

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490179 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.09.06

(51) Int. Cl. *A61K 9/14* (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.07.08

(54) РНК, АДСОРБИРОВАННАЯ НА ЧАСТИЦАХ НАНОЭМУЛЬСИИ ЛИПИДОВ, И ЕЕ КОМПОЗИЦИИ

(31) 202121031414

(72) Изобретатель:

(32) 2021.07.13

Сингх Санджэй, Кавирадж Сварненду,

(33) IN

Сингх Эджей, Рагхуванши Арджун

(86) PCT/IN2022/050624

Сингх, Кардайл Паван, Шукла

(87) WO 2023/286076 2023.01.19

Шалу, Кулкарни Айшварья, Агравал

(71) Заявитель:

Правин, Раут Сунил (IN)

ДЖЕННОВА

(74) Представитель:

БИОФАРМАСЬЮТИКАЛЗ ЛТД. (IN)

Хмара М.В. (RU)

(57) РНК, адсорбированная на частицах наноэмульсии липидов, и ее композиции. Настоящее изобретение относится к способу получения жидкой композиции РНК, комплексированной с частицами наноэмульсии липидов или наноносителями. Согласно нему, в частности, предложен способ получения РНК, адсорбированной на частицах наноэмульсии липидов в жидкости, и композиции указанных комплексов РНК, как таковых.

T7P > 5'-UTR > NSP1 > NSP2 > NSP3 > NSP4 > SS > ИНТЕРЕСУЮЩИЙ ГЕН > 3'-UTR > ПОЛИ А



| S/N | ПЛАЗМИДА | ИНТЕРЕСУЮЩИЙ ГЕН |
|-----|----------|---|
| 1 | pVEE-614 | МУТАНТ B614G (также известный как B.1) БЕЛКА ШИЦА ВИРУСА SARS-COV-2 |
| 2 | pVEE-628 | МУТАНТ AY1 БЕЛКА ШИЦА ВИРУСА SARS-COV-2 |
| 3 | pVEE-627 | МУТАНТ AY2 БЕЛКА ШИЦА ВИРУСА SARS-COV-2 |
| 4 | pVEE-626 | МУТАНТ B.1.617.2 БЕЛКА ШИЦА ВИРУСА SARS-COV-2 |
| 5 | pVEE-625 | МУТАНТ B.1.618 БЕЛКА ШИЦА ВИРУСА SARS-COV-2 |

A1

202490179

202490179

A1

РНК, АДСОРБИРОВАННАЯ НА ЧАСТИЦАХ НАНОЭМУЛЬСИИ ЛИПИДОВ, И ЕЕ КОМПОЗИЦИИ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способу получения липидной композиции РНК, комплексированной с частицами наноэмульсии липидов или наноносителями. Согласно нему, в частности, предложен способ получения РНК, адсорбированной на частицах наноэмульсии липидов в жидкости, и композиции указанных комплексов РНК как таковые.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

С недавнего времени нуклеиновые кислоты, как таковые, используются в терапевтических и диагностических целях во многих терапевтически релевантных фармацевтических приложениях. В качестве примера, в последние годы многообещающие результаты были достигнуты в области терапии на основе РНК. В данном документе разные типы молекул РНК рассматриваются как важные средства генотерапии, а также в качестве профилактической и терапевтической вакцинации против многих инфекционных и злокачественных заболеваний.

Нуклеиновые кислоты: и ДНК, и РНК, широко использовали в генотерапии либо голыми, либо в комплексированных формах. Применение РНК является полезным в современной молекулярной медицине, имея некоторые превосходящие свойства над применением ДНК. Как известно, трансфекция молекул ДНК может приводить к серьезным осложнениям, и данные риски не случаются при применении, в частности, мРНК вместо ДНК. Преимуществом применения РНК, а не ДНК, является то, что не должен вводиться промоторный элемент вирусного происхождения *in vivo*, может не происходить интеграция в геном, и РНК не нужно транспортироваться в ядро для экспрессии.

Применение РНК, как таковых, в качестве фармацевтических средств было ограничено из-за их чувствительности к деградации и проблем доставки через клеточные мембраны при инъекции в организм животных или человеческих субъектов. Молекулы РНК по своей природе являются нестабильными из-за ее структурных свойств и быстро деградируют при обычных условиях, если она не стабилизирована.

Таким образом, целью настоящего изобретения является предложение способа эффективной доставки молекул мРНК, модифицирующих заболевание, в

комбинации с новыми частицами наноэмульсии липидов [также именуемых наноносителями], образующих жидкую фармацевтическую композицию, которая является клинически эффективной, безопасной, масштабируемой, а также экономичной в отношении затрат времени и рентабельной. Следовательно, целью данного изобретения является предложение композиции указанных частиц наноэмульсии липидов и способа комплексирования интересующих молекул мРНК с данными частицами, и такие молекулы РНК при транспортировке в клетку, ткань или организм генерируют требующиеся терапевтические или иммунологические эффекты. Другой целью данного изобретения является предложение способов получения молекул мРНК и подходящих наноносителей для указанных композиций.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение имеет следующие аспекты:

1. Молекулы мРНК и их получение;
2. Частицы наноэмульсии липидов или наноносители и их получение; и
3. Получение жидких композиций указанных молекул мРНК, адсорбированных на указанных наноносителях.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к получению молекул РНК или мРНК, способных экспрессировать белок или пептид при доставке внутрь живой клетки с использованием наноносителей. Указанная РНК, будучи терапевтической или профилактической по природе, является полезной в фармацевтических приложениях. Указанные мРНК имеют последовательности интересующих генов, которые могут относиться к антигенам, происходящим от генов вирусов, бактерий или других микроорганизмов, или высших организмов.

В предпочтительном воплощении указанная РНК или мРНК содержит от 50 до 50000 нуклеотидов, предпочтительно имея от 200 до 15000 нуклеотидов, и, более предпочтительно, имея от 500 до 12000 нуклеотидов. Помимо матричной РНК, в изобретении, раскрытом в данном документе, могут использоваться некодирующие типы, такие как рибосомальная РНК или транспортная РНК, и другие кодирующие молекулы РНК, такие как вирусная РНК, ретровирусная РНК, самореплицируемая РНК, малая интерферирующая РНК, микроРНК, малая ядерная РНК, малая шпилечная РНК или их комбинация. Кроме того, указанные кодирующие или некодирующие РНК могут содержать модифицированную РНК, имеющую улучшенные свойства, подобные стабильности *in vitro* и *in vivo*.

Указанная модификация РНК может относиться к химическим модификациям, включающим модификации остова, а также к модификациям сахара или модификациям основания.

В раскрытом в данном документе изобретении указанная РНК может кодировать белок или пептид, или антиген, который может быть выбран, без какого-либо ограничения, из терапевтически активных белков или пептидов, выбран из адъювантных белков, из опухолевых антигенов, патогенных антигенов (например, выбранных из антигенов животных, из вирусных антигенов, из антигенов простейших, из бактериальных антигенов), аллергенных антигенов, аутоиммунных антигенов или других антигенов, из аллергенов, из антител, из иммуностимулирующих белков или пептидов, или из любого другого белка или пептида, подходящего для терапевтического применения.

В данном документе молекула модифицированной РНК может содержать аналоги/модификации нуклеотидов, например, модификации остова, модификации сахара или модификации основания. Модификация в связи с настоящим изобретением представляет собой модификацию, при которой кэппирование молекул РНК осуществляется на 5'-конце с использованием ферментов *in vitro*.

В предпочтительном воплощении указанная жидкая композиция по изобретению содержит по меньшей мере одну РНК, где данная РНК представляет собой молекулу мРНК, имеющую по меньшей мере одну открытую рамку считывания, которая кодирует по меньшей мере один пептид или белок. Кроме того, указанная молекула модифицированной РНК имеет две или более чем две открытые рамки считывания для пептидов или белков, которые помогают репликации указанных молекул РНК *in vivo* [также именуемые самореплицируемые мРНК], и предпочтительно последовательность открытой рамки считывания в такой молекуле РНК является модифицированной, как описано в данном документе.

В настоящем изобретении указанная РНК, содержащаяся в указанной композиции, содержит 5' и/или 3' нетранслируемые области (5'-UTR или 3'-UTR соответственно). Предпочтительно по меньшей мере одна РНК содержит по меньшей мере одну, выбранную из группы, состоящей из 5'-UTR, 3'-UTR, последовательности поли(А) и/или последовательности поли(С). Более предпочтительно, по меньшей мере одна РНК содержит структуру 5'-CAP.

В настоящем изобретении 5'-UTR типично представляет собой часть мРНК, которая располагается между областью, кодирующей белок, и 5'-концом мРНК. 5'-

UTR мРНК не транслируется в какую-либо аминокислотную последовательность. 5'-UTR последовательность обычно кодируется геном, который транскрибируется в соответствующую мРНК во время процесса экспрессии гена. В контексте настоящего изобретения 5'-UTR соответствует последовательности зрелой мРНК, которая располагается 3' по отношению к последовательности промотора и непосредственно 5' относительно иницирующего кодона области, кодирующей белок.

В другом предпочтительном воплощении указанная РНК по изобретению содержит по меньшей мере одну 5'-UTR. Более предпочтительно по меньшей мере одна РНК содержит 5'-UTR, которая содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, происходящей из 5'-UTR гена вируса альфа. Предпочтительно по меньшей мере одна РНК содержит 5'-UTR, которая может происходить из гена, который относится к мРНК с повышенным временем полужизни. Нуклеотидная последовательность элемента 5'-UTR гена вируса альфа представляет собой именно ATAGGCGGCGCATGAGAGAAGCCCAGACCAATTACCTACCCAAA из штамма TC-83 вируса венесуэльского лошадиного энцефалита (VEEV).

В настоящем изобретении 3'-UTR типично представляет собой часть мРНК, которая располагается между областью, кодирующей белок, и 3'-концом мРНК. 3'-UTR мРНК не транслируется в какую-либо аминокислотную последовательность. 3'-UTR последовательность обычно кодируется геном, который транскрибируется в соответствующую мРНК во время процесса экспрессии гена. В контексте настоящего изобретения 3'-UTR соответствует последовательности зрелой мРНК, которая располагается 3' по отношению к терминирующему кодону области, кодирующей белок, предпочтительно непосредственно 3' по отношению к терминирующему кодону области, кодирующей белок, и которая простирается к 5'-стороне 3'-конца мРНК или к последовательности поли(А), предпочтительно к нуклеотиду, расположенному непосредственно 5' по отношению к последовательности поли(А).

В другом предпочтительном воплощении указанная РНК по изобретению содержит по меньшей мере одну 3'-UTR. Более предпочтительно по меньшей мере одна РНК содержит 3'-UTR, которая содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, происходящей из 3'-UTR гена вируса альфа. Предпочтительно по меньшей мере одна РНК содержит 3'-UTR, которая может происходить от гена, который относится к мРНК с повышенным временем полужизни. Нуклеотидная последовательность элемента 3'-UTR гена вируса

альфа представляет собой именно:

GGTGTCAAAAACCGCGTGGACGTGGTTAACATCCCTGCTGGGAGGATCAGCCGTAA
 TTATTATAATTGGCTTGGTGCTGGCTACTATTGTGGCCATGTACGTGCTGACCAACC
 AGAAACATAATTGAATACAGCAGCAATTGGCAAGCTGCTTACATAGAACTCGCGGC
 GATTGGCATGCCGCCTTAAAATTTTTATTTTATTTTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGA
 TTTTGTTTTTAATATTTTC из штамма TC-83 вируса венесуэльского лошадиного
 энцефалита (VEEV).

Предпочтительно по меньшей мере одна 5'-UTR и по меньшей мере одна 3'-UTR действуют синергично для увеличения продукции белка из указанной РНК, содержащейся в жидкой композиции по изобретению, которая доставляется в клетки.

