

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **033966**(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2019.12.13**

**(51)** Int. Cl. **C07D 403/06** (2006.01)  
**C07D 413/06** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201692309**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.06.24**

**(54) СТЕРЕОХИМИЧЕСКИ ОБОГАЩЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ДОСТАВКИ  
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**

**(31)** **62/016,512**

**(32)** **2014.06.24**

**(33)** **US**

**(43)** **2017.06.30**

**(86)** **PCT/US2015/037392**

**(87)** **WO 2015/200465 2015.12.30**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ТРАНСЛЕЙТ БИО, ИНК. (US)**

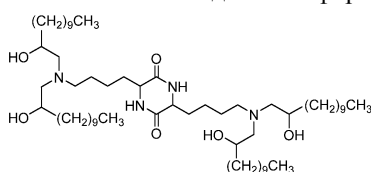
**(56)** **US-A1-20130158021**

Dong Y. et al., "Lipopeptide nanoparticles for potent and selective siRNA delivery in rodents and nonhuman primates", Vol. 111, 18 March 2013, pages 3955-3960; entire document

**(72)** Изобретатель:  
**Дероза Франк, Карв Шриран,  
Хартлейн Майкл (US)**

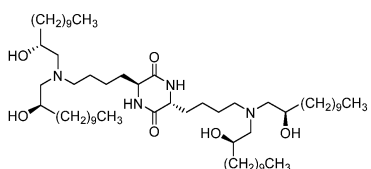
**(74)** Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

**(57)** В изобретении предложена катионная липидная композиция для доставки нуклеиновых кислот, содержащая одно или более химических соединений формулы I



I

его фармацевтически приемлемую соль, его сольват или сольват его фармацевтически приемлемой соли, характеризующаяся тем, что более 50 мас.% общего количества химических соединений формулы I в композиции составляют химические соединения формулы I.a.i



I.a.i

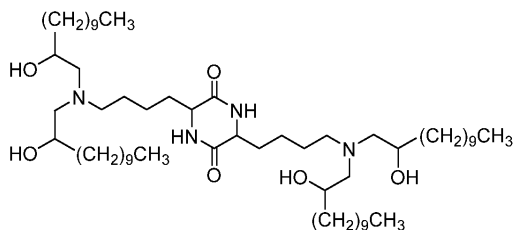
**B1****033966****033966****B1**

### Уровень техники

Доставка нуклеиновых кислот с помощью липидов была широко изучена в отношении лечения различных заболеваний. Сохраняется большая потребность в липидах и/или липидных композициях, которые могут доставлять нуклеиновые кислоты, такие как короткие интерферирующие РНК (киРНК) и матричные РНК (мРНК), с высокой эффективностью и низкой токсичностью.

### Сущность изобретения

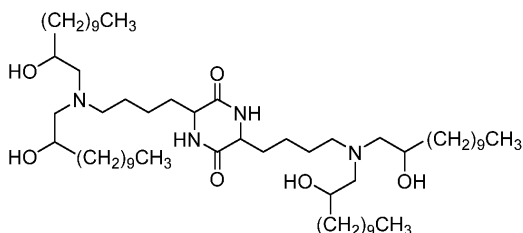
Помимо всего прочего, изобретение относится к композициям, содержащим стереохимически обогащенные липиды для доставки мРНК. Данное изобретение основано, отчасти, на неожиданном открытии того, что композиции, содержащие стереохимически обогащенный липид формулы I, приведенной ниже, являются высокоэффективными и обладают неожиданно низкой токсичностью при доставке мРНК и получении кодируемого белка *in vivo*



I

Авторы изобретения обнаружили, что при использовании для доставки мРНК, стереохимически обогащенные композиции, содержащие I, обладают неожиданно низкой токсичностью по сравнению со стереохимически необогащенными, или стереохимически менее обогащенными, композициями того же липида, о чем свидетельствуют, например, значительно более низкие уровни экспрессии аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ). См. табл. 1.

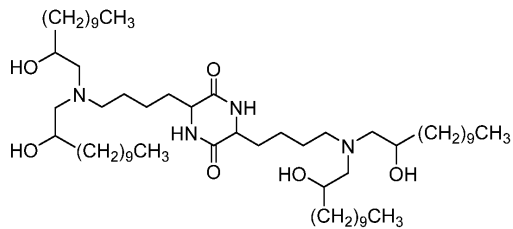
В некоторых вариантах реализации изобретение относится к композиции, содержащей одно или более химических соединений формулы I, каждое из которых представляет собой соединение формулы I



I

его фармацевтически приемлемую соль, его сольват или сольват его фармацевтически приемлемой соли, композицию, отличающуюся тем, что не меньше первого порогового значения общего количества химических соединений формулы I в композиции составляют химические соединения формулы I.a, I.b.1, I.b.2, I.c, I.d, I.e, I.f, I.g или I.h, каждое из которых независимо является таким, как определено и описано ниже.

