раскрываемые в данном документе, вводят субъекту за одно введение. В некоторых вариантах осуществления наночастицы, раскрываемые в данном документе, вводят субъекту в фиксированной дозировке за несколько введений (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать,

пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать, двадцать или более). В каждом из вариантов осуществления по данному абзацу «несколько введений» могут быть отделены друг от друга короткими (1-5 минут), средними (6-30 минут) или длительными (более 30 минут, часы или даже дни) промежутками времени.

[0140] Наночастицы можно вводить субъекту с применением любой дозировки при введении, эффективной для лечения заболевания, нарушения и/или состояния. Точная требуемая дозировка будет варьироваться от субъекта к субъекту в зависимости от вида, возраста и общего состояния субъекта, тяжести заболевания, конкретного препарата, способа его введения, характера его действия и т.п. Однако будет понятно, что общее суточное применение составов может определять лечащий врач в рамках обоснованного медицинского суждения. Конкретный размер фармацевтически эффективной дозы для любого конкретного пациента будет зависеть от множества факторов, включая тяжесть заболевания, конкретный применяемый состав, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и диету пациента, время введения, способ применения, продолжительность лечения и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

[0141] Все пункты в формуле изобретения в данном документе включены посредством ссылки в описание во всей своей полноте как дополнительные варианты осуществления.

8. ПРИМЕРЫ

8.1. ПРИМЕР 1

Приготовление составов наночастиц и цитратного физиологического раствора

[0142] Липиды и модифицированные РНК: Исходный раствор липидов в этаноле готовили из Соединения А, дистеароилфосфатидилхолина (DSPC, Avanti Polar Lipids), холестерина (Sigma) и модифицированного полиэтиленгликолем липида (mPEG₂₀₀₀-DMG от NOF Corporation). Липиды смешивали в 99,5% этаноле до суммарной концентрации липидов 12,5 мМ. Состав представлял собой Соединение А, DSPC, холестерин, DMG-PEG в соотношении 50:10:38,5:1,5 мол.%. Модифицированную РНК VEGF-A (например, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5) размораживали и разбавляли до 6,25 мМ в натрий-ацетатном буфере и воде HyClone в

концентрациях, соответствующих отношению зарядов (N:P) в размере 5,67 или 3 в конечном составе. Полученные после разбавления составы были следующими:

ЛНЧ 1:11 (N:P = 3), концентрация мРНК 0,06 мг/мл.

Компонента ЛНЧ	Количество (мг/мл)
Модифицированная РНК VEGF-A	0,06
Соединение А	0,37
DSPC	0,08
Холестерин	0,16
DMG-PEG	0,04

ЛНЧ 1:20 (N:P = 5,67), концентрация мРНК 0,06 мг/мл.

Компонента ЛНЧ	Количество (мг/мл)
Модифицированная РНК VEGF-A	0,06
Соединение А	0,70
DSPC	0,16
Холестерин	0,30
DMG-PEG	0,07

[0143] Составы липидных наночастиц (ЛНЧ): Составы ЛНЧ готовили путем быстрого смешивания раствора этанола, содержащего липиды, и водного раствора модифицированной РНК VEGF-A, на микроструйном устройстве с последующим диализом в физиологическом растворе с фосфатным буфером (PBS). Вкратце, раствор модифицированной РНК VEGF-A и раствор липидов вводили в микроструйное смесительное устройство при объемном соотношении водного раствора к этанолу 3:1 и расходе 12-14 мл/мин с использованием двух шприцев, которыми управляли шприцевые насосы. Этанол удаляли диализом составов ЛНЧ в PBS буфере в течение ночи с использованием мембран с верхним пределом проницаемости 10 кД. Составы ЛНЧ концентрировали с использованием центрифугирующих фильтровальных устройств с верхним пределом проницаемости 30 кД и исследовали следующие свойства: размер частиц (72 нм), концентрацию модифицированной РНК VEGF-A (0,35 мг/мл), коэффициент полидисперсности (0,14) и капсулирование (94%). Составы ЛНЧ

разбавляли в PBS до конечных концентраций 0,33 мг/мл и стерилизовали фильтрованием. Составы ЛНЧ хранили в холодильнике.

[0144] Составы цитратного физиологического раствора: Составы цитратного физиологического раствора готовили разбавлением растаявшего раствора модифицированной РНК VEGF-A водой HyClone и концентрированным буферным раствором до конечного состава с 10 mM цитрата натрия и 130 mM хлорида натрия при pH 6,5.

8.2. ПРИМЕР 2

Оценка продуцирования человеческого белка VEGF-A после внутрикожной инъекции модифицированной РНК человеческого VEGF-A в мыши

[0145] Составы с наночастицами и цитратным физиологическим раствором, содержащие модифицированную РНК VEGF-A и Соединение А, получали, как в Примере 1. В этом примере модифицированная РНК VEGF-A имела последовательность SEQ ID NO: 3.

[0146] Самцов мышей db/db (C57BL/6J, BKS.Cg-m^{+/+}Lepr^{db}/BomTac Homozygous, Taconic Denmark) анестезировали изофлураном. Эти мыши представляют собой признанную модель диабета II типа и имеют ослабленное заживление ран по сравнению с мышами дикого типа. Спину у мышей побрили, а оставшиеся волосы удалили с помощью крема для удаления волос. Модифицированную РНК VEGF-A (100 мкг) в цитратном физиологическом растворе или модифицированную РНК VEGF-A (3 мкг) в ЛНЧ (см. Пример 1) вводили внутрикожно в виде 4 отдельных инъекций (по 10 мкл каждая, общий объем 40 мкл) в пределах круглого участка размером 0,785 мм². В predetermined моменты времени после внутрикожных инъекций мышей анестезировали, и инъекцированные участки кожи отбирали и быстро замораживали в жидком азоте и хранили при 80°C. Все образцы были проанализированы на белок человеческого VEGF-A.

[0147] Образцы от мышей db/db, которым вводили 100 мкг модифицированной РНК VEGF-A, приготовленной в цитратном физиологическом растворе, отбирали через 6, 24, 48, 72 и 144 часа после инъекции. Образцы от мышей db/db, которым вводили 3 мкг модифицированной РНК VEGF-A, составленной в ЛНЧ, отбирали через 3, 6, 24, 48, 72, 144 часа после инъекции.