В предпочтительном воплощении указанная РНК по изобретению, кроме того, содержит последовательность поли(А). Длина последовательности поли(А) может варьировать. Последовательность поли(А) может иметь длину от примерно 20 вплоть до примерно 300 адениновых нуклеотидов, предпочтительно от примерно 40 вплоть до примерно 200 адениновых нуклеотидов. Наиболее предпочтительно указанная РНК содержит последовательность поли(А) из от примерно 40 до примерно 60 нуклеотидов, наиболее предпочтительно 45 адениновых нуклеотидов.

В предпочтительном воплощении для синтеза указанной РНК ДНК-матрицу получают из плазмиды, культивируемой в линии клеток *E. coli*. Данную плазмиду выделяют из бактерий и ферментативно линеаризуют с получением ДНК-матрицы, или, в качестве альтернативы, указанную ДНК-матрицу получают полимеразной цепной реакцией с использованием малого количества плазмиды или бактериального хозяина, имеющего указанную плазмиду, в качестве источника реакции.

Как только готова ДНК-матрица, транскрипцию *in vitro* проводят в присутствии подходящего фагового промотора, не ограниченного промотором РНК-полимеразы Т7. Также можно использовать ингибитор РНК-полимеразы для защиты РНК от деградации. В реакции также используется фермент пирофосфатаза, который превращает нерастворимый пирофосфат в неорганический фосфат – побочный продукт транскрипции *in vitro*. ДНК-матрицу, ферментативную смесь и рНТФ (рибонуклеотидтрифосфаты) инкубируют при подходящих условиях с получением мРНК размером от 500 до 50000 нуклеотидов.

После синтеза мРНК ДНК-матрица деградирует в реакционной смеси посредством ферментов-ДНКаз в присутствии солей при подходящих условиях. Следующая стадия представляет собой защиту мРНК посредством 5'-кэппирования. Это может достигаться химическим конъюгированием или ферментативной реакцией. Затем неочищенный препарат мРНК сначала очищают колоночной хроматографией в проточном режиме со связыванием примесей со смолой, тогда как мРНК протекает через смолу. Этот элюат собирают для следующей стадии аффинной хроматографии с удалением аналогичных примесей. Элюат из аффинной колонки концентрируют и подвергают диафильтрации с использованием модулей с полыми волокнами и далее стерилизуют посредством мембранных фильтров. Данный продукт используется для комплексирования с наноносителями.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к частицам наноэмульсии липидов (также именуемым наноносителями) и способу ее получения в жидкости. Указанные наноносители имеют свойства адсорбирования одноцепочечных молекул мРНК на их поверхности и обеспечения доставки указанных молекул мРНК через клеточные мембраны в клетки.

В особенно предпочтительном воплощении указанные наноносители содержат по меньшей мере одно катионное или поликатионное липидное соединение, предпочтительно, как определено в данном документе, где указанное катионное или поликатионное соединение присутствует в комплексе с другими компонентами, образуя стабильные частицы наноэмульсии липидов или наноносители. Указанные наноносители по изобретению предпочтительно содержат катионное или поликатионное липидное соединение, предпочтительно DOTAP (1,2-диолеил-3-триметиламмоний-пропан), DDA (диметилдиооктадециламмоний) или аналогичные катионные/поликатионные липиды.

В предпочтительном воплощении термин «наноноситель(ли)» типично относится к композиции частиц наноэмульсии липидов [здесь также цитируются как GNP или их производные], содержащей катионное или поликатионное соединение и другие компоненты, которые поддерживают образование и стабильность таких комплексов. GNP в данной области также известны как катионные наноэмульсии (CNE) или катионные наноэмульсии липидов (CLNE).

В предпочтительном воплощении указанные наноносители имеют средний размер предпочтительно в интервале от 30 до 300 нм, более предпочтительно от 50 до 200 нм. В особенно предпочтительном воплощении средний размер

наночастиц, содержащих или состоящих из комплексированной РНК, составляет от 50 до 100 нм.

В предпочтительном воплощении указанные наночастицы с адсорбированной на них РНК или без нее имеют показатель полидисперсности [PDI], связанный с их размером, в интервале от 0,150 до 0,300, более предпочтительно – от 0,170 до 0,230.

В предпочтительном воплощении указанные наночастицы, содержащие или состоящие из катионного или поликатионного соединения, имеют значение дзета-потенциала в интервале от -10 до -50 мВ, более предпочтительно – от -25 до -35 мВ.

В предпочтительном воплощении указанные наночастицы остаются стабильными в подходящем растворителе. Предпочтительно растворитель, который обеспечивает растворение указанной РНК, и другие компоненты, такие как буферизующие агенты и т.д., являются такими, как определено в данном документе. Более предпочтительно данный растворитель является летучим с температурой кипения предпочтительно ниже 120°C. Кроме того, растворитель предпочтительно является нетоксичным. Предпочтительно данный растворитель представляет собой водный раствор. В случае органического растворителя данный растворитель предпочтительно является смешиваемым с водой. Предложенный растворитель может содержать буфер, предпочтительно выбранный из буфера, как определено в данном документе.

В предпочтительном воплощении указанные предложенные наночастицы могут дополнительно содержать по меньшей мере один компонент, выбранный, например, из иммуностимуляторов, соединений металлов или ионов металлов, поверхностно-активных веществ, полимеров или комплексообразующих агентов, буферов и т.д. или их комбинации.

В предпочтительном воплощении указанные предложенные наночастицы могут дополнительно содержать дополнительный компонент, выбранный из группы поверхностно-активных веществ. Такая группа может содержать, без ограничения, любое поверхностно-активное вещество, подходящее для получения фармацевтической композиции, предпочтительно полисорбат, сорбитан и т.д., но не ограничиваясь ими.

В предпочтительном воплощении указанные предложенные наночастицы могут дополнительно содержать дополнительный компонент, выбранный из группы неспецифических иммуностимуляторов. Такая группа может содержать, без ограничения, любые неспецифические иммуностимуляторы, подходящие для

получения фармацевтической композиции, предпочтительно сквален или любые другие аналогичные соединения, но не ограничиваясь ими.

В предпочтительном воплощении указанные предложенные наноносители могут дополнительно содержать другой компонент, выбранный из группы специфичных иммуностимуляторов. Такая группа может содержать, без ограничения, любые специфичные иммуностимуляторы, подходящие для получения фармацевтической композиции, предпочтительно монофосфориллипид-А [MPL] или глюкопиранозиллипид-А [GLA], или любые другие аналогичные адъювантные соединения.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к жидкой композиции, содержащей мРНК, адсорбированную на частицах наноэмульсии липидов или наноносителях, как описано в данном документе ниже, и указанная композиция содержит указанную мРНК в концентрации предпочтительно от 0,1 до 1 мг/мл.

В предпочтительном воплощении указанная РНК или мРНК, содержащаяся в жидкой композиции, по меньшей мере частично комплексирована с катионным или поликатионным липидом, содержащимся в указанных наноносителях. Частично означает то, что только часть по меньшей мере одной молекулы РНК комплексирована с катионным или поликатионным соединением, и что оставшая по меньшей мере одна молекула РНК находится в некомплексированной («свободной») форме. Предпочтительно отношение комплексированной РНК к свободной РНК составляет от 25:1 (масс./масс.) до 50:1 (масс./масс.), более предпочтительно составляет примерно 50:1 (масс./масс.).

В предпочтительном воплощении относительная целостность предпочтительно определяется как процентная доля полноразмерной РНК (т.е. недеградировавшей РНК) по отношению к общему количеству РНК (т.е. полноразмерная РНК и фрагменты деградировавшей РНК (которые проявляются в виде мазков на гель-электрофорезных изображениях), предпочтительно после вычитания фонового шума, например, посредством применения денситометрии на основе программного обеспечения. Предпочтительно относительная целостность указанной РНК в жидкой композиции способа по изобретению составляет 80% и, более предпочтительно, по меньшей мере 90% после хранения при температуре замораживания в течение предпочтительно по меньшей мере шести месяцев.

В предпочтительном воплощении биологическая активность указанной РНК жидкой композиции после хранения при комнатной температуре,

предпочтительно, как определено выше в отношении относительной целостности указанной РНК, предпочтительно составляет по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 90% биологической активности свежеприготовленной РНК. Биологическую активность предпочтительно определяют анализом количеств белка, экспрессируемых от воссозданной РНК и от свежеприготовленной РНК, соответственно; например, после трансфекции в линию клеток млекопитающего или в субъекта. В качестве альтернативы, биологическая активность может определяться измерением индукции (адаптивного или врожденного) иммунного ответа у субъекта.

Кроме того, согласно раскрытому изобретению предложено применение способа и продуктов по изобретению в изготовлении фармацевтического препарата или вакцины. Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, которая содержит или состоит из жидкой композиции, получаемой способом по изобретению. В предпочтительном воплощении фармацевтическая композиция по изобретению содержит по меньшей мере один дополнительный фармацевтически приемлемый ингредиент, такой как фармацевтически приемлемый носитель и/или наполнитель. Фармацевтическая композиция по изобретению возможно может быть дополнена другими компонентами, как определено выше в отношении жидкой композиции. Фармацевтическую композицию по изобретению получают как целое способом по изобретению.

Предпочтительно фармацевтическая композиция по изобретению может вводиться парентеральной инъекцией, более предпочтительно подкожной, внутривенной, внутримышечной инъекцией. Стерильные инъекционные формы фармацевтических композиций по изобретению могут представлять собой водную или масляную суспензию. Данные суспензии могут быть приготовлены согласно методикам, известным в данной области, с использованием подходящих диспергирующих агентов или увлажнителей и суспендирующих агентов. Данный стерильный инъекционный препарат также может представлять собой стерильный инъекционный раствор или суспензию в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе. Данные масляные растворы или суспензии также могут содержать разбавитель или диспергирующий агент на основе длинноцепочечного спирта, как, например, карбоксиметилцеллюлозу или аналогичные диспергирующие агенты, которые обычно используются в композиции фармацевтически приемлемых лекарственных форм, включающей

эмульсии и суспензии. Для целей композиции по изобретению также могут быть использованы другие обычно используемые поверхностно-активные вещества, такие как разновидности Tween, Span и другие эмульгаторы или усилители биодоступности, которые обычно используются в изготовлении фармацевтически приемлемых форм.

Фармацевтическая композиция по изобретению типично содержит «безопасное и эффективное количество» соединений фармацевтической композиции по изобретению, как определено выше, в частности, по меньшей мере одну РНК в том виде, в котором она содержится в указанной композиции, получаемую способом по изобретению. Термин «безопасное и эффективное количество» в том виде, как он используется в данном документе, означает количество по меньшей мере одной РНК, которое достаточно для того, чтобы значимо индуцировать положительную модификацию заболевания или расстройства, как определено в данном документе. В то же самое время, однако, «безопасное и эффективное количество» является достаточно малым для того, чтобы избежать серьезных побочных эффектов, то есть, для обеспечения ощутимой связи между преимуществом и риском. Фармацевтическую композицию по изобретению можно использовать для медицинских целей у человека, а также для ветеринарных медицинских целей, предпочтительно для медицинских целей у человека, в виде в общем фармацевтической композиции или в виде вакцины.

Согласно конкретному воплощению данная фармацевтическая композиция содержит адъювант. В данном контексте адъювант можно понимать как любое соединение, которое подходит для инициации или увеличения иммунного ответа врожденной иммунной системы, т.е. неспецифического иммунного ответа. Другими словами, при введении, вакцина по изобретению преимущественно индуцирует врожденный иммунный ответ из-за возможно содержащегося в ней адъюванта. Предпочтительно такой адъювант может быть выбран из адъюванта, известного специалисту и подходящего для настоящего случая, т.е. поддерживающего индукцию врожденного иммунного ответа у млекопитающего. В данном контексте данный адъювант предпочтительно выбран из соединений, которые известны как иммуностимулирующие из-за их аффинности связывания (в качестве лигандов) с человеческим toll-подобным рецептором-4 [TLR₄], подобным GLA [адъювант на основе глюкопиранозиллипида] или MPL [адъювант на основе глюкопиранозиллипида].