В некоторых вариантах реализации изобретение относится к композиции, содержащей одно или более химических соединений формулы I, каждое из которых представляет собой соединение формулы I

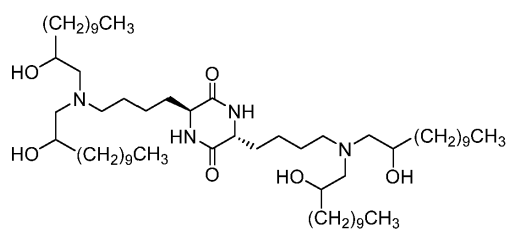


I

его фармацевтически приемлемую соль, его сольват или сольват его фармацевтически приемлемой соли,

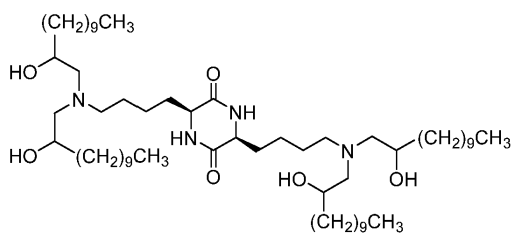
композиции, отличающейся тем, что не меньше первого порогового значения общего количества химических соединений формулы I в композиции составляют химические соединения формулы I.a

033966



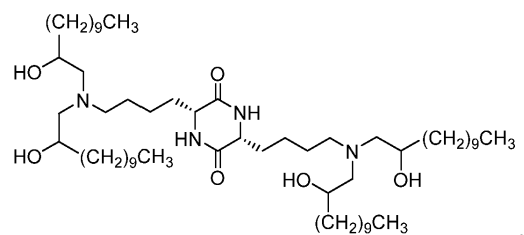
I.a

при этом первое пороговое значение составляет 50%; или составляют химические соединения и формулы I.b.1



I.b.1

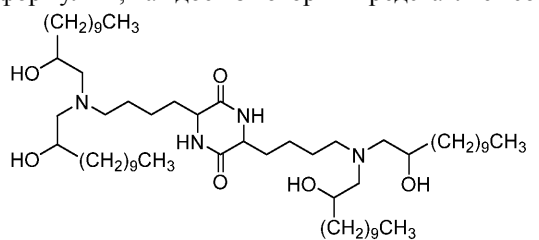
при этом первое пороговое значение составляет 25%; или составляют химические соединения формулы I.b.2



I.b.2

при этом первое пороговое значение составляет 25%.

В некоторых вариантах реализации изобретение относится к композиции, содержащей одно или более химических соединений формулы I, каждое из которых представляет собой соединение формулы I

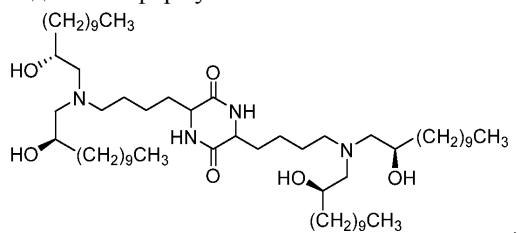


I

его фармацевтически приемлемую соль, его сольват или сольват его фармацевтически приемлемой соли,

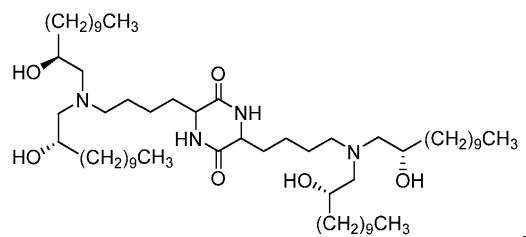
композиции, отличающейся тем, что больше первого порогового значения общего количества химических соединений формулы I в композиции

составляют химические соединения формулы I.c



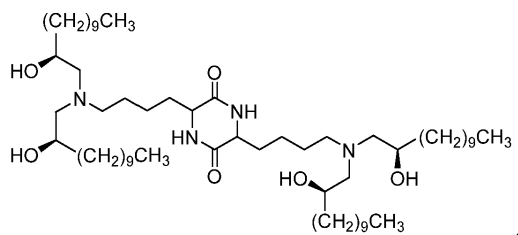
I.c

при этом первое пороговое значение составляет 6,25%; или составляют химические соединения формулы I.d



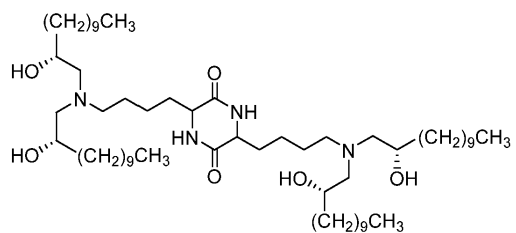
I.d

при этом первое пороговое значение составляет 6,25%; или составляют химические соединения формулы I.e



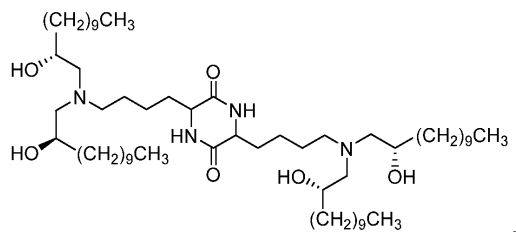
I.e

при этом первое пороговое значение составляет 25%; или составляют химические соединения формулы I.f



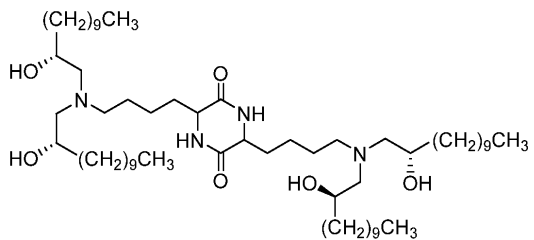
I.f

при этом первое пороговое значение составляет 25%; или составляют химические соединения формулы I.g



I.g

при этом первое пороговое значение составляет 12,5%; или составляют химические соединения формулы I.h



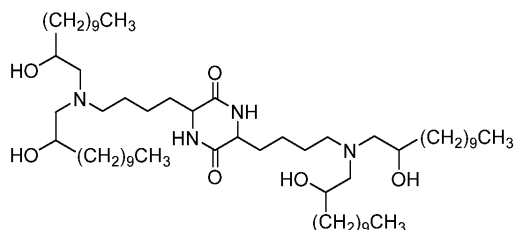
I.h

при этом первое пороговое значение составляет 25%.