Количественное определение белка человеческого VEGF-A в коже мыши

[0148] Для подготовки образцов кожи для анализа содержания человеческого белка VEGF-A в биоптаты замороженной ткани добавляли буфер Трис для лизиса, содержащий ингибиторы фосфатазы I и II и ингибитор протеазы (Meso Scale Discovery (MSD), Роквилл, Мэриленд, США) и замораживали при примерно 20°C до гомогенизации. Затем добавляли стальные шарики (3 мм) и образцы гомогенизировали на аппарате для гомогенизации Precellys. Гомогенаты центрифугировали и надосадочные жидкости хранили при 80°C до проведения анализа.

[0149] Концентрации человеческого VEGF-A определяли, применяя иммунологический сэндвич-анализ с детектированием по электрохимической люминесценции. Набор для анализа человеческого VEGF-A MSD® 96-well MULTI-ARRAY® (Mesoscale, Роквилл, Мэриленд) использовали для измерения концентрации VEGF-A в гомогенатах ткани. Этот анализ обнаруживает только человеческий белок VEGF-A и, таким образом, служит для анализа только VEGF-A, экспрессируемого из модифицированной РНК. Анализ выполняли согласно инструкциям в наборе. Стандарты серийно разводили в разбавителях MSD. Образцы с высокой концентрацией разбавляли разбавителями MSD перед анализом, чтобы они соответствовали стандартной кривой, и планшеты считывали на Sector Imager 6000 от Meso Scale Discovery.

Результаты

[0150] На ФИГ. 3 и 4 приведены временные профили и уровень продуцирования человеческого белка VEGF-A после внутрикожной инъекции модифицированной РНК VEGF-A, приготовленной в цитратном физиологическом растворе (100 мкг) и ЛНЧ (3 мкг), соответственно. Наблюдали эффективное продуцирование белка в течение 6 и 3 часов, соответственно (ФИГ.4). В частности, состав ЛНЧ приводил к продуцированию более чем примерно 400 пг/мг белка VEGF-A в течение 8 часов (ФИГ.4). Кроме того, состав ЛНЧ приводил к продуцированию более чем примерно 1 пг/мг белка VEGF-A в течение периода до 6 дней (ФИГ.3). Продуцирование белка VEGF-A было существенно увеличено, когда модифицированная РНК VEGF-A была приготовлена в ЛНЧ по сравнению с цитратным физиологическим раствором (ФИГ. 3 и 4).

[0151] В Таблице 2 приведены фармакокинетические параметры, полученные после внутрикожной инъекции модифицированной РНК VEGF-A, приготовленной в

цитратном физиологическом растворе (100 мкг) и ЛНЧ (3 мкг). C_{max} увеличилась в 13,7 раза в случае модифицированной РНК VEGF-A, приготовленной в ЛНЧ, несмотря на тот факт, что доза составляла только 3% от модифицированной РНК VEGF-A, приготовленной в цитратном физиологическом растворе. Общая площадь под кривой концентрации AUC_{0-t} увеличилась в 6,6 раза при введении 3 мкг модифицированной РНК VEGF-A, приготовленной в ЛНЧ, по сравнению со 100 мкг модифицированной РНК VEGF-A, приготовленной в цитратном физиологическом растворе.

Таблица 2. Фармакокинетические параметры, рассчитанные из концентраций человеческого VEGF-A, полученных в двух временных рядах с модифицированной РНК человеческого VEGF-A в цитратном физиологическом растворе и ЛНЧ, соответственно. Общая площадь под кривой концентрации (AUC_{0-t}) рассчитывали, основываясь на профиле медианы данных, измеренных в точках вплоть до 144 часов после введения дозы.

Группа	Доза (мкг)	T_{max} (ч)	C_{max} (пг/мг ткани)	$AUC_{(0-t)}$ (пг*ч/мг ткани)	$t_{1/2}$ (ч)
ЛНЧ	3	6	424	5296	50
Цитратный физиологический раствор	100	24	31	806	40

8.3. ПРИМЕР 3

Влияние на заживление ран внутрикожной инъекции модифицированной РНК человеческого VEGF-A

Материалы и методы

[0152] Составы с липидными наночастицами и цитратным физиологическим раствором, содержащие модифицированную РНК VEGF-A и Соединение А, получали, как в Примере 1. В этом примере модифицированная РНК VEGF-A имела последовательность SEQ ID NO: 4. Кроме того, нетранслируемую модифицированную РНК VEGF-A (SEQ ID NO: 6) использовали для приготовления определенных составов наночастиц или цитрата физиологического раствора, как показано на фигурах.

[0153] Самцов мышей db/db в возрасте 12 недель (B6.BKS(D)-Leprdb/J) из Jackson Lab USA анализировали на содержание глюкозы в крови после 4 часов голодания и затем рандомизировали в группы для обработки. Мышей анестезировали изофлураном.

Спинную поверхность каждой мыши брили с помощью электрической машинки для стрижки, а затем оставшиеся волосы удаляли, используя средство для удаления волос. Кожу промывали дескутаном и этанолом. Полнослойную рану на спине каждой мыши создавали, используя 10-миллиметровый биопсийный перфоратор, а затем вырезали в стерильных условиях и покрывали повязкой Tegaderm. На 3-й день после ранения повязку Tegaderm удаляли. Состав с наночастицами или цитратным физиологическим раствором вводили внутрикожно в виде 4 отдельных инъекций (по 10 мкл каждая, общий объем 40 мкл) в местоположениях, близких к краю раны. Затем рану покрывали новой повязкой Tegaderm. В течение периода наблюдения мышей держали отдельно, чтобы избежать вмешательства в заживление ран.

[0154] Заживление раны определяли по временному ряду (т.е. каждый 3/4-й день до 17-го дня после ранения) цифровых фотографий, сделанных на фиксированном расстоянии и при непрямом освещении. Площадь раны определяли путем отслеживания края раны с использованием программного обеспечения для анализа изображений Image J, а затем рассчитывали как процент площади от базового уровня на 3-й день после ранения непосредственно перед введением дозы.