Согласно настоящему изобретению, кроме того, предложено несколько приложений и применений композиции, получаемой раскрытым способом,

фармацевтической композиции по изобретению, вакцины по изобретению или набора по изобретению, или набора частей.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг., показанные далее, являются лишь иллюстративными и будут описывать настоящее изобретение дополнительным способом. Данные Фиг. не следует истолковывать как ограничивающие настоящее изобретение ими.

На **ФИГ. 1** показана общая структура плазмид pVEE [которые основаны на плазмиде pMB₁] с самореплицируемыми экспрессионными кассетами мРНК для разных антигенов, как раскрыто в раскрытом изобретении.

ФИГ. 2: SEQ ID NO: 1 представляет собой последовательность белка, соответствующую варианту В.1 белка шипа SARS-CoV-2 с мутацией D614G.

ФИГ. 2-1: SEQ ID NO: 2 представляет собой последовательность белка, соответствующую варианту Wuhan-Hu-1 белка шипа SARS-CoV-2 [*№ доступа GISAID (Глобальная инициатива по обмену всеми данными о гриппе): EPI_ISL_402125 Название вируса: hCoV-19/Wuhan/Hu-1/2019 Дата сбора: 31 декабря 2019 г.*].

На **ФИГ. 3** показано качество мРНК во время процесса IVT. [A] демонстрирует разные стадии IVT, стадия IVT-A: полоса 2 [2 ч инкубации], 3 [3 ч] и 4 [4 ч]; стадия IVT-B: полоса 5 и стадия IVT-C: полоса 6. [B] демонстрирует разные стадии очистки мРНК, полоса 2 – неочищенный препарат мРНК от IVT-C, тогда как полоса 10 представляет собой полученный в итоге ретентат. [C] демонстрирует конечное лекарственное вещество, полученное из ретентата, полоса 2. Маркер молекулярной массы является одинаковым во всех гелях, имеющим первую полосу 9 т.п.н., шестую полосу 3 т.п.н. и 10-ую полосу 0,5 т.п.н. одноцепочечной РНК.

На **ФИГ. 3-1** показан хроматографический профиль образца партии очищенной мРНК, как описано в Примере 3.

На **ФИГ. 4** показан профиль ГФ-ВЭЖХ (гель-фильтрация-высокоэффективная жидкостная хроматография) очищенной конструкции мРНК белка шипа SAR-CoV-2 размером примерно 12 т.п.н., имеющей время удерживания [RT] примерно 8,15 минут.

На **ФИГ. 5** показана относительная целостность мРНК после адсорбции на частицах наноземлюлинии липидов или наноносителях разных типов. [A] демонстрирует адсорбцию молекул мРНК на наноносителях, показывая

отсутствие движения указанных молекул мРНК в электрическом поле. [В] демонстрирует защиту от РНКаз молекул мРНК, связанных с разными наночастицами. Связанные молекулы мРНК остаются интактными даже после обработки РНКазой.

На **ФИГ. 5-1** показан профиль экспрессии голой мРНК и мРНК, адсорбированной или комплексированной на наночастице в клетках HEK 293T *in vitro*.

На **ФИГ. 6** показан иммунный ответ, генерированный вакцинными композициями, содержащими молекулы мРНК и наночастицы способа по изобретению, раскрытого в данной документе. Самореплицируемые конструкции мРНК, продуцирующие белок шипа SARS-CoV-2, давали надежные ответы IgG при адсорбции на наночастицах, а именно GNP, GNP-M или GNP-G и инъекции мышам.

На **ФИГ. 7** показан ответ нейтрализующих антител, генерированный вакцинными композициями, содержащими молекулы мРНК и наночастицы способа по изобретению, раскрытого в данном документе. Самореплицируемые конструкции мРНК, продуцирующие белок шипа SARS-CoV-2, продуцировали надежные нейтрализующие вирус антитела при адсорбции на наночастицах, а именно GNP, GNP-M или GNP-G и инъекции мышам.

ПРИМЕРЫ

Показанные ниже примеры являются иллюстративными, дополнительно описывающими настоящее изобретение, и их не следует истолковывать как ограничивающие его.

ПРИМЕР 1: ПЛАЗМИДЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ мРНК

Плазмиды, способные продуцировать молекулы мРНК, которые при доставке в клетки экспрессируют желательные белки, подобные антигенам белка шипа коронавируса, антигенам белка вируса опоясывающего лишая, антигенам малярийного протиста и т.д., получали стандартными методиками молекулярной биологии. Данные плазмиды содержали неструктурные белки (от NSP1 до NSP4) вируса венесуэльского лошадиного энцефалита (VEEV) рядом с кодирующими последовательностями желательных белковых антигенов или интересующих генов. Продукты гена NSP помогают саморепликации молекул мРНК внутри клеток-хозяев. Например, при нахождении ниже последовательностей NSP

последовательность, кодирующая белок шипа SARS CoV-2, транскрибируется одновременно во время саморепликации и затем транслирует белковые антигены вирусного шипа в клетке-хозяине. Помимо репликации и длительной экспрессии белка шипа генерируются долговременные бустерные иммунные ответы. Все плазмиды согласно установившейся практике поддерживали в клетках *E. coli* с использованием стандартных протоколов. Репрезентативная иллюстрация показана на ФИГ. 1, которая демонстрирует структурные элементы плазмид рVEE, содержащих разные интересующие гены, подобные мутанту D614G варианта B.1 гена белка шипа SARS-CoV-2, как показано на ФИГ. 2, среди других вариантов релевантных интересующих генов белков шипа или антигена из других вирусов и организмов. Разные мутанты или варианты белка шипа SARS-CoV-2, которые можно использовать с соответствующей последовательностью оснований белка шипа варианта Wuhan-Hu-1 [см. ФИГ. 2-1], показаны в ТАБЛИЦЕ 1. Вектор рVEE основан на плазмиде рMB1, известной в данной области. Данный вектор содержит промоторный элемент полимеразы T7, элемент в виде 5'-UTR, ORF (открытая рамка считывания) для самореплицируемых неструктурных белков (NSP1-4), сигнальную последовательность, интересующий ген, подобный белку шипа, элемент в виде 3'-UTR, с последующим элементом в виде хвоста поли А, расположенными последовательно, наряду с базовыми элементами плазмиды рMB1 и маркером резистентности к канамицину.

ТАБЛИЦА 1:

| ВАРИАНТЫ | В.1 | В.1.351 | Р.1 | В.1.1.7 | В.1.617 | В.1.618 | В.1.617.2 | АУ.2 | АУ.1 | ВА.1 | ВА.2 | ВА.2.12.1 | ВА.4 | ВА.5 |
|----------|-------|---|---|---|---|--|--|---|---|--|--|--|--|--|
| | D614G | D80A D215G E484K N501Y D614G A701V | L18R T20N P26S D138Y R190S K417N E484K N501Y D614G H655Y T1027I | 69Hdel 70Vdel N501Y A570D D614G P681H T716I S982A D118H | T95I G142D E154K V382L I452R E484Q D614G E484Q E484Q P681R Q1071H E1072K K1073R H1101D D1153Y | H49Y Y145del H146del E484K D614G | T10R G142D E156G F157del R158del A222V L452R T478K D614G P681R D950N | T19R V70F G142D E156G F157del R158del A222V K417N L452R T478K D614G P681R D950N | T19R 195I G142D E156G F157del R158del W258L K417N L452R T478K D614G P681R D950N | A67V H69del V70del T95I G142D Y143del Y144del Y145del N21del L21I Betavaka 214EPE G339D S371L S373P S375F K417N N440K S477N G446S S477N T478K E484A Q493R Q498R N501Y Y505H Q498R N501Y Y505H T547K D614G H655Y N501Y Y505H T547K D614G H655Y N679K P681H N764K D796Y D796Y N856K Q954H N969K L681F | T19I L24del P25del P26del L452R A27S A27S G142D H69del V70del G142D G142D V213G V213G G339D S371F S373P S375F T376A D405N R408S K417N N440K R408S D405N K417N K417N K417N N440K L452R S477N T478K E484A Q493R Q498R N501Y Y505H D614G H655Y N679K P681H N764K D796Y D796Y N969K L681F | T19I L24del P25del P26del L452R A27S A27S G142D H69del V70del G142D G142D V213G V213G G339D S371F S373P S375F T376A D405N R408S K417N N440K R408S D405N K417N K417N K417N N440K L452R S477N T478K E484A Q493R Q498R N501Y Y505H D614G H655Y N679K P681H N764K D796Y D796Y N969K L681F | T19I L24del P25del P26del L452R A27S A27S G142D H69del V70del G142D G142D V213G V213G G339D S371F S373P S375F T376A D405N R408S K417N N440K R408S D405N K417N K417N K417N N440K L452R S477N T478K E484A Q493R Q498R N501Y Y505H D614G H655Y N679K P681H N764K D796Y D796Y N969K L681F | T19I L24del P25del P26del L452R A27S A27S G142D H69del V70del G142D G142D V213G V213G G339D S371F S373P S375F T376A D405N R408S K417N N440K R408S D405N K417N K417N K417N N440K L452R S477N T478K E484A Q493R Q498R N501Y Y505H D614G H655Y N679K P681H N764K D796Y D796Y N969K L681F |

**АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ, ВСТАВКИ И/ИЛИ
ДЕЛЕЦИИ В БЕЛКЕ ШИПА SARS-CoV-2**

ПРИМЕР 2: ПОЛУЧЕНИЕ мРНК

Протокол транскрипции *in vitro* [IVT] использовали для получения молекул мРНК от ДНК-матрицы, полученной от плазмиды, описанной в Примере 1. Для размера партии примерно 1200 мл для получения мРНК варианта D614G белка шипа SARS-CoV-2 [все приведенные ниже Примеры, связанные с данной молекулой мРНК] получение делили на три части. В первой части примерно 14 мл высокочистой воды отбирали в 50 мл контейнер, ее буферизовали 1,5 мл 1 М раствора Tris-HCl, pH 8,0. В данную реакционную массу добавляли примерно 0,975 мл 1 М раствора MgCl₂, примерно 10,5 мл 25 мМ рНТФ, каждого в растворе, и примерно 0,375 мл 1 М раствора дитиотрейтола. Кроме того, в указанную реакционную массу добавляли примерно 1,5 мл 50 мМ раствора спермидина, примерно 7,5 мл 250 нг/мкл раствора ДНК-матрицы и примерно 0,75 мл 1 мкг/мл раствора неорганического пирофосфата. После этого следовало добавление примерно 0,21 мл 1,5 мкг/мкл раствора ингибитора РНКаз и примерно 0,28 мл 2 мкг/мкл раствора полимеразы T7. Образовавшуюся реакционную массу примерно 38 мл легко перемешивали и инкубировали при примерно 32°C на шейкере при примерно 100 об./мин в течение примерно 4 часов. Эта часть обеспечивала надежный синтез мРНК от ДНК-матрицы [см. ФИГ. 3А, полосы 2-4, полоса 1 представляет собой лестницу РНК-маркеров молекулярной массы – первая полоса соответствует размеру 9 т.п.н., а последняя – 0,5 т.п.н. – которые являются одинаковыми во всех экспериментах]. Во второй части в конце времени реакции указанные 38 мл реакционной массы переносили в 500 мл колбу, в которую добавляли примерно 350 мл высокочистой воды. Данную реакционную массу дополнительно дополняли примерно 0,2 мл 1 М раствора CaCl₂ и примерно 0,05 мл 2,5 мкг/мкл раствора ДНКазы. Образующуюся реакционную массу примерно 390 мл легко перемешивали и инкубировали при примерно 32°C на шейкере при примерно 100 об./мин в течение примерно 30 минут. В этой части полностью удаляется ДНК-матрица, использованная в первой части [см. ФИГ. 3А, полосы 5]. В третьей части в конце времени реакции указанные 390 мл реакционной массы переносили в 2000 мл колбу, в которую добавляли примерно 730 мл высокочистой воды. Данную реакционную массу дополнительно дополняли примерно 58 мл 1 М раствора буфера Tris-HCl, pH 8,0, примерно 0,225 мл 1 М раствора MgCl₂, примерно 2,5 мл 1 М раствора KCl, примерно 12 мл 100 мМ раствора ГТФ и примерно 7,5 мл 32 мМ раствора S-аденозилметионина и примерно 0,8 мл 1 М раствора дитиотрейтола. Помимо этого добавляли примерно 0,2 мл 1,5 мкг/мкл раствора ингибитора РНКаз и примерно 0,75 мл 2 мкг/мкл

раствора гуанилтрансферазы. Образующуюся реакцию массу из примерно 1200 мл легко перемешивали и инкубировали при примерно 32°C на шейкере при примерно 100 об./мин в течение примерно 2 часов [см. ФИГ. 3А, полосы 6]. Данный способ давал примерно 150 мкг/мл мРНК, транскрибированной *in vitro*, в пределах периода примерно 7 часов. В данном документе синтез мРНК проводили в стерильных условиях без нуклеаз в условиях чистого воздуха. На ФИГ. 3А показано качество мРНК, продуцированной, как описано выше в разных частях.