В некоторых вариантах реализации изобретения первое пороговое значение составляет 50, 60, 70,

80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%. В некоторых вариантах реализации изобретения первое пороговое значение составляет 50%. В некоторых вариантах реализации изобретения первое пороговое значение составляет 70%. В некоторых вариантах реализации изобретения первое пороговое значение составляет 80%. В некоторых вариантах реализации изобретения первое пороговое значение составляет 95%.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к композиции, содержащей одно или более химических соединений формулы I, каждое из которых представляет собой соединение формулы I



I

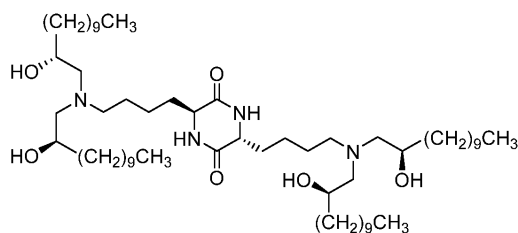
его фармацевтически приемлемую соль, его сольват или сольват его фармацевтически приемлемой соли,

композиции, отличающейся тем, что не меньше первого порогового значения общего количества химических соединений формулы I в композиции составляют химические соединения первой формулы, выбранные из формул I.a, I.b.1, I.b.2, I.c, I.d, I.e, I.f, I.g или I.h; и

не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений первой формулы в композиции составляют химические соединения того же стереоизомера первой формулы.

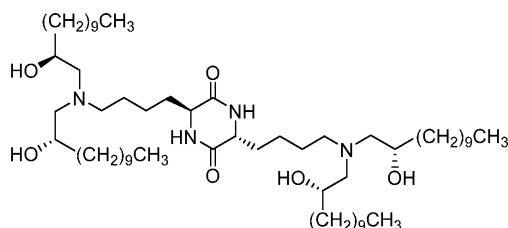
В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше первого порогового значения общего количества химических соединений формулы I в композиции составляют химические соединения формулы I.a.

В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.a в композиции составляет химическое соединение формулы I.a.i



I.a.i (то есть R4-SR-cKK-E12)

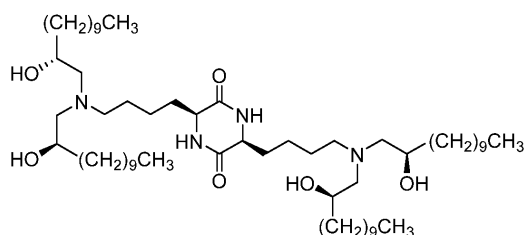
В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.a в композиции составляет химическое соединение формулы I.a.ii



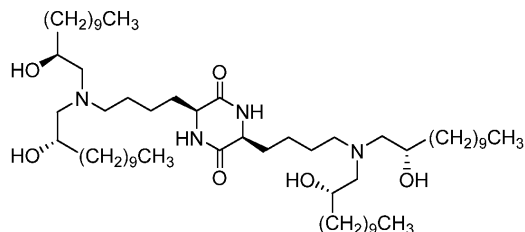
I.a.ii (то есть S4-SR-cKK-E12)

В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше первого порогового значения общего количества химических соединений формулы I в композиции составляют химические соединения формулы I.b.1.

В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.b.1 в композиции составляет химическое соединение формулы I.b.1.i

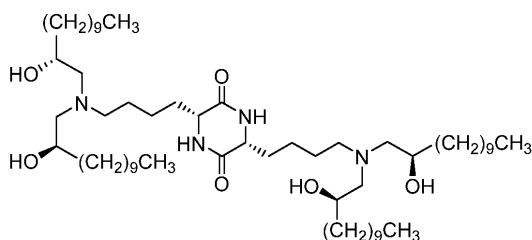
**I.b.1.i** (то есть R4-SS-cKK-E12)

В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.b.1 в композиции составляет химическое соединение формулы I.b.1.ii

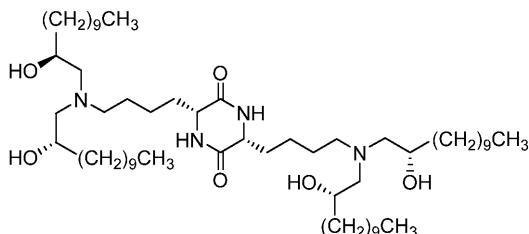
**I.b.1.ii** (то есть S4-SS-cKK-E12)

В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше первого порогового значения общего количества химических соединений формулы I в композиции составляют химические соединения формулы I.b.2.

В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.b.2 в композиции составляет химическое соединение формулы I.b.2.i

**I.b.2.i** (то есть R4-RR-cKK-E12)

В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.b.2 в композиции составляет химическое соединение формулы I.b.2.ii

**I.b.2.ii** (то есть S4-RR-cKK-E12)

В некоторых вариантах реализации изобретения второе пороговое значение составляет 50, 60, 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%. В некоторых вариантах реализации изобретения второе пороговое значение составляет 50%. В некоторых вариантах реализации изобретения второе пороговое значение составляет 70%. В некоторых вариантах реализации изобретения второе пороговое значение составляет 80%. В некоторых вариантах реализации изобретения второе пороговое значение составляет 95%.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к композиции, содержащей одно или более химических соединений формулы I, каждое из которых представляет собой соединение формулы I

CCCCCCCCCN(CCCCCO)CCCCNC(=O)NC(=O)NCCCCN(CCCCCO)CCCCO

- 6 -

### Краткое описание графических материалов

Фигура иллюстрирует результаты получения белка ASS1 человека *in vivo* в печени мыши дикого типа после обработки липидными наночастицами, которые содержат соединения формулы I.