[0155] Статистическую оценку проводили с помощью непарного двустороннего критерия Стьюдента, и значения $p < 0,05$ считали значимыми.

Результаты

[0156] Как показано на ФИГ. 5, на 7-й день состав на основе липидных наночастиц, содержащий 1 мкг или 3 мкг модифицированной РНК VEGF-A, значительно улучшал заживление ран по сравнению с составом на основе липидных наночастиц, содержащим 3 мкг нетранслируемого VEGF-A, а также составом на основе цитратного физиологического раствора, содержащим 100 мкг модифицированной РНК VEGF-A. Кроме того, на 10-й день состав на основе липидных наночастиц, содержащий 1 мкг или 3 мкг модифицированной РНК VEGF-A, значительно улучшал заживление ран по сравнению с составом на основе липидных наночастиц, содержащим 3 мкг нетранслируемой модифицированной РНК VEGF-A. На 10-й день не было значительного различия между составом на основе липидных наночастиц, содержащим 1 мкг или 3 мкг модифицированной РНК VEGF-A, и составом на основе цитратного физиологического раствора, содержащим 100 мкг модифицированной РНК VEGF-A.

[0157] В отдельном эксперименте, показанном на ФИГ. 6, на 7-й день состав на основе липидных наночастиц, содержащий 3 мкг модифицированной РНК VEGF-A, значительно улучшал заживление ран по сравнению с составом на основе липидных наночастиц, включающим 3 мкг нетранслируемой модифицированной РНК VEGF-A, а также составом на основе цитратного физиологического раствора, который не содержит какую-либо модифицированную РНК. Кроме того, на 10-й день состав на основе липидных наночастиц, содержащий 3 мкг модифицированной РНК VEGF-A, значительно улучшал заживление ран по сравнению с составом на основе липидных наночастиц, содержащим 3 мкг нетранслируемой модифицированной РНК VEGF-A.

[0158] На ФИГ. 7 показан другой эксперимент по заживлению ран. На 7-й день состав на основе липидных наночастиц, содержащий 3 мкг модифицированной РНК VEGF-A, значительно улучшал заживление ран по сравнению с составом на основе липидных наночастиц, содержащим 3 мкг GFP-модифицированной РНК, составом на основе липидных наночастиц, который не содержал какой-либо модифицированной РНК, или составом на основе цитратного физиологического раствора, который не содержал какой-либо модифицированной РНК. Кроме того, на 10-й день состав на основе липидных наночастиц, содержащий 3 мкг модифицированной РНК VEGF-A, значительно улучшал заживление ран по сравнению с составом на основе липидных наночастиц, содержащим 3 мкг GFP-модифицированной РНК.

[0159] Как показано на ФИГ. 8, на 7 или 10 день, не было значительных различий в заживлении после внутрикожных инъекций следующих четырех составов: (1) состав на основе липидных наночастиц, содержащий 3 мкг нетранслируемой модифицированной РНК VEGF-A, (2) состав на основе цитратного физиологического раствора, содержащий 100 мкг модифицированной РНК VEGF-A, (3) состав на основе цитратного физиологического раствора, содержащий 100 мкг нетранслируемой модифицированной РНК VEGF-A, и (4) состав на основе цитратного физиологического раствора, который не содержит какой-либо модифицированной РНК.

9. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

[0160] 9.1. SEQ ID NO: 1: Модифицированная РНК, кодирующая VEGF-A

5¹⁷MeG_{ppp}G_{2'}OMeGGAAAUAAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUUAAGAGCC
ACCAUGAACUUUCUGCUGUCUUGGGUGCAUUGGAGCCUUGCCUUGCUGCUCUA
CCUCCACCAUGCCAAGUGGUCCCAGGCUGCACCCAUGGCAGAAGGAGGAGGGC

AGAAUCAUCACGAAGUGGUGAAGUUCAUGGAUGUCUAUCAGCGCAGCUACUGC
CAUCCAAUCGAGACCCUGGUGGACAUCUCCAGGAGUACCCUGAUGAGAUCGA
GUACAUCUUCAAGCCAUCCUGUGUGCCCCUGAUGCGAUGCGGGGGCUGCUGCA
AUGACGAGGGCCUGGAGUGUGUGCCCACUGAGGAGUCCAACAUCACCAUGCAG
AUUAUGCGGAUCAAACCUCACCAAGGCCAGCACAUAGGAGAGAUGAGCUUCCU
ACAGCACAACAAAUGUGAAUUGCAGACCAAAGAAAGAUAGAGCAAGACAAGAAA
AUCCCUGUGGGCCUUGCUCAGAGCGGAGAAAGCAUUUGUUUGUACAAGAUCCG
CAGACGUGUAAAUGUCCUGCAAAAACACAGACUCGCGUUGCAAGGCGAGGCA
GCUUGAGUUAACGAACGUACUUGCAGAUGUGACAAGCCGAGGCGGUGAAU
AGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGCCCC
UCCUCCCCUUCUGCACCCGUACCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGG
GCGGCAAA
AA
AUCUAG_{OH3'} (SEQ ID NO: 1)

где:

A, C, G и U= AMP, CMP, GMP и N1-метил-псевдо-UMP соответственно

Me = метил

p = неорганический фосфат

[0161] 9.2. SEQ ID NO: 2: Аминокислотная последовательность изоформы VEGF-165 VEGF-A человека

MNFLLSVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHP
IETLVDIFQEYPDEIEYIFKPCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTTEESNITMQIMRIKPHQG
QHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCCKNTDSR
CKARQLELNERTCRCDKPRR (SEQ ID NO: 2)

[0162] 9.3. SEQ ID NO: 3: Модифицированная РНК, кодирующая VEGF-A

⁵MeG_{ppp}G_{2'}OMeAGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGC
CACCAUGAACUUUCUGCUGUCUUGGGUGCAUUGGAGCCUUGCCUUGCUCUCU
ACCUCCACCAUGCCAAGUGGUCCCAGGCUGCACCCAUGGCAGAAGGAGGAGGG
CAGAAUCAUCACGAAGUGGUGAAGUUCAUGGAUGUCUAUCAGCGCAGCUACUG