ПРИМЕР 3: ОЧИСТКА мРНК

Реакционную массу Примера 2, содержащую молекулы мРНК, подвергали очистке мРНК посредством способов хроматографии и фильтрования. В данном документе указанную массу примерно 1200 мл дополняли маточными растворами Tris-HCl и KCl с достижением конечных концентраций 10 mM Tris-HCl и 250 mM KCl при pH 8,0. Первую хроматографическую стадию использовали в проточном режиме, при котором примеси связываются с колонкой, тогда как молекулы мРНК собирают в растворе элюата. В данном документе указанный разведенный раствор подвергали разделению на предварительно уравновешенной колонке, имеющей сильно шитую агарозную смолу на основе октиламина [CaptoCore 700 – Cytiva] или аналогичную смолу матрицы, и отбирали фракции элюата, которые содержали указанные молекулы мРНК [см. ФИГ. 3В, полоса 2 – перед первой стадией, полоса 3 – после первой стадии; см. ФИГ. 3-1, хроматограмма А]. Вторую хроматографическую стадию использовали в аффинном режиме, при котором молекулы мРНК связываются с колонкой, тогда как примеси выходят с фракциями элюата. Здесь указанную массу первой стадии примерно 1000 мл дополняли маточными растворами Tris-HCl, NaCl и EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) с достижением конечных концентраций 10 mM Tris-HCl, 0,8 M NaCl и 1 mM EDTA при pH 8,0. Затем подвергали разделению на предварительно уравновешенной колонке, имеющей аффинную смолу шитого поли(стирол-дивинилбензола) на основе олиго(dT)₂₅ [POROS – ThermoFisher] или аналогичную матрицу аффинной смолы, и после завершения связывания молекул мРНК промывали промывочным буфером, содержащим 10 mM цитрат натрия и 0,8 M NaCl при pH 6,5, и фракции элюата отбрасывали [см. ФИГ. 3В, полосы 4-7]. Затем элюировали связавшиеся молекулы мРНК с использованием элюционного буфера, содержащего 1 mM цитрата натрия при pH 6,5 [см. ФИГ. 3В, полоса 8; см. ФИГ. 3-1, хроматограмма В]. Данная стадия давала примерно 800

мл элюата, содержащего молекулы очищенной мРНК. На третьей стадии использовали систему диафильтрации с мембраной из полых волокон с порогом отсекающей молекулярной массы 30 кДа для концентрирования указанного элюата до конечного ретентата, именуемого лекарственное вещество РНК, из примерно 500 мл, содержащего примерно 200 мкг/мл указанной мРНК [см. ФИГ. 3В, полоса 10]. Кроме того, указанное лекарственное вещество стерилизовали на фильтре с использованием фильтрационной системы с 0,2 мкм мембраной и хранили при -80°C до применения [см. ФИГ. 3С, полоса 2]. Кроме того, проводили анализ гелефильтрацией на основе ВЭЖХ на указанном лекарственном веществе с использованием стандартных способов, причем указанное лекарственное вещество имеет время удерживания примерно 8,15 минут и демонстрировало молекулярную чистоту больше, чем 95% [см. ФИГ. 4]. Лекарственное вещество РНК в стандартном порядке разбавляли или концентрировали с достижением концентрации мРНК от 0,1 до 1,5 мг/мл и хранили при -80°C до дальнейшего применения.

ПРИМЕР 4: ПОЛУЧЕНИЕ ЧАСТИЦ НАНОЭМУЛЬСИИ ЛИПИДОВ/НАНОНОСИТЕЛЕЙ

Получение наноносителей или GNP достигалось в способе из трех частей. В первой части получали масляную фазу с использованием всех гидрофобных веществ, которые образуют часть указанного носителя. В данном документе для получения примерно 4 мл указанной масляной фазы примерно 3 г DOTAP, примерно 3,7 г сорбитана моностеарата [SPAN-60] и примерно 3,75 г сквалена смешивали в стеклянном контейнере. Указанную смесь нагревали примерно до 65°C, пока все компоненты не становились хорошо перемешанными в гомогенной консистенции. Во второй части примерно 3,7 г полисорбата-80 смешивали с примерно 96 мл буферизованного раствора 10 мМ цитрата натрия, рН 6,0, который поддерживали нагретым при 65°C. В третьей части и масляную, и водную части смешивали под миксером с высоким срезывающим усилием, работающим при примерно 5000 об./мин, в течение примерно 15 минут. Затем данную смесь примерно 10 раз пропускали через гомогенизатор, работающий при высоком давлении примерно 206,7 МПа, и заправляли остающейся водной фазой, получая примерно 100 мл раствора наноносителя. Указанный раствор наноносителя возможно содержал иммуностимулирующие вещества, подобные MPL или GLA, в количестве примерно 0,5 мкг/мл, когда это желательно.

Наноноситель GNP не содержал MPL или GLA, тогда как GNP-M содержал адъювант MPL, а GNP-G содержал адъювант GLA [см. ТАБЛИЦУ 2].

ПРИМЕР 5: ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ НАНОНОСИТЕЛЕЙ И МОЛЕКУЛ мРНК

Адсорбцию молекул мРНК на указанный наноноситель проводили в очень тщательном и точном способе смешивания указанного раствора мРНК в указанном растворе наноносителя с образованием стабильных комплексов. В данном документе отношение азота [присутствующего на молекулах DOTAP] к фосфату [присутствующему на молекулах РНК; отношение N:P] принимали в качестве меры ассоциации указанных молекул мРНК с указанными частицами наноносителя, так как молекулы мРНК являются отрицательно заряженными, тогда как молекулы DOTAP заряжены положительно, это приводит к адсорбции указанных молекул мРНК на указанных наноносителях. Для достижения стабильных комплексов молекул мРНК с наноносителями опробовали разное отношение N:P от 1 до 150 количеств DOTAP к РНК, поддерживая постоянное количество РНК. Это приводит к тому, что отношения N:P от 5 до 15 являются идеальными для получения стабильных комплексов мРНК, адсорбированной на указанных наноносителях. Следовательно, для получения указанных комплексов указанный раствор наноносителя Примера 4 разбавляют до примерно 6 мг/мл DOTAP с использованием 10 мМ раствора цитрата натрия, pH 6,0. Затем примерно 50 мл данного разбавленного раствора наноносителя отбирали в 1000 мл контейнер и помещали на орбитальный шейкер при скорости вращения от 70 до 120 об./мин. Затем добавляли примерно 50 мл раствора мРНК [лекарственное вещество РНК] в том виде, в котором он был получен в Примере 3, с замедлением с использованием шприцевого насоса примерно за 5 минут при условиях постоянного перемешивания при температуре примерно 2-8°C. Затем давали данной смеси образовать комплексы при 2-8°C в течение примерно 30 минут, дополнительно разводили 1:1 20 мМ цитратом натрия, pH 6,0, содержащим примерно 540 мг/мл сахарозы, и затем указанный раствор комплекса фильтровали через 0,45 мкм и 0,22 мкм мембранные фильтры с получением стерильного вакцинного раствора. Для определения количества молекул РНК, адсорбированных на частицах наноносителя, и изменения свойств указанного наноносителя измеряли средние размеры частиц и параметры распределения размера частиц посредством динамического рассеяния света на системе Zetasizer Nano [Malvern Panalytical]. В ТАБЛИЦЕ 2 предложены изменения,

наблюдаемые в указанных параметрах наночастиц при адсорбции молекул РНК.

ТАБЛИЦА 2:

| SN | ПАРАМЕТР | GNP | GNP-M | GNP-G | GNP + мРНК | GNP-M + мРНК | GNP-G + мРНК |
|----|------------------------------|-------|-------|-------|---------------|-----------------|-----------------|
| 1 | Размер частиц [нм] | 51,00 | 40,71 | 50,50 | 63,34 | 56,98 | 72,28 |
| 2 | PDI | 0,271 | 0,196 | 0,184 | 0,224 | 0,207 | 0,180 |
| 3 | Дзета-потенциал [мВ] | 34,8 | 28,3 | 33,2 | 11,1 | 11,4 | 10,5 |
| 4 | Содержание РНК [мкг/мл] | - | - | - | 40,70 | 44,80 | 40,40 |
| 5 | Эффективность связывания [%] | - | - | - | 98,30 | 98,10 | 89,90 |

ПРИМЕР 6: ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦЕЛОСТНОСТИ РНК, АДСОРБИРОВАННОЙ НА НАНОНОСИТЕЛЯХ

Целостность молекул мРНК как таковых или после выделения из наночастиц определяли посредством денатурирующего гель-электрофореза на агарозе с формальдегидом с использованием известных в данной области способов. Вкратце, образцы мРНК готовили в буфере MOPS с формальдегидом, бромистым этидием и отслеживающим красителем, подобным метиленовому синему, посредством нагревания указанной смеси при примерно 70°C в течение примерно 30 минут. Затем данные образцы разделяли на 1%-ных агарозных гелях до завершения желательного прогона образцов в геле, визуализировали при освещении УФ (ультрафиолетовое излучение), и изображения сохраняли для записи. Для выделения молекул мРНК из наночастицы указанные комплексы подвергали экстракции фенолом-хлороформом. Результаты показаны на ФИГ. 5А, на которой прогоны голый контрольной мРНК на геле соответствуют размеру примерно 12 т.п.н. [полоса 3], тогда как РНК, комплексированная с наночастицами, остается в загрузочных лунках [полосы 5 – GNP, 8 – GNP-M и 11 – GNP-G], тогда как выделенные из наночастиц молекулы мРНК также демонстрируют подвижность, соответствующую примерно 12 т.п.н. [полосы 6 – GNP, 9 – GNP-M и 12 – GNP-G], без какой-либо деградации ее целостности, подтверждая целостность молекул мРНК в ассоциации с наночастицами.

Целостность данной мРНК дополнительно анализировали с использованием анализов защиты от РНКаз. Вкратце, образцы мРНК с наночастицами или без них подвергали обработке РНКазой и анализировали посредством гель-электрофореза на агарозе с формальдегидом. Как показано на ФИГ. 5Б, голая мРНК, обработанная РНКазой, демонстрировала полную деградацию – полоса 3 – по сравнению с необработанной мРНК в полосе 2 контроля. В случае мРНК, комплексированной с GNP, указанные наночастицы защищали молекулы мРНК, полоса 4 представляет собой GNP без обработки, и полоса 5 представляет собой GNP, обработанную РНКазой, в обоих случаях РНК остается присоединенной к частицам GNP и остается в загрузочных лунках, демонстрируя защиту мРНК в комплексе с наночастицей. мРНК, выделенная из частиц GNP, обработанных РНКазой [см. полосы 7, 11 и 15], и необработанных частиц GNP [см. полосы 6, 10 и 14], демонстрировала размер полос, немного больше полосы маркера 9 т.п.н., указывая на то, что указанная мРНК является интактной без потери целостности даже после обработки РНКазой указанного комплекса.