### Определения

Для упрощения понимания изобретения ниже дано исходное определение некоторых терминов. Дополнительные определения следующих терминов и других терминов излагаются в тексте спецификации. Публикации и другие ссылочные материалы, на которые ссылаются в данном документе для описания уровня техники данного изобретения и для обеспечения дополнительных подробностей, касающихся его практической реализации, полностью включены в данный документ посредством ссылки.

**Аминокислота:** при использовании по тексту данного документа термин "аминокислота", в его самом широком смысле, относится к любому соединению и/или веществу, которые могут быть включены в полипептидную цепь. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота имеет общую структуру  $H_2N-C(H)(R)-COOH$ . В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота представляет собой природную аминокислоту. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота представляет собой синтетическую аминокислоту; в некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота представляет собой D-аминокислоту; в некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота представляет собой L-аминокислоту. Термин "стандартная аминокислота" относится к любой из двадцати стандартных L-аминокислот, которые обычно встречаются в природных пептидах. Термин "нестандартная аминокислота" относится к любой аминокислоте, отличной от стандартных аминокислот, независимо от того, является ли она синтезированной или полученной из природного источника. При использовании по тексту данного документа термин "синтетическая аминокислота" охватывает химически модифицированные аминокислоты, в том числе, не ограничиваясь ими, соли, производные аминокислот (такие как амиды) и/или замещения. Аминокислоты, в том числе карбоксил- и/или аминоконцевые аминокислоты в пептидах, могут быть модифицированы с помощью метилирования, амидирования, ацетилирования, защитных групп и/или замещения другими химическими группами, что может изменять период полувыведения пептида из крови без оказания отрицательного воздействия на их активность. Аминокислоты могут принимать участие в дисульфидной связи. Аминокислоты могут содержать одну из посттрансляционных модификаций, таких как ассоциация с одним или более химическими соединениями (например, металльные группы, ацетатные группы, ацетильные группы, фосфатные группы, формильные фрагменты, изопреноидные группы, сульфатные группы, фрагменты полиэтиленгликоля, липидные фрагменты, углеводные фрагменты, фрагменты биотина и т.д.). Термин "аминокислота" используется взаимозаменяемо с термином "аминокислотный остаток" и может относиться к свободной аминокислоте и/или к аминокислотному остатку пептида. Из контекста, в котором используется данный термин, будет понятно, относится ли он к свободной аминокислоте или к остатку пептида.

**Животное:** при использовании по тексту данного документа термин "животное" относится к любому представителю животного мира. В некоторых вариантах реализации изобретения термин "животное" относится к людям на любой стадии развития. В некоторых вариантах реализации изобретения термин "животное" относится к не относящимся к человеку животным на любой стадии развития. В некоторых вариантах реализации изобретения не относящееся к человеку животное представляет собой млекопитающее (например, грызун, мышь, крыса, кролик, обезьяна, собака, кошка, овца, крупный рогатый скот, примат и/или свинья). В некоторых вариантах реализации изобретения животные включают, не ограничиваясь ими, млекопитающих, птиц, рептилий, амфибий, рыб, насекомых и/или червей. В некоторых вариантах реализации изобретения животное может представлять собой трансгенное животное, генно-инженерное животное и/или клон.

**Приблизительно или около:** при использовании по тексту данного документа термин "приблизительно" или "около", применительно к одному или более рассматриваемым значениям, относится к значению, которое является сходным с установленным эталонным значением. В некоторых вариантах реализации изобретения термин "приблизительно" или "около" относится к диапазону значений, попадающих в пределы 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% или менее, в любом направлении (более чем или менее чем) установленного эталонного значения, если не указано иное или из контекста не очевидно иное (кроме случаев, когда такое количество будет превышать 100% от возможного значения).

**Химическое соединение:** при использовании по тексту данного документа термин "химическое соединение" включает соединение, соль или их сольват или любую комбинацию соединений, солей или их сольватов.

**Доставка:** при использовании по тексту данного документа термин "доставка" охватывает как локальную, так и системную доставку. Например, доставка мРНК охватывает ситуации, в которых мРНК доставляется в ткань-мишень, а кодируемый белок экспрессируется и удерживается в ткани-мишени (также называемые "локальным распределением" или "локальной доставкой"), и ситуации, в которых мРНК доставляется в ткань-мишень, а кодируемый белок экспрессируется и секретируется в систему кровообращения пациента (например, сыроворотку), системно распределяется и поглощается другими тканями (также называемые "системным распределением" или "системной доставкой").



**Экспрессия:** при использовании по тексту данного документа термин "экспрессия" нуклеотидной последовательности относится к трансляции мРНК в полипептид, сборке нескольких полипептидов (например, тяжелой цепи или легкой цепи антитела) в интактный белок (например, антитело) и/или посттрансляционной модификации полипептида или полностью собранного белка (например, антитела). В данной заявке термины "экспрессия" и "производство", а также их грамматические эквиваленты используются взаимозаменяемо.