CCAUCCAAUCGAGACCCUGGUGGACAUCUUCAGGAGUACCCUGAUGAGAUCG
 AGUACAUCUUCAAGCCAUCCUGUGUGCCCCUGAUGCGAUGCGGGGGCUGCUGC
 AAUGACGAGGGCCUGGAGUGUGUGCCCACUGAGGAGUCCAACAUCACCAUGCA
 GAUUAUGCGGAUCAAAACCUCACCAAGGCCAGCACAUAGGAGAGAUGAGCUUCC
 UACAGCACAACAAAUGUGAAUGCAGACCAAAGAAAGAUAGAGCAAGACAAGAA
 AAUCCCUGUGGGCCUUGCUCAGAGCGGAGAAAGCAUUUGUUUGUACAAGAUC
 GCAGACGUGUAAAUGUUCUGCAAAAACACAGACUCGCGUUGCAAGGCGAGGC
 AGCUUGAGUUAACGAACGUACUUGCAGAUGUGACAAGCCGAGGCGGUGAUAA
 UAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGCCC
 CUCCUCCCCUUCUGCACCCGUACCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUG
 GGCGGCAA
 AA
 AAUCUAG_{он3'} (SEQ ID NO: 3)

где:

A, C, G и U= AMP, CMP, GMP и N1-метил-псевдо-UMP соответственно

Me = метил

p = неорганический фосфат

[0163] 9.4. SEQ ID NO: 4: Модифицированная РНК, кодирующая VEGF-A (VEGF-01-012)

5¹⁷MeG_{ppp}GGGAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACC
 AUGAACUUUCUCCUUUCUUGGGUGCAUUGGAGCCUUGCCUUGUUACUCUACCU
 CCACCACGCCAAGUGGUCCCAGGCCGCACCCAUGGCAGAAGGAGGAGGGCAGA
 AUCAUCACGAAGUGGUGAAGUUCAUGGACGUCUAUCAGCGCAGCUACUGCCAU
 CCAAUCGAGACACUGGUGGACAUCUUCAGGAGUACCCUGAUGAGAUCGAGUA
 CAUCUUCAAGCCAUCCUGUGUGCCCCUGAUGCGAUGCGGCGGCUGCUGCAAUG
 ACGAGGGCCUGGAGUGUGUGCCUACUGAGGAGUCCAACAUCACCAUGCAGAUU
 AUGCGGAUCAAAACCUCACCAAGGCCAGCACAUAGGAGAGAUGAGCUUCCUACA
 GCACAACAAAUGUGAAUGCAGACCAAAGAAAGAUAGAGCAAGACAAGAGAAUC
 CCUGUGGGCCUUGCUCAGAGCGGAGAAAGCAUUUGUUUGUACAAGAUCCGCAG
 ACGUGUAAAUGUUCUGCAAGAACACAGACUCGCGUUGCAAGGCGAGGCAGCU

UGAGUUAAACGAACGUACUUGCAGAUGUGACAAGCCGAGGCGGUGAUAAUAG
 GCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGCCCCUC
 CUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGC
 GGCAAA
 AAU
 CUAG3' (SEQ ID NO: 4)

где:

A, C, G и U= AMP, CMP, GMP и N1-метил-псевдо-UMP соответственно

p = неорганический фосфат

[0164] **9.5. SEQ ID NO: 5: Модифицированная РНК, кодирующая VEGF-A**

5¹⁷MeG_{ppp}AGGAAUUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAUUAAGAGCCACC
 AUGAACUUUCUGCUGUCUUGGGUGCAUUGGAGCCUUGCCUUGCUCUCUACCU
 CCACCAUGCCAAGUGGUCCCAGGCUGCACCCAUGGCAGAAGGAGGAGGGCAGA
 AUCAUCACGAAGUGGUGAAGUUCAUGGAUGUCUAUCAGCGCAGCUACUGCCA
 CCAUUCGAGACCCUGGUGGACAUCUUCAGGAGUACCCUGAUGAGAUUCGAGUA
 CAUCUUCAAGCCAUCCUGUGUGCCCCUGAUGCGAUGCGGGGGCUGCUGCAAUG
 ACGAGGGCCUGGAGUGUGUGCCCACUGAGGAGUCCAACAUCACCAUGCAGAUU
 AUGCGGAUCAAAACCUCACCAAGGCCAGCACAUAGGAGAGAUGAGCUUCCUACA
 GCACAACAAAUGUGAAUGCAGACCAAAGAAAGAUAGAGCAAGACAAGAAAUC
 CCUGUGGGCCUUGCUCAGAGCGGAGAAAGCAUUUGUUUGUACAAGAUCGCAG
 ACGUGUAAAUGUUCUGCAAAAACACAGACUCGCGUUGCAAGGCGAGGCAGCU
 UGAGUUAAACGAACGUACUUGCAGAUGUGACAAGCCGAGGCGGUGAUAAUAG
 GCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGCCCCUC
 CUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGC
 GGCAAA
 AAU
 CUAG3' (SEQ ID NO: 5)

где:

A, C, G и U= AMP, CMP, GMP и N1-метил-псевдо-UMP соответственно

p = неорганический фосфат

[0165] **9.6. SEQ ID NO: 6: Нетранслируемая модифицированная РНК VEGF-
A**

5^{7Me}G_{ppp}GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACC
ACGAACUUUGUGCUCUCUCUUGGGUGCAUUGGAGCCUUGCCUUGCUGCUCUACCU
CCACCACGCCAAGUGGUCCCAGGCCGCACCCACGGCAGAAGGAGGAGGGCAGA
AUCAUCACGAAGUGGUGAAGUUCACGGACGUCUAUCAGCGCAGCUACUGCCAU
CCAAUCGAGACCCUCGUGGACAUCUUCAGGAGUACCCUCACGAGAUCGAGUA
CAUCUUCAAGCCAUCCUGUGUGCCCCUGACGCGACGCGGGGGCUGCUGCAACG
ACGAGGGCCUCGAGUGUGUGCCCACCGAGGAGUCCAACACCACCACGCAGAUU
ACGCGGAUCAAAACCUCACCAAGGCCAGCACAUAGGAGAGACGAGCUUCCUACA
GCACAACAAACGUGAACGCAGACCAAAGAAAGAUAGAGCAAGACAAGAAAUC
CCUGUGGGCCUUGCUCAGAGCGGAGAAAGCAUUUGUUUGUACAAGAUCGCAG
ACGUGUAAACGUUCCUGCAAAAACACAGACUCGCGUUGCAAGGCGAGGCAGCU
UGAGUUAAACGAACGUACUUGCAGACGUGACAAGCCGAGGCGGUGAUAAUAGG
UUGGAGCCUCGGUGGCCACGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGCCCCUCC
UCCCCUCCUGCACCCGUACCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCG
GCAA
AAA3'
(SEQ ID NO: 6)