ПРИМЕР 7: КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ИЗМЕРЕНИЕ РНК

Количество мРНК определяли в разных образцах посредством ультрачувствительного набора для анализа РНК Qunati-IT RiboGreen [ThermoFisher-Invitrogen] согласно протоколу изготовителей. Вкратце, при связывании со свободными молекулами мРНК реактив RiboGreen имеет максимумы поглощения и испускания при 500 нм и 525 нм соответственно. Чувствительность выявления данного способа составляет от 1 до 200 нг/мл РНК в растворе. Кроме того, с использованием данного способа также может быть легко выявлена выделенная РНК, ассоциированная с частицами липидного наночастицы.

ПРИМЕР 7А: ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА В КЛЕТКАХ НЕК ПОСРЕДСТВОМ РНК, АДСОРБИРОВАННОЙ НА НАНОЧАСТИЦАХ

Для определения эффективности мРНК, адсорбированных или комплексированных на носителе GNP, проводили анализ экспрессии белка *in vitro* в клетках НЕК 293Т. Как показано на ФИГ. 5-1, анализ вестерн-блоттингом рекомбинантного белка шипа использовали в качестве стандартного контроля [полоса 2], тогда как лизат необработанных клеток использовали в качестве негативного контроля [полоса 3]. Голую мРНК переносили в клетки с использованием реактива липофектамин [полоса 4], тогда как мРНК,

адсорбированную или комплексированную на носителе GNP, добавляли в культуру клеток и инкубировали, как раскрыто [полоса 5]. Наблюдала надежную экспрессию белка шипа при трансфекции мРНК, и инкубированные образцы комплексированной были видны как полосы с подвижностью, соответствующей 170 кДа. Здесь клетки НЕК 293Т культивировали в течение примерно 24 часов в 1 мл DMEM (среда Игла, модифицированная по Дульбекко) с FBS (фетальная телячья сыворотка) в планшетах для культуры клеток и затем обрабатывали, как раскрыто, и инкубировали при 37°C в присутствии 5% CO₂ в течение примерно 48 часов. После инкубации супернатант от монослоя клеток отбрасывали, и прикрепленные клетки лизировали с использованием 200 мкл лизирующего буфера. Лизированный раствор подвергали вестерн-блоттингу с использованием антитела против шипа SARS-CoV-2 (COVID-19) для выявления экспрессированного белка шипа. Проводили сэндвич-вариант ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ) с антителами против шипа SARS-CoV-2 (COVID-19) для оценки экспрессированного белка шипа в клеточном лизате.

ПРИМЕР 8: ИССЛЕДОВАНИЯ ИММУНОГЕННОСТИ

Вакцинный раствор, полученный в Примере 5, подвергали исследованиям иммуногенности для определения свойств продуцирования иммуногена молекул мРНК, адсорбированных на указанных наноносителях. Здесь указанный вакцинный раствор или контрольные растворы инъецировали популяциям мышей C57BL/6 или BALB/c. Использовали примерно шесть мышей на группу, как показано на ФИГ. 6. Первой контрольной группе инъецировали простой разбавитель или только буферный раствор. Второй контрольной группе инъецировали голую мРНК, эквивалентную ее количеству, присутствующему в анализируемом вакцинном растворе, контрольным группам с наноносителем инъецировали голый наноноситель GNP или GNP-M или GNP-G, эквивалентный его количеству, присутствующему в анализируемом вакцинном растворе. Первой опытной группе инъецировали примерно 100 мкл анализируемого вакцинного раствора, содержащего примерно 5 мкг мРНК, комплексированной с GNP. Второй опытной группе инъецировали примерно 100 мкл анализируемого вакцинного раствора, содержащего примерно 5 мкг мРНК, комплексированной с GNP-M. Третьей опытной группе инъецировали примерно 100 мкл анализируемого вакцинного раствора, содержащего примерно 5 мкг мРНК, комплексированной с GNP-G. Все исследуемые группы затем анализировали на продукцию антител против белка шипа SARS-CoV-2 в сутки 14, 28 и 43 после инъекции указанных

веществ. Как показано на ФИГ. 6, группа мышей, которым инъецировали вакцинные растворы [т.е. мРНК, комплексированную с GNP, GNP-M или GNP-G], демонстрировали заметное увеличение продукции антител против белка шипа по сравнению с группой, которой инъецировали голую мРНК, тогда как другие контрольные группы не продуцировали какого-либо антитела против белка шипа. Антитела IgG в разных группах выявляли посредством стандартных протоколов с использованием анализов ELISA. Эти данные раскрывают стабильность, иммуногенность и пригодность для клинических применений указанного вакцинного раствора, в котором мРНК адсорбирована на частицах наноэмульсии липидов или наноносителях.

ПРИМЕР 9: ИССЛЕДОВАНИЯ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ

Проводили суррогатный анализ нейтрализации вируса [sVNT] SARS-CoV-2 с использованием набора sPass для выявления нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 [Genscript]. Данные анализы проводили согласно протоколу изготовителя. Вкратце, образцы разводили в 10 раз в буфере для разведения. Данные разведенные образцы, наряду с позитивными и негативными контролями, предоставленными в наборе, инкубировали с равными объемами 1000-кратной RBD (релевантная биологическая доза), конъюгированной с HRP (пероксидаза хрена), поставленной в наборе. Затем осуществляли инкубацию при 37°C в течение примерно 30 мин. Затем примерно 100 мкл всех образцов и контролей отбирали в лунки, покрытые белком ACE-2, предоставленным в наборе. Давали реакциям развиваться в темноте в течение примерно 15 мин при 37°C. Через 15 минут лунки 4 раза промывали перед добавлением 100 мкл субстрата TMB (тетраметилбензидин), предоставленного в наборе. Давали развиваться окрашиванию в течение 15 мин в темноте перед остановкой реакций 50 мкл раствора HCl, предоставленного в наборе. Считывание планшета осуществляли при 450 нм в планшет-ридере. Процентное ингибирование рассчитывается как $(1 - (\text{ОП (оптическая плотность) образца} / \text{ОП негативного контроля})) \times 100\%$. Результаты показаны на ФИГ. 7. При адсорбции мРНК на разных наноносителях, подобных GNP, GNP-M или GNP-G, было продемонстрировано заметное увеличение продукции нейтрализующих антител против белка шипа SARS-CoV-2.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Жидкая композиция РНК для введения субъекту-человеку, включающая:

- а) РНК, способную экспрессировать белок *in vivo*, адсорбированную на
- б) носителе в виде частиц наноэмульсии липидов; и
- с) образование стабильного комплекса РНК, в котором указанная РНК сохраняет свою целостность при хранении в течение длительного периода времени.

2. Композиция по п. 1, в которой концентрация указанной РНК перед образованием комплекса составляет от 0,1 до 1,5 мг/мл.

3. Композиция по п. 1, в которой указанная РНК способна экспрессировать вариант белка шипа вируса SARS-CoV-2.

4. Композиция по п. 1, в которой указанную РНК получают способом транскрипции *in vitro* до чистоты от 70 до 95%.

5. Композиция по п. 1, в которой количество указанной РНК является эффективным в получении указанного белка на уровне, который генерирует эффективный иммунный ответ у указанного субъекта.

6. Композиция по п. 1, в которой указанное количество РНК является эффективным в снижении риска развития клинических признаков инфекции, против которой нацелена указанная РНК.

7. Композиция по п. 1, в которой указанная РНК представляет собой матричную РНК, способную к саморепликации в клетках HEK 293T.

8. Композиция по п. 1, в которой указанная РНК имеет вирусные генетические элементы для самоамплификации *in vivo*.

9. Композиция по п. 1, в которой указанный носитель в виде частиц наноэмульсии содержит: жидкий липид; катионный липид; гидрофобное поверхностно-активное вещество; гидрофильное поверхностно-активное вещество и, возможно, иммуностимулирующий адъювант.

10. Композиция по п. 1, в которой указанный носитель образует эмульсию типа «масло в воде».

11. Композиция по п. 1, в которой указанный жидкий липид представляет собой сквален в концентрации от 3 до 40 мг/мл.

12. Композиция по п. 1, в которой указанный катионный липид представляет собой DOTAP (1,2-диолеоил-3-триметиламмоний-пропан) в концентрации от 3 до 30 мг/мл.

13. Композиция по п. 1, в которой указанное гидрофобное поверхностно-

активное вещество представляет собой сорбитана моностеарат в концентрации от 3 до 40 мг/мл.

14. Композиция по п. 1, в которой указанное гидрофильное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80 в концентрации от 3 до 40 мг/мл.

15. Композиция по п. 1, в которой указанный иммуностимулирующий адъювант представляет собой адъювант GLA (глюкопиранозиллипид-А) или MPL (монофосфориллипид-А).

16. Композиция по п. 1, в которой указанный носитель имеет размер частиц от 50 до 70 нм.

17. Композиция по п. 1, в которой указанный носитель имеет дзета-потенциал от 10 до 30 мВ.

18. Композиция по п. 1, в которой указанный носитель имеет показатель дисперсности частиц от 0,1 до 0,3.

19. Композиция по п. 1, в которой указанный носитель способен адсорбировать от 30 до 50 мкг мРНК на мкг указанного носителя.

20. Композиция по п. 1, в которой указанный комплекс РНК имеет размер частиц от 50 до 120 нм.

21. Композиция по п. 1, в которой указанный комплекс РНК имеет дзета-потенциал от 10 до 20 мВ.

22. Композиция по п. 1, в которой указанный комплекс РНК имеет показатель дисперсности частиц от 0,2 до 0,4.

23. Композиция по п. 1, в которой указанная РНК в комплексе с указанным носителем является устойчивой к обработке РНКазой.

T7P > 5'-UTR > NSP1 > NSP2 > NSP3 > NSP4 > SS > ИНТЕРЕСУЮЩИЙ ГЕН > 3'-UTR > ПОЛИ А

Плазмиды
pVEE
[pMB1]

| S/N | ПЛАЗМИДА | ИНТЕРЕСУЮЩИЙ ГЕН |
|-----|----------|---|
| 1 | pVEE-614 | МУТАНТ D614G [также известный как B.1] БЕЛКА ШИПА ВИРУСА SARS-COV-2 |
| 2 | pVEE-628 | МУТАНТ AY.1 БЕЛКА ШИПА ВИРУСА SARS-COV-2 |
| 3 | pVEE-627 | МУТАНТ AY.2 БЕЛКА ШИПА ВИРУСА SARS-COV-2 |
| 4 | pVEE-626 | МУТАНТ B.1.617.2 БЕЛКА ШИПА ВИРУСА SARS-COV-2 |
| 5 | pVEE-625 | МУТАНТ B.1.618 БЕЛКА ШИПА ВИРУСА SARS-COV-2 |