**Функциональный:** при использовании по тексту данного документа термин "функциональная" биологическая молекула означает форму биологической молекулы, в которой она обладает свойством и/или активностью, которыми она характеризуется.

**Период полувыведения:** при использовании по тексту данного документа термин "период полувыведения" означает время, необходимое для того, чтобы такой параметр, как концентрация или активность нуклеиновой кислоты или белка, снизился на половину от своего значения, измеренного в начале периода времени.

**Улучшение, увеличение или уменьшение:** при использовании по тексту данного документа термины "улучшение", "увеличение" или "уменьшение" или их грамматические эквиваленты означают изменение параметров относительно первоначального измерения, такого как измерение у того же индивидуума до начала лечения, описанного в данном документе, или измерение у контрольного субъекта (или нескольких контрольных субъектов) при отсутствии лечения, описанного в данном документе. "Контрольным субъектом" является субъект, имеющий ту же форму заболевания, что и субъект, получающий лечение, и примерно тот же возраст, что и субъект, получающий лечение.

**In Vitro:** при использовании по тексту данного документа термин "in vitro" относится к явлениям, происходящим в искусственной среде, например в лабораторной пробирке или реакционном сосуде, в клеточной культуре и т.д., а не в многоклеточном организме.

**In Vivo:** при использовании по тексту данного документа термин "in vivo" относится к явлениям, происходящим в многоклеточном организме, таком как человек и не относящееся к человеку животное. В контексте клеточных систем данный термин может применяться для обозначения явлений, происходящих в живой клетке (в отличие, например, от систем in vitro).

**Выделенный:** при использовании по тексту данного документа термин "выделенный" относится к веществу и/или соединению, которые были (1) отделены, по меньшей мере, от некоторых из компонентов, с которыми они были связаны, когда впервые были получены (будь то естественные и/или экспериментальные условия), и/или (2) получены, приготовлены и/или изготовлены человеком. Выделенные вещества и/или соединения могут быть отделены от около 10%, около 20%, около 30%, около 40%, около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или более чем около 99% других компонентов, с которыми они были первоначально связаны. В некоторых вариантах реализации изобретения выделенные агенты характеризуются около 80%, около 85%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или более чем около 99% чистотой. При использовании по тексту данного документа вещество называется "чистым", если оно, по сути, свободно от других компонентов. При использовании по тексту данного документа, расчет процента чистоты выделенных веществ и/или соединений не должен включать вспомогательные вещества (например, буфер, растворитель, воду и т.д.).

**Локальное распределение или доставка:** при использовании по тексту данного документа термины "локальное распределение", "локальная доставка" или грамматические эквиваленты обозначают тканеспецифическую доставку или распределение. Как правило, для локального распределения или доставки необходим белок (например, фермент), кодируемый мРНК, который транслируется и экспрессируется внутриклеточно или имеет ограниченную секрецию, что позволяет избежать поступления в систему кровообращения пациента.

**Матричная РНК (мРНК):** при использовании по тексту данного документа термин "матричная РНК (мРНК)" относится к полинуклеотиду, который кодирует по меньшей мере один полипептид. При использовании по тексту данного документа термин мРНК охватывает как модифицированную, так и немодифицированную РНК. мРНК может содержать одну или более кодирующих и не кодирующих областей. мРНК может быть очищена от природных источников, полученных с помощью рекомбинантных систем экспрессии, и необязательно очищена, получена путем химического синтеза и т.д. При необходимости, например, в случае полученных путем химического синтеза молекул, мРНК может содержать нуклеозидные аналоги, такие как аналоги, имеющие химически модифицированные основания или сахара, модификации остова и т.д. Последовательность мРНК представлена в направлении от 5' к 3', если не указано иное. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК представляет собой или содержит природные нуклеозиды (например, аденозин, гуанозин, цитидин, уридин); нуклеозидные аналоги (например, 2-аминоаденозин, 2-тиотимидин, инозин, пирролопиримидин, 3-метиладенозин, 5-метилцитидин, C5-пропинилцитидин, C5-пропинилуридин, 2-аминоаденозин, C5-бромгуанидин, C5-фторуридин, C5-йодуридин, C5-пропинилуридин, C5-пропинилцитидин, C5-пропинилцитидин, 2-аминоаденозин, 7-дезааденозин, 7-дезагуанозин, 8-оксааденозин, 8-оксогуанозин, O(6)-метилгуанин и 2-тиоцитидин); химиче-

ски модифицированные основания; биологически модифицированные основания (например, метилированные основания); интеркалированные основания; модифицированные сахара (например, 2'-фторорибоза, рибоза, 2'-дезоксирибоза, арабиноза и гексоза); и/или модифицированные фосфатные группы (например, тиофосфорные эфиры и 5'-N-амидофосфитные связи).