где:

A, C, G и U= AMP, CMP, GMP и N1-метил-псевдо-UMP соответственно

p = неорганический фосфат

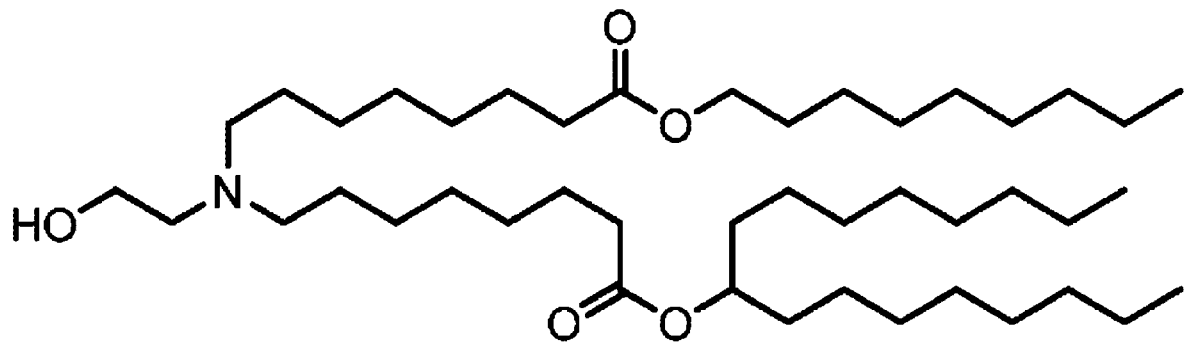
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модифицированная РНК (мРНК), кодирующая полипептид VEGF-A, имеющий последовательность SEQ ID NO: 2, где мРНК содержит кодирующий участок SEQ ID NO: 1.

2. Фармацевтический состав, содержащий модифицированную мРНК по п. 1 и фармацевтически приемлемое формообразующее.

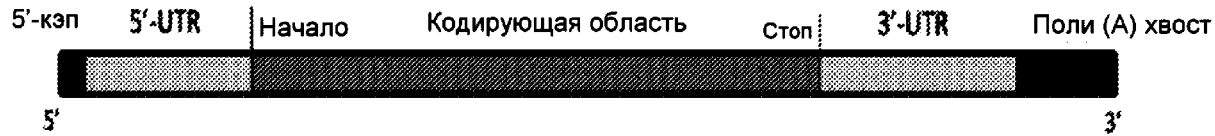
3. Способ (1) стимулирования и/или улучшения заживления ран, (2) индуцирования образования новых кровеносных сосудов, (3) индуцирования ангиогенеза или (4) увеличения плотности капилляров и/или артериол, включающий введение субъекту-человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества фармацевтического состава по п. 2.

ФИГ. 1



(Соединение А)

ФИГ. 2А



ФИГ. 2В

5' ^{7Me}G_{ppp} G_{2 OMe} GGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACCAUGAACUUUCUGCUGUCUUG
GGUGCAUUGGAGCCUUGCCUUGCUCUACCUCACCAUGCCAAGUGGUCCCAGGCUGCACCCAUGGCAGAAG
GAGGAGGGCAGAAUCAUCACGAAGUGGUGAAGUUAUGGAUGUCUAUCAGCGCAGCUACUGCCAUCCAAUCGAG
ACCCUGGUGGACAUCUUCAGGAGUACCCUGAUGAGAUCGAGUACAUCUUAAGCCAUCCUGUGUGCCCCUGAU
GCGAUGCGGGGGCUGCUGCAAUGACGAGGGCCUGGAGUGUGUGCCCACUGAGGAGUCCAACAUCACCAUGCAG
AUUAUGCGGAUCAAAACCUCACCAAGGCCAGCACAUAGGAGAGAUGAGCUUCCUACAGCACAAACAAAUGUGAAUGC
AGACCAAAGAAAGAUAGAGCAAGACAAGAAAUCCCUGUGGGCCUUGCUCAGAGCGGAGAAAGCAUUUGUUUGUA
CAAGAUCGCGAGACGUGUAAAUGUCCUGCAAAAACACAGACUCGCGUUGCAAGGCGAGGCAGCUUGAGUUAAAC
GAACGUACUUGCAGAUGUGACAAGCCGAGGCGGUGAUAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCC
UUGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCUUCCUGCACCCGUACCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGG
CGGCAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUCUAG_{OH} 3' (SEQ ID NO: 1)

где:

A, C, G & U= AMP, CMP, GMP & N1-метил-псевдо-UMP соответственно

Me = метил

p = неорганический фосфат

FIG. 3

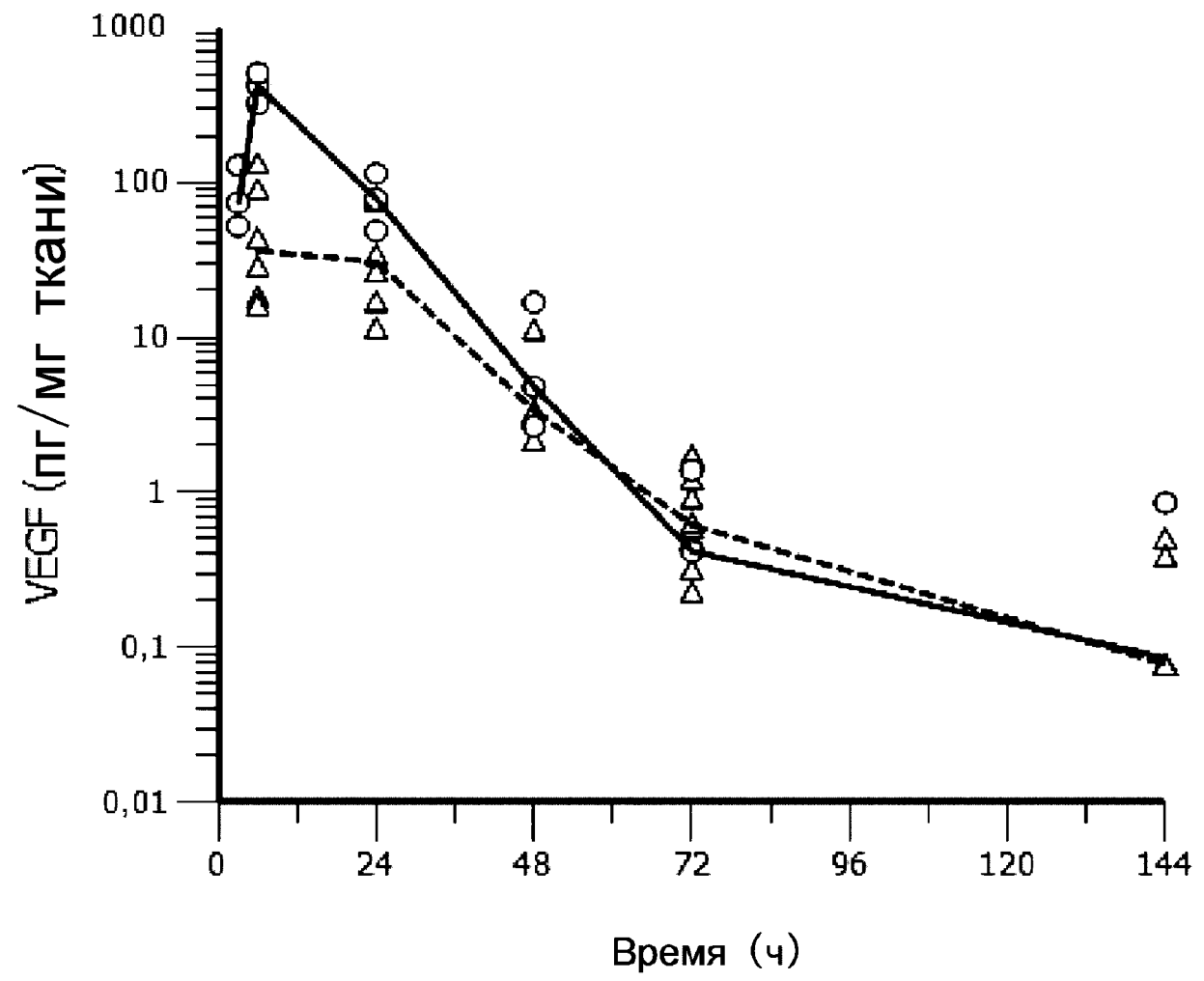
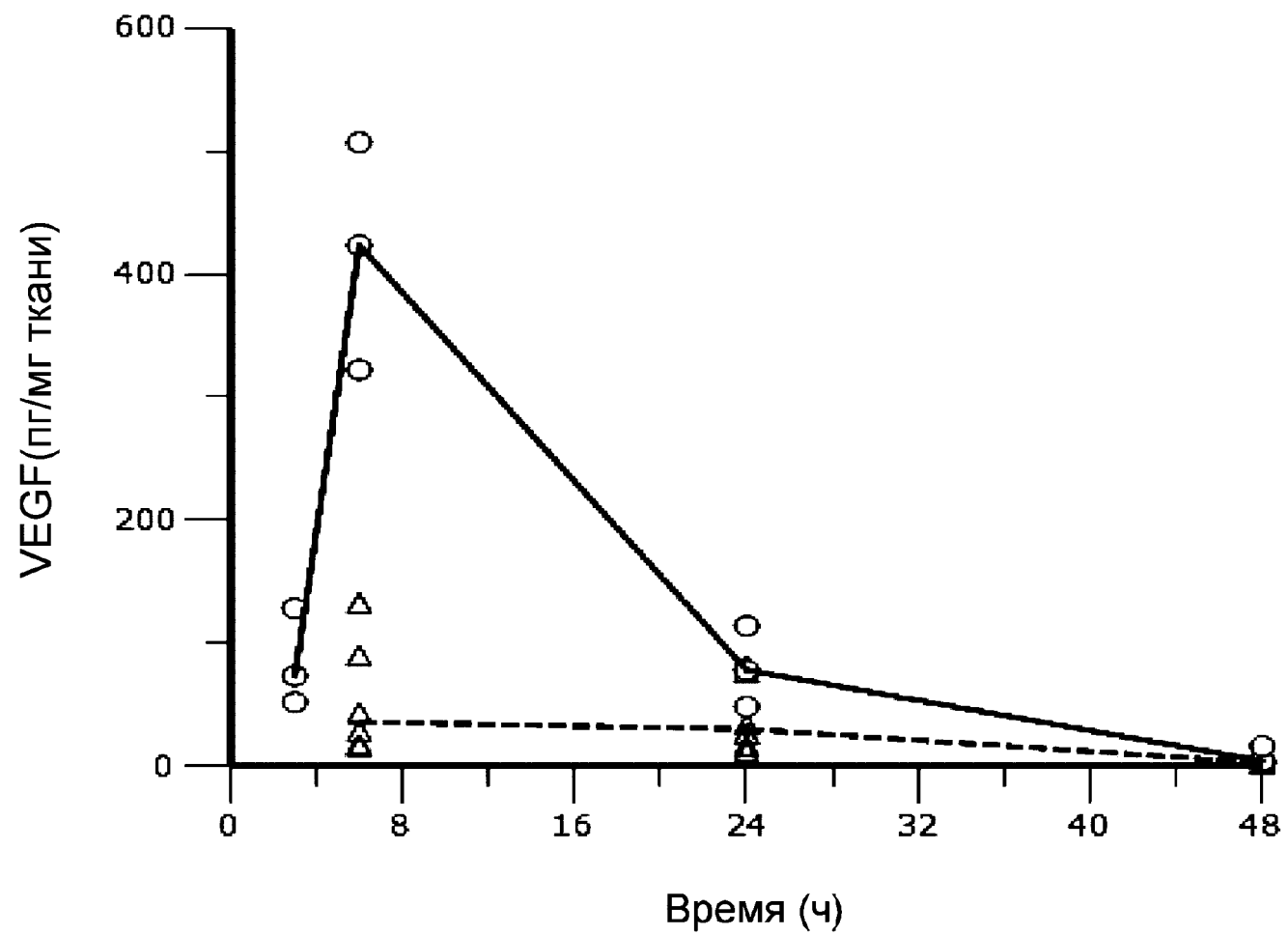
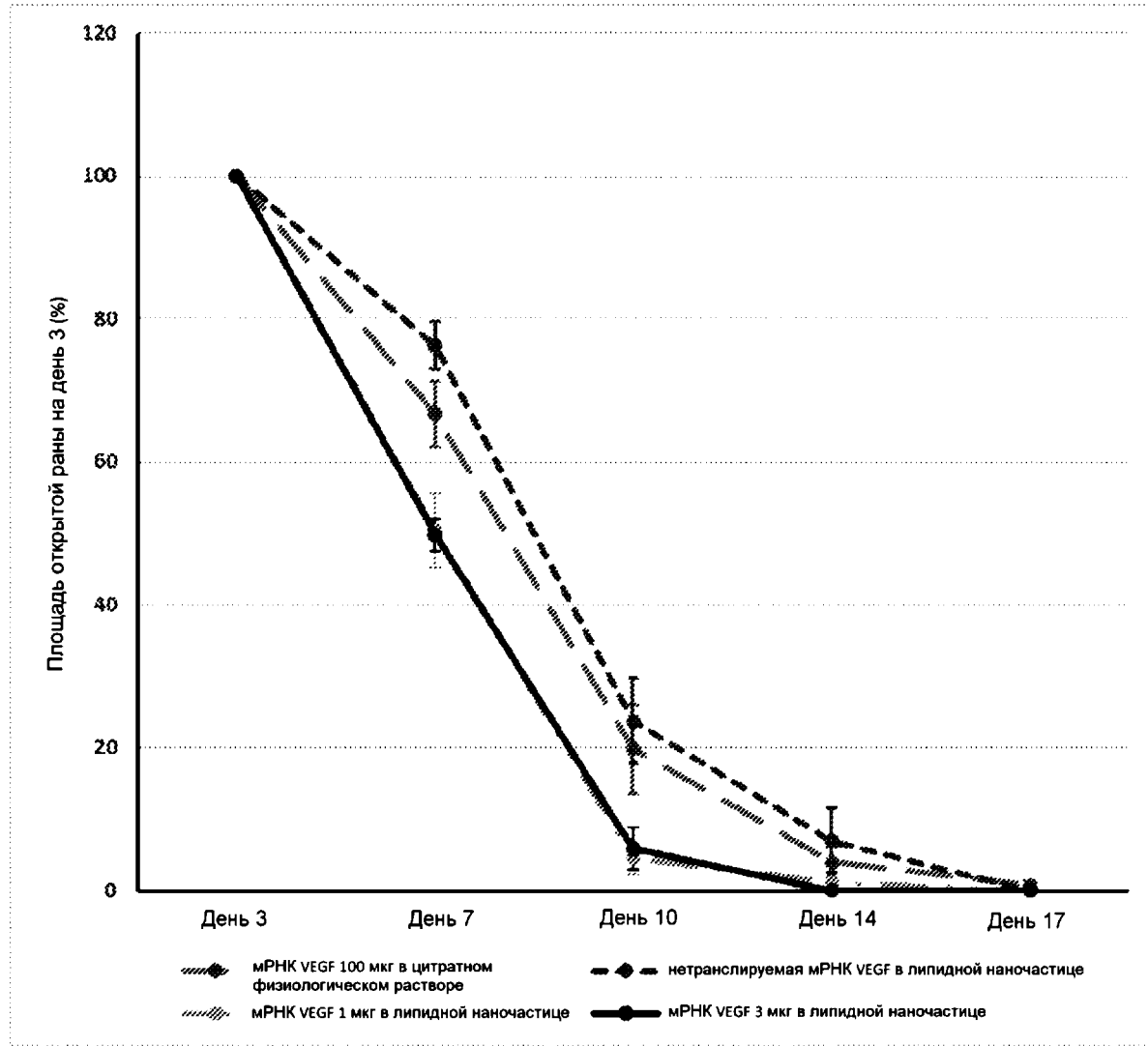