ФИГ. 1

SEQ ID NO: 1

ВАРИАНТ В.1 БЕЈКА ШИПА
SARS-CoV-2

10 20 30 40 50 60 70
MFVFLVLLPL VSSQCVNLTI RTQLPPAYTN SFTRGVYYPD KVFRSSVLHS TQDLFLFFFS NVTWFHAIHV

80 90 100 110 120 130 140
SGTNGTKRFD NPVLPFNDGV YFASTEKSN IIRGWIFGTTL DSKTQSLIIV NNATNVVIVK CEFQFCNDPF

150 160 170 180 190 200 210
LGVYYHKNNK SWMESEFRVY SSANNCTFEY VSQPFLMDLE GKQGNFKNLR EFVFKNIDGY FKIYSKHTPI

220 230 240 250 260 270 280
NLVRDLPOGF SALEPLVDLP IGINITRFQT LLALHRSYLT PGDSSSGWTA GAAAYVGYL QPRTFLKYN

290 300 310 320 330 340 350
ENGTITDAVD CALDPLSETK CTLKSFTVEK GIYQTSNFRV OPTESIVRFP NITNLCPFGE VFNATRFASV

360 370 380 390 400 410 420
YAWNKRISN CVADYSVLYN SASFSTFKCY GVSPTKLNLD CFTNVYADSF VIRGDEVROI APGQTGKIAD

430 440 450 460 470 480 490
YNYKLPDDFT GCVIAWNSNN LDSKVGGNYN YLYRLFRKSN LKPFERDIST EIIYQAGSTPC NGVEGNCYF

500 510 520 530 540 550 560
PLQSYGFQPT NGVGYQPIRV VVLSFELLHA PATVCGPKKS TNLVKNKCVN FNFNGLTGTG VLTESNKKFL

570 580 590 600 610 620 630
PFQQFGRDIA DTTDAVRDPO TLEILDITPC SFGGVSVITP GTNTSNQVAV LYQGVNCTEV PVAIHADQLT

640 650 660 670 680 690 700
PTWRVYSTGS NVFQTRAGCL IGAEHVNNSY ECDIPGAGI CASYQTQNS PSGAGSVASQ SIIAYTMSLG

710 720 730 740 750 760 770
AENSVAISNN SIAIPTNFTE SVTTEILPVS MTKTSVDCTM YICGDSTECN NLLQYGSFC TQLNRALTEI

780 790 800 810 820 830 840
AVEQDKNTQE VFAQVKQIYK TPPIKDFGGF NFSQILPDPS KPSKRSFIED LLENKVLAD AGFIKQYGDC

850 860 870 880 890 900 910
LGDIAARDLI CAQKFNGLTV LPPLLTDEMI AQYTSALLAG TITSGWTFGA GAALQIPFAM QMAYRENGIG

920 930 940 950 960 970 980
VTQNVLYENQ KLIANQFNSA IGKIQDSLSS TASALGKLOD VVNQNAQALN TLVKQLSSNF GAISSVLNDI

990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
LSRLDPPEAE VQIDRLITGR LQSLQTYVTO QLIRAAEIRA SANLAATKMS ECVLGQSKRV DFCGKGYHLM

1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
SFPQSAPHGV VFLHVTVVPA QEKNFTTAPA ICHDGAHFP REGVVFVSNGT HWEVTVQRNFY EPQIITDNT

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
FVSGNCDVVI GIVNNTVYDF LQPELDSFKE ELDKYFKNHT SPDVDLGDIS GINASVVNIQ KEIDRLNEVA

1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
KNLNESLIDL QELGKYEQYI KWPWYIWLGF IAGLIAIVMV TIMLCCMTSC CSCCLKGCCSC GSCCKEDED

1270
SEPVLKGVKL HVT**

ФИГ. 2

SEQ ID NO: 2

ВАРИАНТ WUHAN-HU-1 БЕЛКА ШИПА
SARS-CoV-2

```

10      20      30      40      50      60      70
MFVFLVLLPL VSSQCVNLTT RTQLPPAYTN SFTRGVYYPD KVERSSVLHS TQDLFLPFFS NVIWFHAIHV

80      90      100     110     120     130     140