В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК содержит один или более нестандартных нуклеотидных остатков. Нестандартные нуклеотидные остатки могут включать, например, 5-метилцитидин ("5mC"), псевдоуридин и/или 2-тиоуридин ("2sU"). См., например, патент США № 8278036 или WO 2011012316 для рассмотрения таких остатков и их включения в мРНК. мРНК может представлять собой РНК, которая определяется как РНК, в которой 25% остатков U составляет 2-тиоуридин и 25% остатков C составляет 5-метилцитидин. Принципы использования РНК раскрыты в публикации патента США US 20120195936 и международной публикации WO 2011012316, обе из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Присутствие нестандартных нуклеотидных остатков может делать мРНК более стабильной и/или менее иммуногенной, чем контрольная мРНК с такой же последовательностью, но содержащая только стандартные остатки. В дополнительных вариантах реализации изобретения мРНК может содержать один или более нестандартных нуклеотидных остатков, выбранных из изоцитозина, псевдоизоцитозина, 5-бром урацила, 5-пропинил урацила, 6-аминопурина, 2-аминопурина, инозина, диаминопурина и 2-хлор-6-аминопурина цитозина, а также комбинаций этих модификаций и других модификаций нуклеотидных оснований. Некоторые варианты реализации изобретения могут дополнительно включать дополнительные модификации фуранозного кольца или нуклеотидного основания. Дополнительные модификации могут включать, например, модификации сахаров или замещения (например, одна или более модификаций 2'-О-алкила, закрытая нуклеиновая кислота (LNA)). В некоторых вариантах реализации изобретения РНК могут быть связаны в комплекс или связаны с дополнительными полинуклеотидами и/или пептидными полинуклеотидами (PNA). В вариантах реализации изобретения, в которых модификация сахаров представляет собой модификацию 2'-О-алкила, такая модификация может включать, не ограничиваясь ими, модификацию 2'-дезоксидеокси-2'-фтора, модификацию 2'-О-метила, модификацию 2'-О-метоксиэтила и модификацию 2'-дезоксидеокси. В некоторых вариантах реализации изобретения любая из этих модификаций может присутствовать в 0-100% нуклеотидов, например в более чем 0, 1, 10, 25, 50, 75, 85, 90, 95 или 100% входящих в состав нуклеотидов по отдельности или в комбинации.

Нуклеиновая кислота: при использовании по тексту данного документа термин "нуклеиновая кислота", в его самом широком смысле, относится к любому соединению и/или веществу, которые включены или могут быть включены в полинуклеотидную цепь. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота представляет собой соединение и/или вещество, которые включены или могут быть включены в полинуклеотидную цепь посредством фосфодиэфирной связи. В некоторых вариантах реализации изобретения "нуклеиновая кислота" относится к отдельным нуклеотидным остаткам (например, нуклеотиды и/или нуклеозиды). В некоторых вариантах реализации изобретения "нуклеиновая кислота" относится к полинуклеотидной цепи, содержащей отдельные нуклеотидные остатки. В некоторых вариантах реализации изобретения "нуклеиновая кислота" охватывает РНК, а также одно- и/или двухцепочечную ДНК, и/или кДНК.

Пациент: при использовании по тексту данного документа термин "пациент" или "субъект" относится к любому организму, в который может быть введена предложенная композиция, например, в экспериментальных, диагностических, профилактических, косметических или терапевтических целях. Типичные пациенты включают животных (например, млекопитающих, таких как мыши, крысы, кролики, нечеловекообразные приматы и/или люди). В некоторых вариантах реализации изобретения пациентом является человек. Человек может быть в пре- и постнатальном периоде развития.

Фармацевтически приемлемый: при использовании по тексту данного документа термин "фармацевтически приемлемый" относится к веществам, которые с медицинской точки зрения пригодны для применения в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соизмеримых с приемлемым соотношением польза/риск.

Полимер: при использовании по тексту данного документа термин "полимер" относится к соединению, состоящему по меньшей мере из 3 (например, по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 и т.д.) повторяющихся, ковалентно связанных структурных единиц.

Соль: при использовании по тексту данного документа термин "соль" или "фармацевтически приемлемая соль" относится к таким солям, которые с медицинской точки зрения пригодны для применения в контакте с тканями человека и низших животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и тому подобного, и соизмеримы с приемлемым соотношением польза/риск. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области техники. Например, S.M. Berge et al., подробно описывает фармацевтически приемлемые соли в публикации J. Pharmaceutical Sciences (1977) 66:1-19. Фармацевтически приемлемые соли соединений по данному изобретению включают соли, полученные из подходящих неорганических и органических кислот и оснований. Примерами фармацевтически приемлемых, нетоксичных кислотно-аддитивных солей являются соли аминогруппы, образованные с

неорганическими кислотами, такими как соляная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и хлорная кислота, или с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, щавелевая кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота, или с помощью других методов, применяемых в данной области техники, таких как ионный обмен. Другие фармацевтически приемлемые соли включают соли адипината, альгината, аскорбата, аспартата, бензолсульфоната, бензоата, бисульфата, бората, бутирата, камфората, камфорсульфоната, цитрата, циклопентанпропионата, диглюконата, додецилсульфата, этансульфоната, формиата, fumarата, глюкогептоната, глицерофосфата, глюконата, гемисульфата, гептаноата, гексаноата, гидройодида, 2-гидрокси-этансульфоната, лактобионата, лактата, лаурата, лаурилсульфата, малата, малеата, малоната, метансульфоната, 2-нафталинсульфоната, никотината, нитрата, олеата, оксалата, пальмитата, памоата, пектината, персульфата, 3-фенилпропионата, фосфата, пикрата, пивалата, пропионата, стеарата, сукцината, сульфата, тартрата, тиоцианата, п-толуолсульфоната, ундеканата, валерата и тому подобного. Соли, полученные из подходящих оснований, включают соли щелочных металлов, щелочно-земельных металлов, аммония и  $N+(C_{1-4} \text{ алкил})_4$ . Типичные соли щелочных или щелочно-земельных металлов включают соли натрия, лития, калия, кальция, магния и тому подобного. Дополнительные фармацевтически приемлемые соли включают в соответствующих случаях нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, образованные с помощью противоионов, таких как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, сульфонат и арилсульфонат. Дополнительные фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные из кватернизации амина с применением соответствующего электрофила, например, алкилгалогенида, с образованием кватернизированной алкилированной аминной соли.