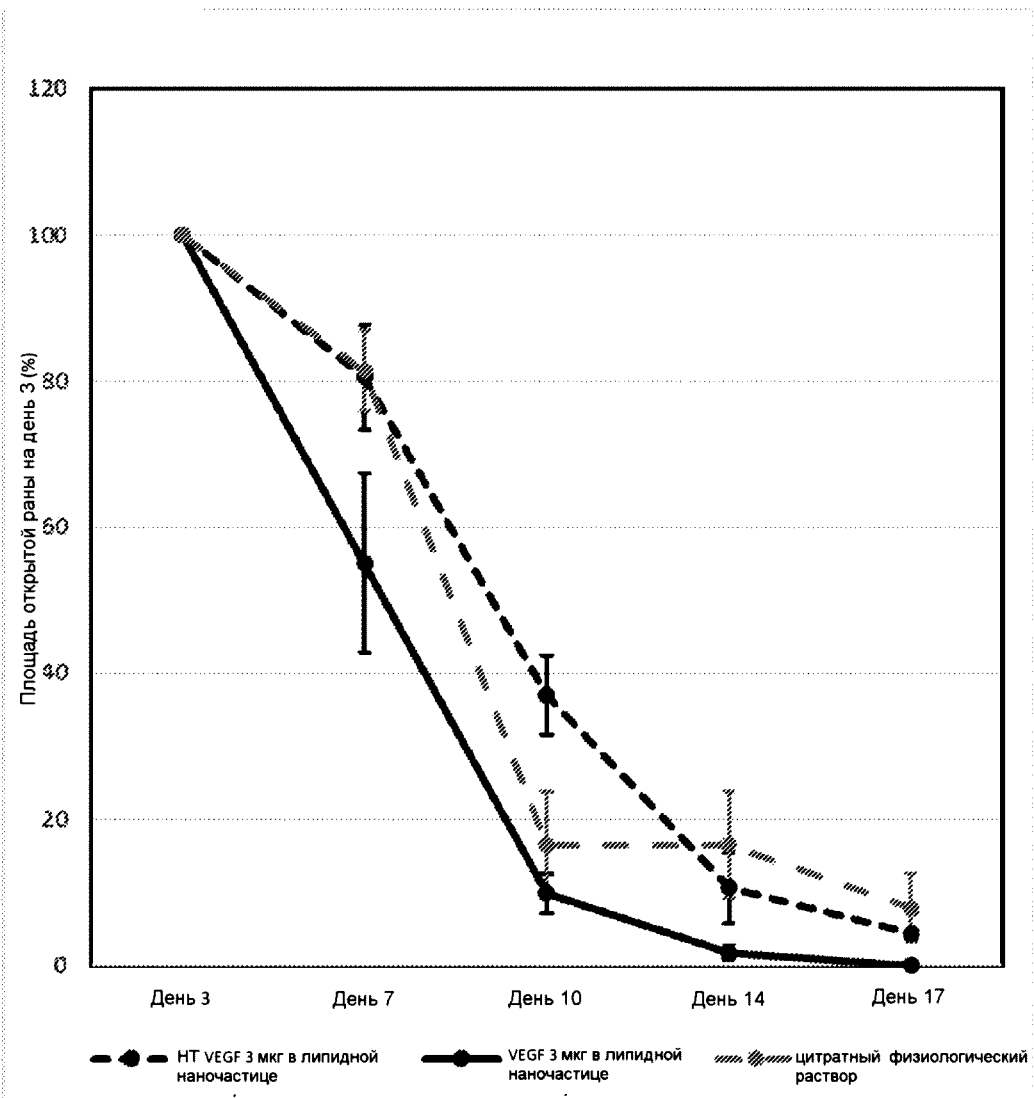
FIG. 4



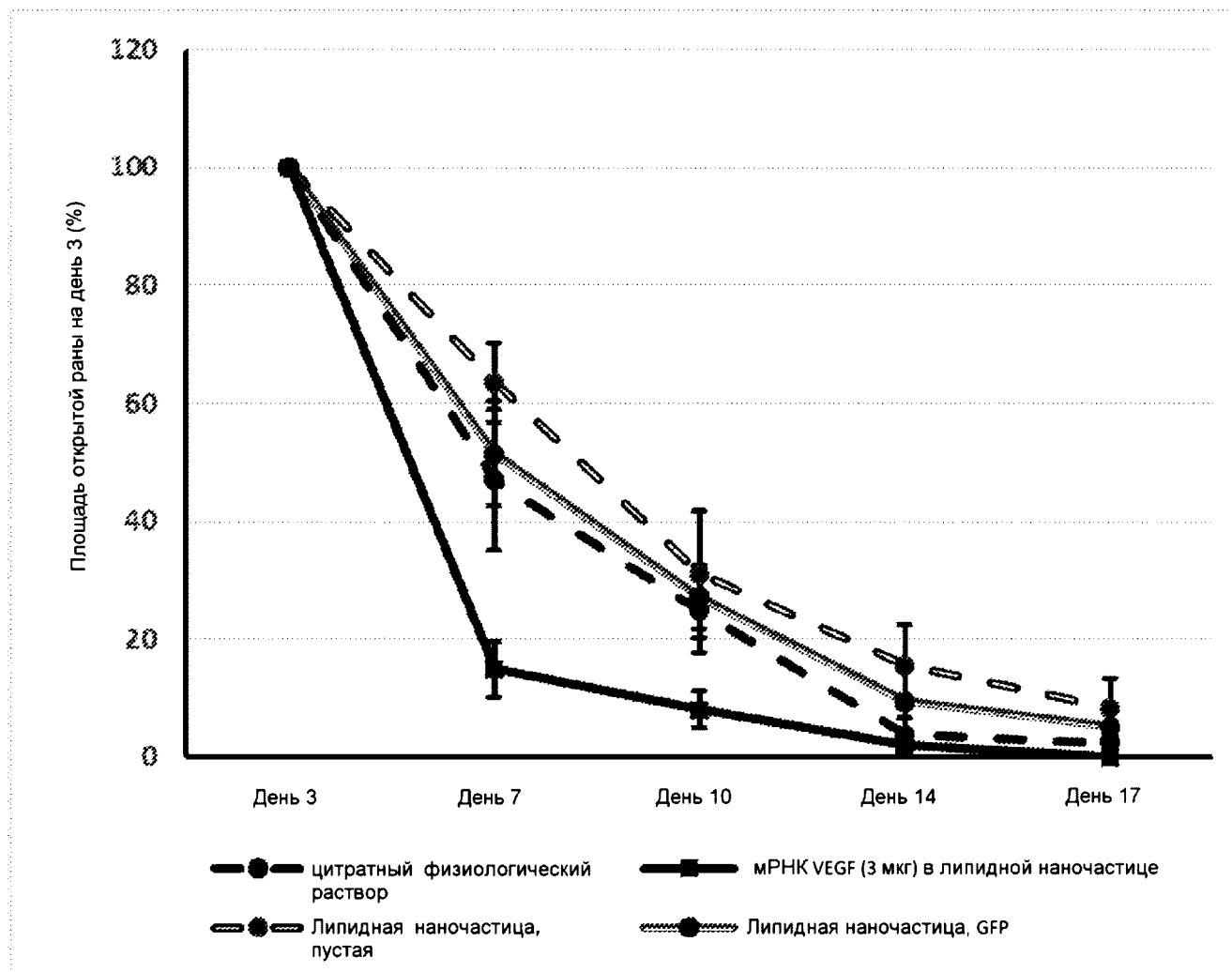
ФИГ. 5



ФИГ. 6



ФИГ. 7



ФИГ. 8