SGTNGTKRFD NEVLPFNDGV YFASTEKSNI IRGWIFGTTL DSKTQSLLVV NNATNVVIVK CEFQFCNDPF

150     160     170     180     190     200     210
LGVVYHKNNK SWMESEFRVY SSANNCTFEY VSQPFLMDLE GKQGNFKNLR EFVFKNIDGY FKIYSKHTPI

220     230     240     250     260     270     280
NLVRDLPOGF SALEPLVDLP IGINITRFQT LLALHRSYLT PGDSSSGWTA GAAAYVGYL QPRTFLLYN

290     300     310     320     330     340     350
ENGTIIDAVD CALDPLSETK CTLKSFTVEK GIYQTSNERV QPTESIVRFP NITNLCPFGE VFNATRFASV

360     370     380     390     400     410     420
YAWNRKRISN CVADYSVLYN SASFSTFKCY GVSPTKLNLD CFTNVIADSF VIRGDEVRFQI APGQTGKIAD

430     440     450     460     470     480     490
YNYKLPDDIT GCVIAWNSNN LDSKVGGINN YLYRLFRRSN LKPFERDIST EIQAGSTPC NGVEGFNCYF

500     510     520     530     540     550     560
PLQSYGFQPT NGVGYQPIRV VVLSFELLHA PATVCGPKKS TNLVKNKCVN FNFNGLTGTG VLTESNKKFL

570     580     590     600     610     620     630
PFQQFGRDIA DTTDAVRDPQ TLEILDITPC SFGGVSVITP GTNTSNQVAV LYQDVNCTEV PVAIHADQLT

640     650     660     670     680     690     700
PTWRVYSTGS NVFQTRAGCL IGAEHVNNSY ECDIPIGAGI CASYQTQINS PSGAGSVASQ SIIAYTMSLG

710     720     730     740     750     760     770
AENSVAYSNN SIAIPTNETI SVTTEILPVS MTKTSVDCTM YICGDSSTEC NLLLYGGSFC TQLNRALTGI

780     790     800     810     820     830     840
AVEQDKNTQE VFAQVKQIYK TPIKDFGGF NFSQILPDPK KPSKRSFIED LLFNKVTLAD AGFIKQYGDC

850     860     870     880     890     900     910
LGDIAARDLI CAQKFNGLTV LPPLLEDEMI AQYTSALLAG TITSGWTFGA GAALQIPFAM QMAYRFNGIG

920     930     940     950     960     970     980
VTQNVLYENQ KLIANQFNSA IGKIQDSLSS TASALGKIQD VVNQNAQALN TLVKQLSSNE GAISSVLNDI

990     1000    1010    1020    1030    1040    1050
LSRLDPEAEV QVIDRLITGR LQSLQTYVTQ QLIRAAEIRA SANLAATKMS ECVLGQSKRV DFCGKGYHIM

1060    1070    1080    1090    1100    1110    1120
SFPQSAPHGV VFLHVTVVPA QEKNFTTAPA ICHDGKAHFP REGVTVSNGT HWFVTQRNFY EPQIITDNT

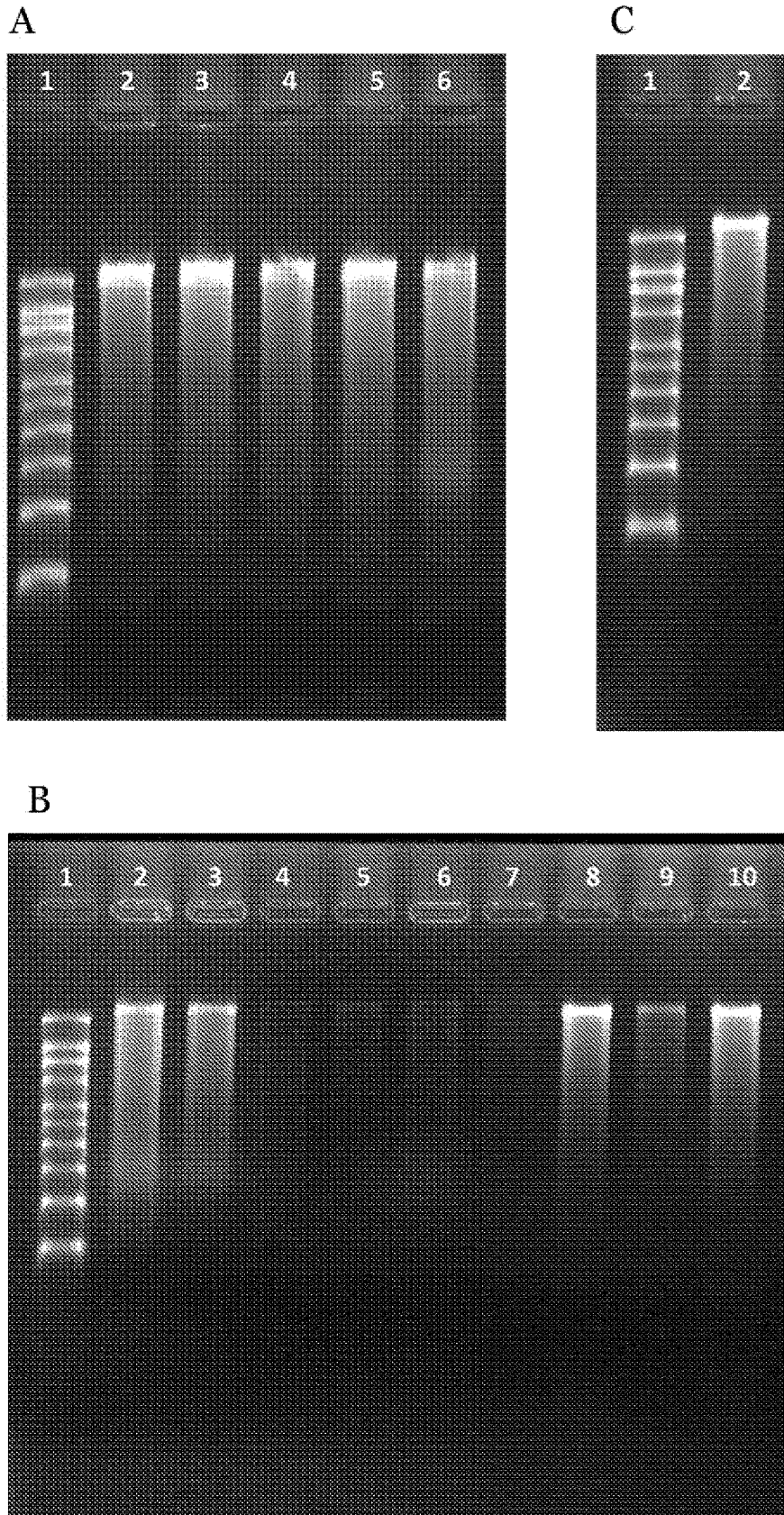
1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190
FVSGNCDVVI GIVNNTVIDP LQPELDSFKE ELDKYFKNHT SPDVDLGDIS GINASVVNIQ KEIDRLNEVA

1200    1210    1220    1230    1240    1250    1260
KNLNESLIDL QELGKYEQYI KWPWYIWLGF IAGLIAIVMV TIMLCCMTSC CSCLKGCCSC GSCKKFDDED

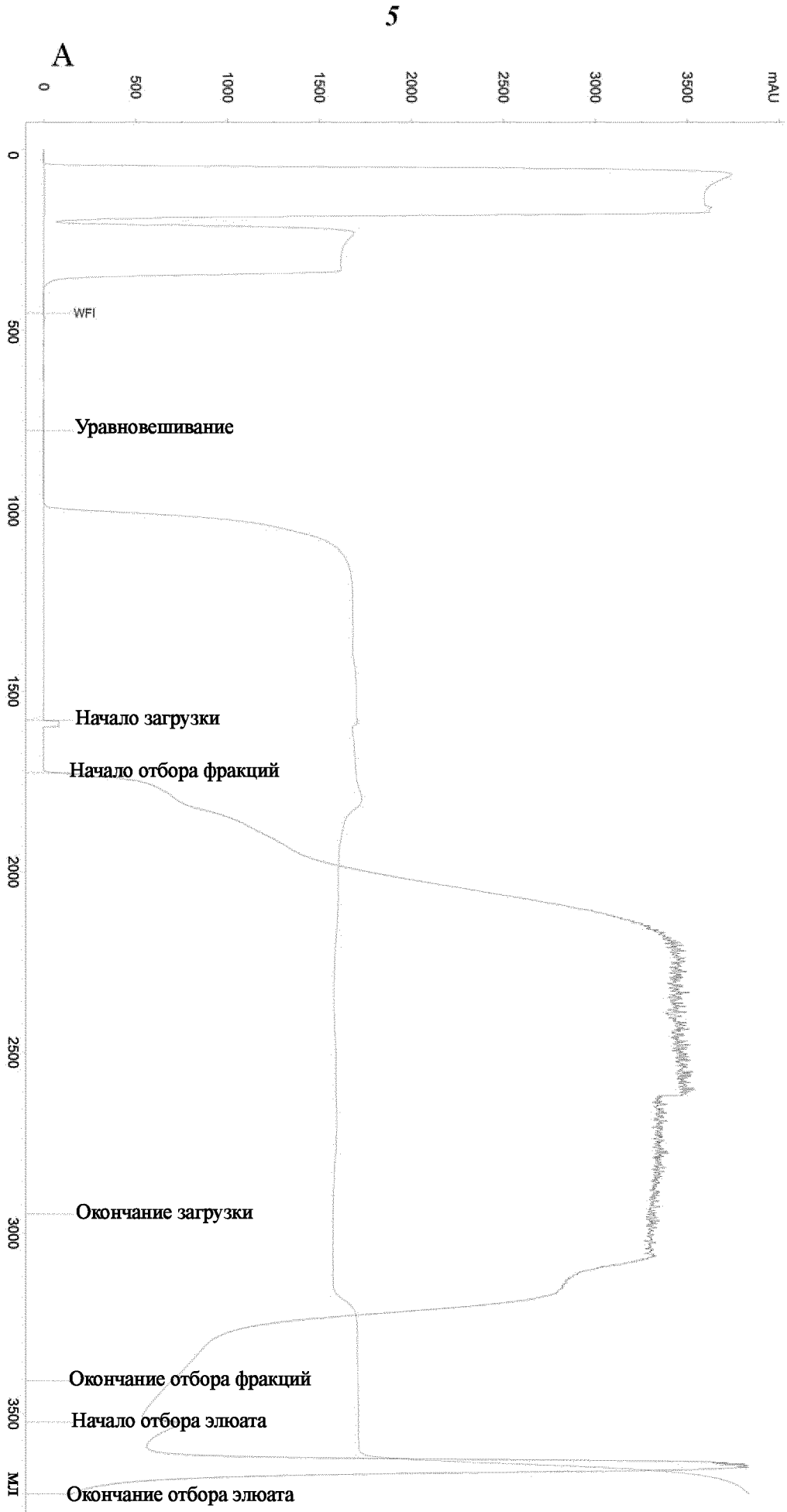
1270
SEPVLKGVKL HYT**

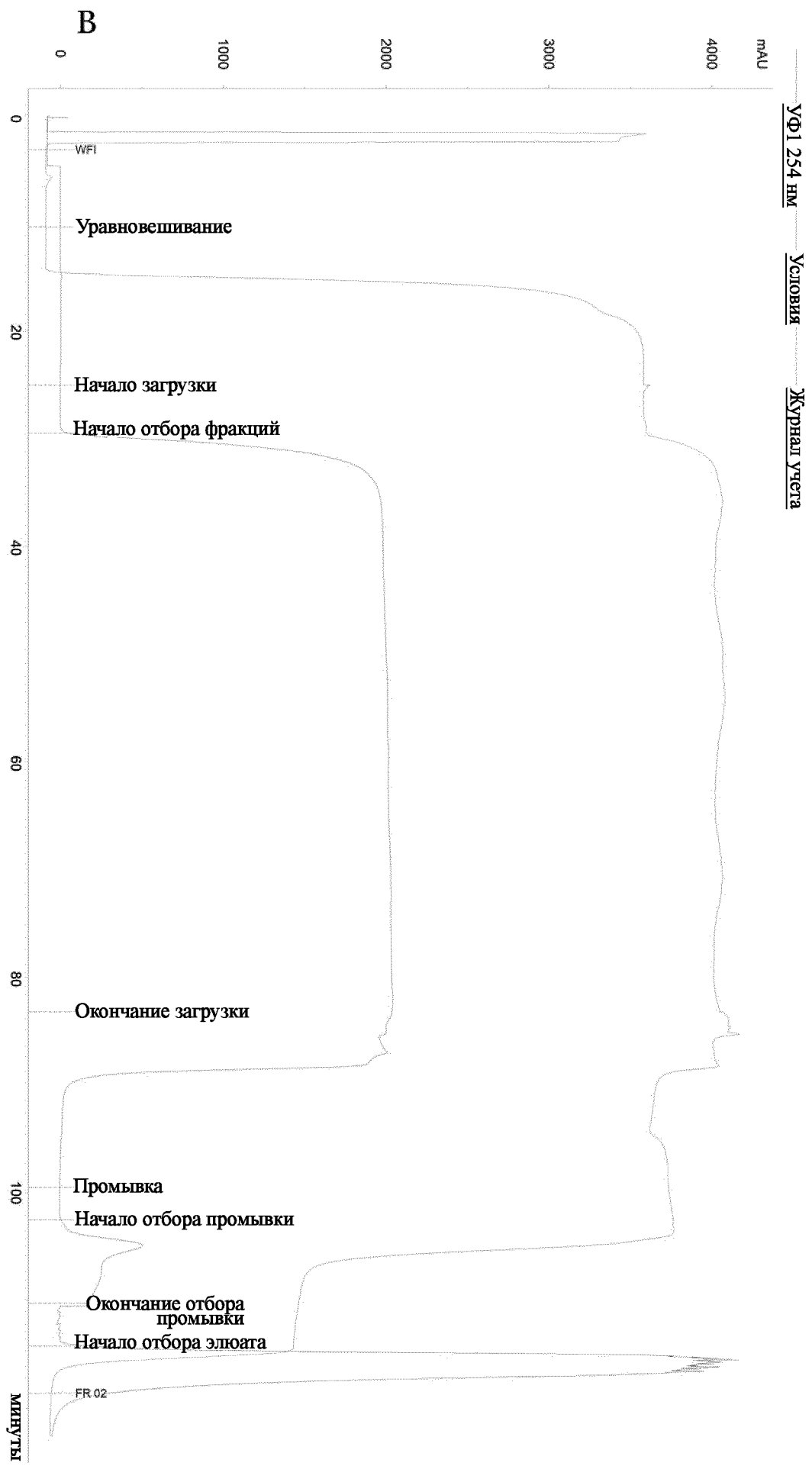
```