Системное распределение или доставка: при использовании по тексту данного документа термины "системное распределение", "системная доставка" или грамматические эквиваленты относятся к механизму или способу доставки или распределения, которые воздействуют на все тело или на весь организм. Как правило, системное распределение или доставку осуществляют через систему кровообращения организма, например, кровоток. По сравнению с определением "локальное распределение или доставка".

Субъект: при использовании по тексту данного документа термин "субъект" относится к человеку или любому не относящемуся к человеку животному (например, мышь, крыса, кролик, собака, кошка, крупный рогатый скот, свинья, овца, лошадь или примат). Человек может быть в пре- и постнатальном периоде развития. Во многих вариантах реализации изобретения субъектом является человек. Субъектом может быть пациент, который относится к человеческому роду, обратившийся в медицинское учреждение для диагностики или лечения заболевания. При использовании по тексту данного документа термин "субъект" используют взаимозаменяемо с терминами "индивидуум" или "пациент". Субъект может быть страдать от заболевания или расстройства или быть предрасположенным к ним, но может проявлять или не проявлять симптомы заболевания или расстройства.

По сути: при использовании по тексту данного документа термин "по сути" относится к качественному состоянию проявления полного или практически полного объема или степени рассматриваемой характеристики или свойства. Специалисту в области биологии понятно, что биологические и химические явления редко, если это вообще случается, доходят до завершения и/или протекают полностью, или достигают или избегают абсолютного результата. Следовательно, термин "по сути", при использовании по тексту данного документа, направлен на то, чтобы охватить возможное отсутствие полноты, присущее многим биологическим и химическим явлениям.

Ткани-мишени: при использовании по тексту данного документа термин "ткани-мишени" относится к любой ткани, пораженной заболеванием, которое подлежит лечению. В некоторых вариантах реализации изобретения ткани-мишени включают те ткани, в которых проявляется патология, симптом или особенность, ассоциированные с заболеванием.

Терапевтически эффективное количество: при использовании по тексту данного документа термин "терапевтически эффективное количество" терапевтического средства означает количество, которое является достаточным при введении субъекту, страдающему от заболевания, расстройства и/или состояния, или предрасположенному к ним, с целью лечения, диагностики, профилактики и/или приостановления развития симптома (симптомов) заболевания, расстройства и/или состояния. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что терапевтически эффективное количество, как правило, вводят согласно схеме дозирования, включающей по меньшей мере одну стандартную дозу.

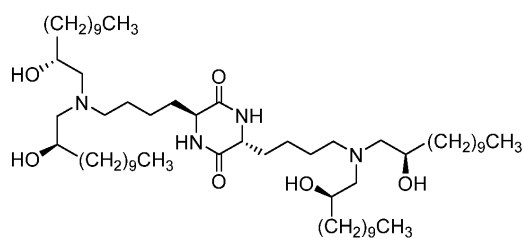
Лечение: при использовании по тексту данного документа термин "лечить", "лечение" или "обработка" относится к любому способу, применяемому для частичного или полного облегчения, улучшения, ослабления, ингибирования, предотвращения, задержки развития, уменьшения степени тяжести и/или уменьшения частоты одного или более симптомов или признаков конкретного заболевания, расстройства и/или состояния.

Лечение может получать субъект, который не проявляет признаков заболевания и/или у которого проявляются лишь первые признаки заболевания, с целью снижения риска развития патологии, обусловленной заболеванием.

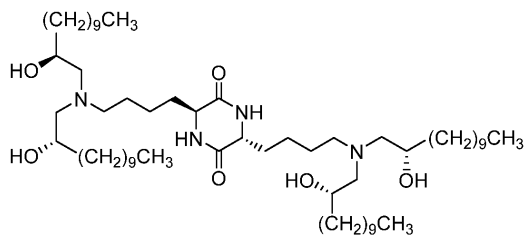




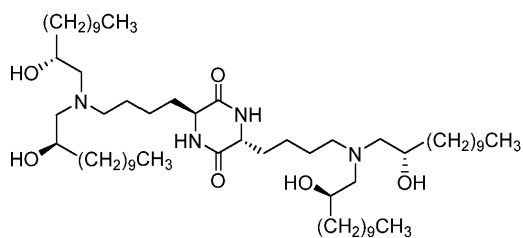


**I.a.i** (то есть R4-SR-cKK-E12)

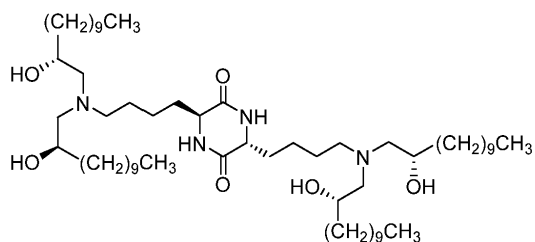
В некоторых вариантах реализации изобретения стереоизомер формулы I.a имеет структуру формулы I.a.ii