Фиг. 2-1

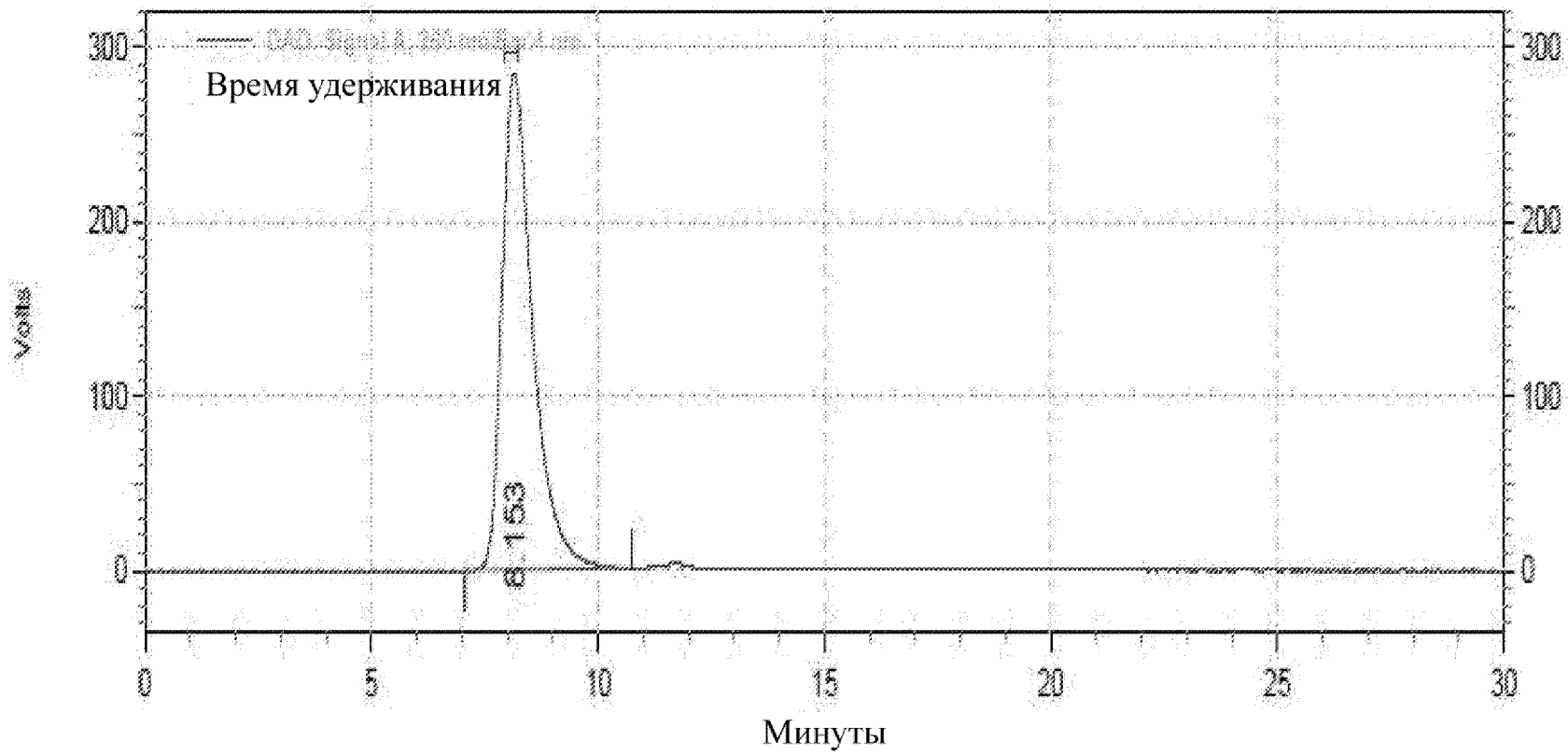


ФИГ. 3



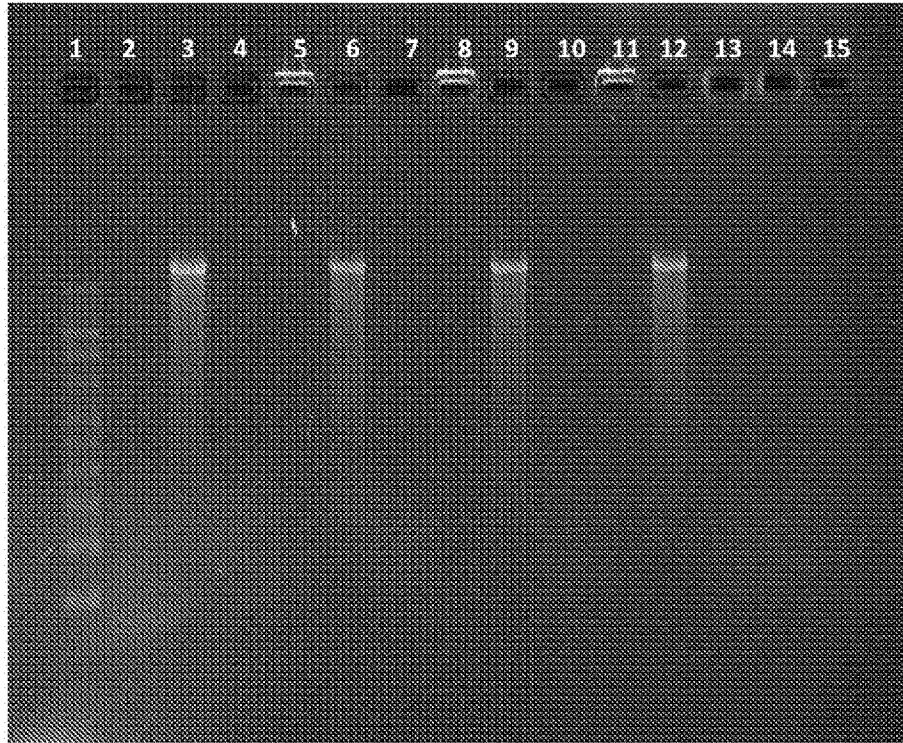


1-3 ЛИФ

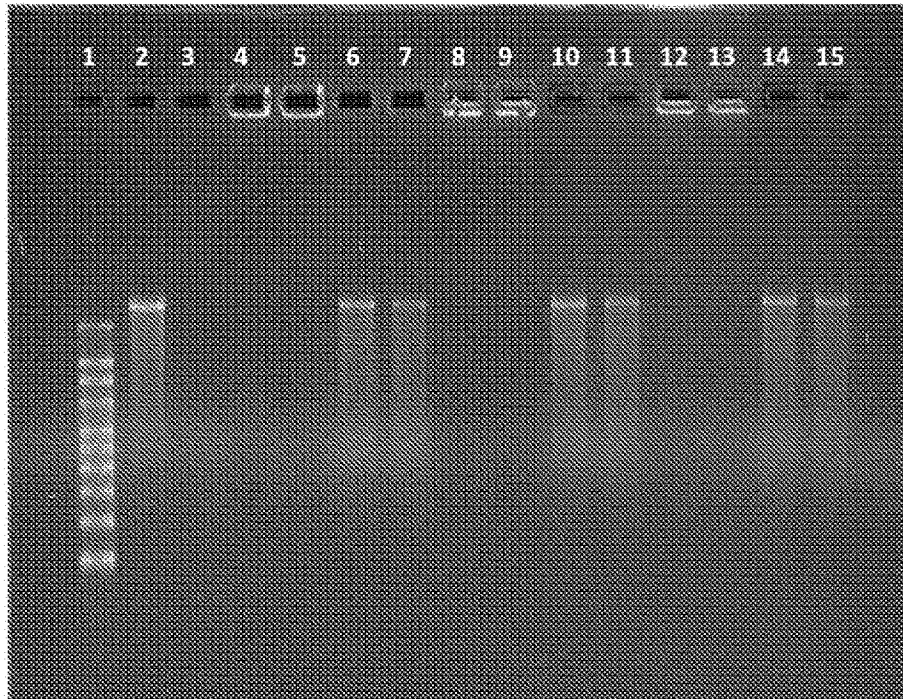


ФИГ. 4

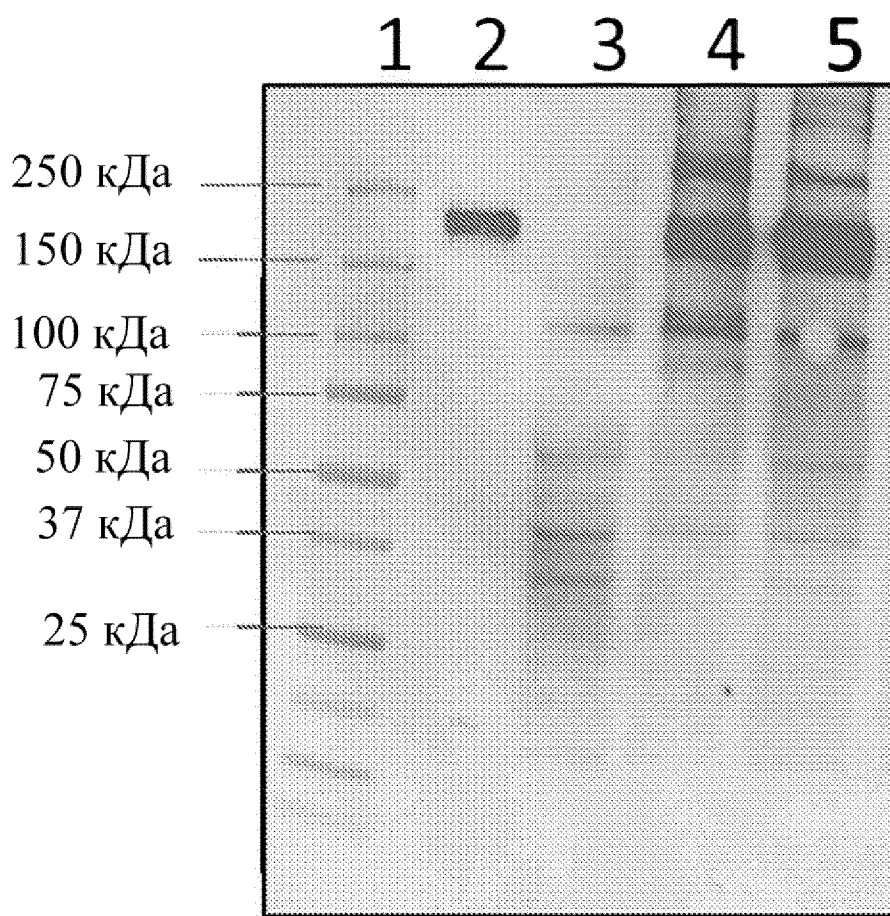
А



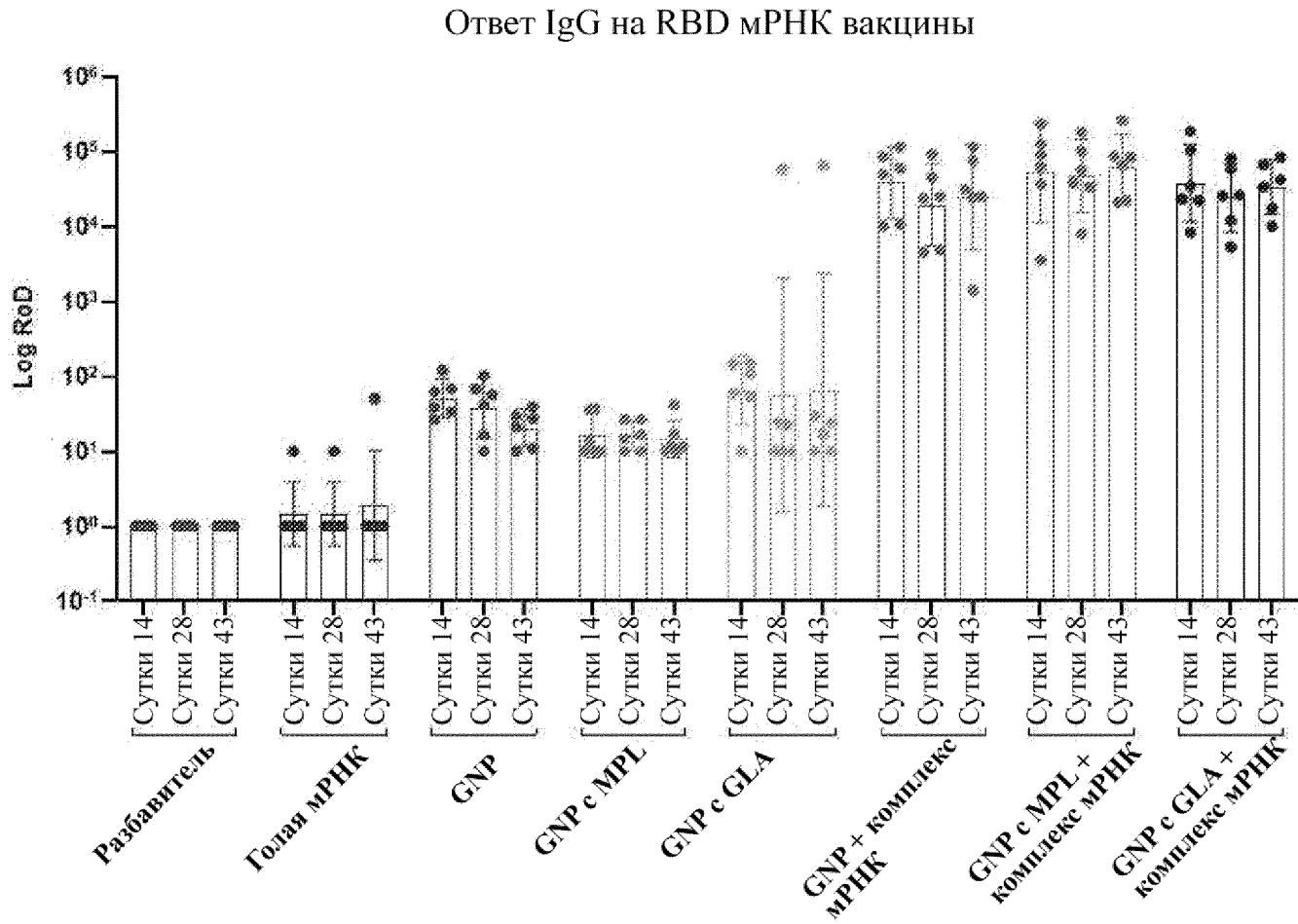
В



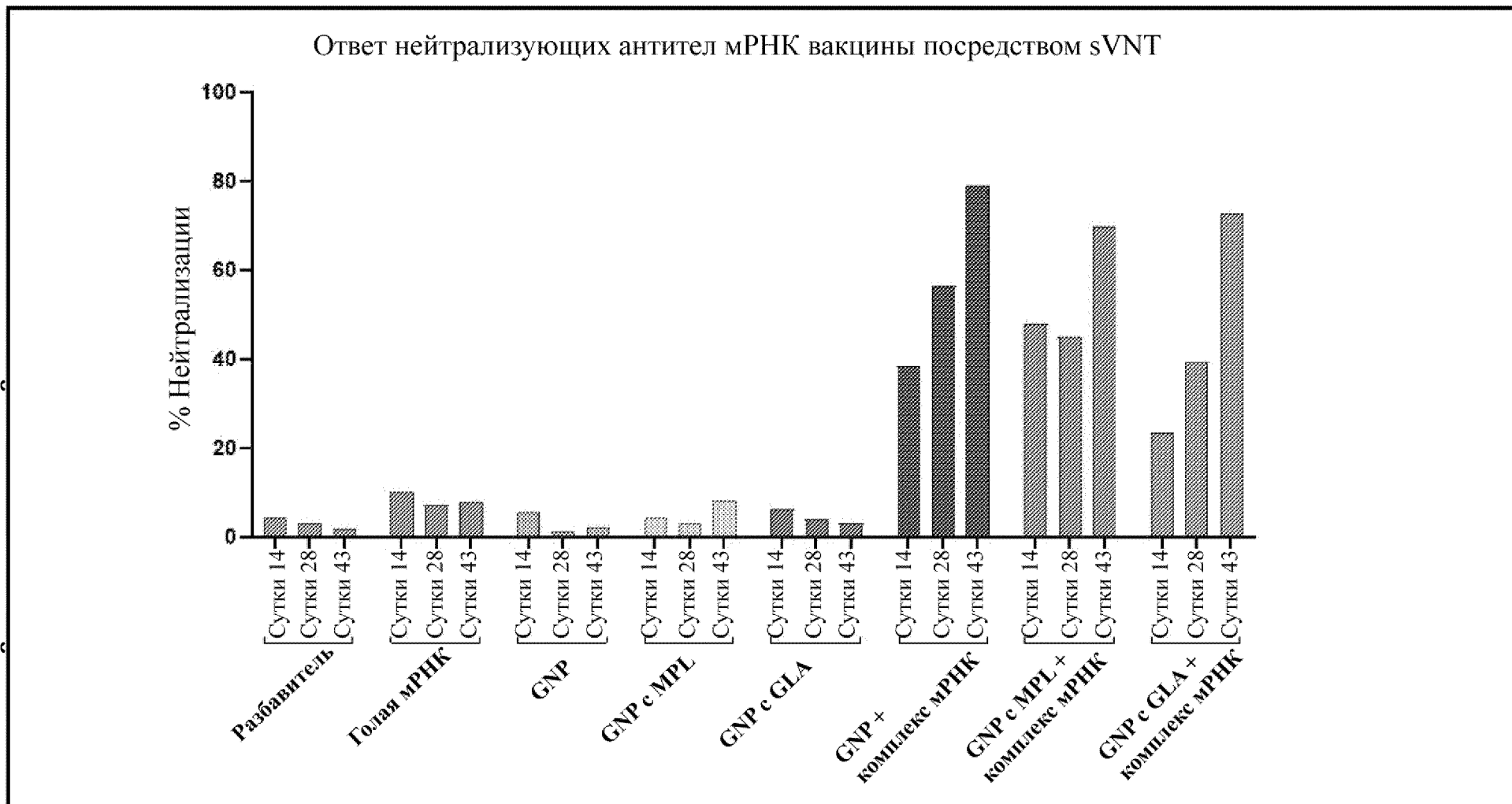
ФИГ. 5



ФИГ. 5-1



ФИГ. 6



ФИГ. 7