**I.a.ii** (то есть S4-SR-cKK-E12)

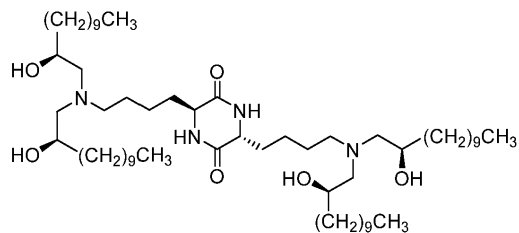
В некоторых вариантах реализации изобретения стереоизомер формулы I.a имеет структуру формулы I.a.iii

**I.a.iii**

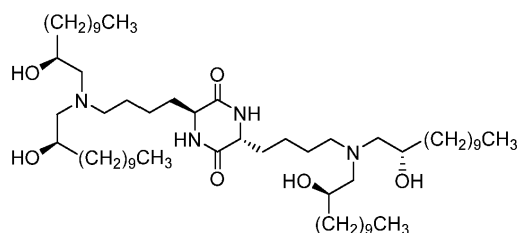
В некоторых вариантах реализации изобретения стереоизомер формулы I.a имеет структуру формулы I.a.iv

**I.a.iv**

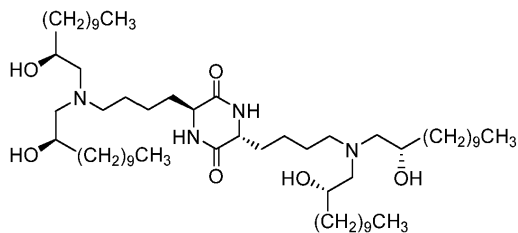
В некоторых вариантах реализации изобретения стереоизомер формулы I.a имеет структуру формулы I.a.v

**I.a.v**

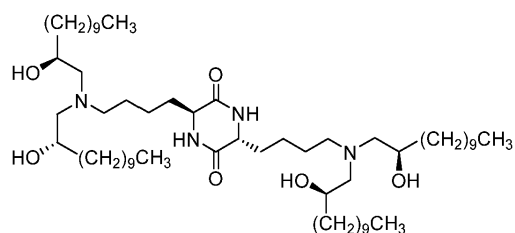
В некоторых вариантах реализации изобретения стереоизомер формулы I.a имеет структуру формулы I.a.vi

**I.a.vi**

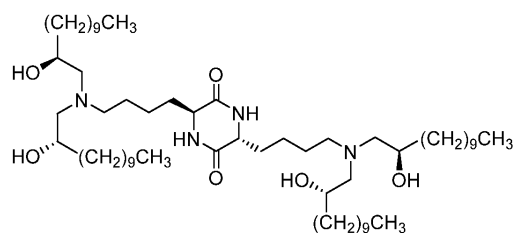
В некоторых вариантах реализации изобретения стереоизомер формулы I.a имеет структуру формулы I.a.vii

**I.a.vii**

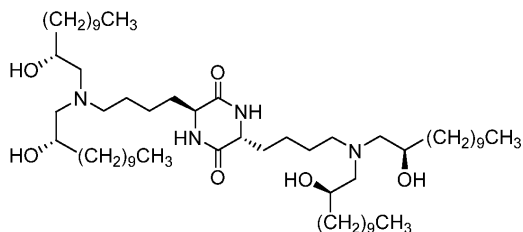
В некоторых вариантах реализации изобретения стереоизомер формулы I.a имеет структуру формулы I.a.viii

**I.a.viii**

В некоторых вариантах реализации изобретения стереоизомер формулы I.a имеет структуру формулы I.a.ix

**I.a.ix**

В некоторых вариантах реализации изобретения стереоизомер формулы I.a имеет структуру формулы I.a.x

**I.a.x**

В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.a в композиции составляют химические соединения формулы I.a.i. В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.a в композиции составляют химические соединения



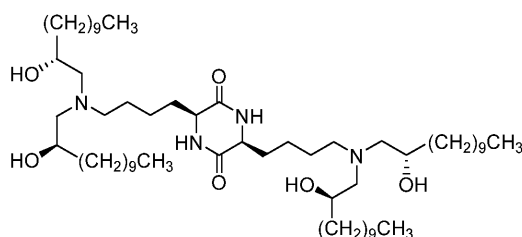
формулы I.a.ii. В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.a в композиции составляют химические соединения формулы I.a.iii. В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.a в композиции составляют химические соединения формулы I.a.iv. В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.a в композиции составляют химические соединения формулы I.a.v. В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.a в композиции составляют химические соединения формулы I.a.vi. В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.a в композиции составляют химические соединения формулы I.a.vii. В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.a в композиции составляют химические соединения формулы I.a.viii. В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.a в композиции составляют химические соединения формулы I.a.ix.

В некоторых вариантах реализации изобретения первая формула представляет собой формулу I.b.1. В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше первого порогового значения общего количества химических соединений формулы I в композиции составляют химические соединения формулы I.b.1 и не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.b.1 в композиции составляют химические соединения того же стереоизомера формулы I.b.1.

В некоторых вариантах реализации изобретения стереоизомер формулы I.b.1 имеет структуру формулы I.b.1.i (т.е. R4-SS-cKK-E12).

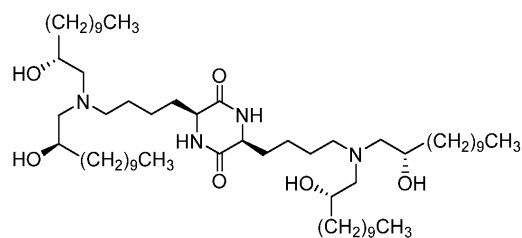
В некоторых вариантах реализации изобретения стереоизомер формулы I.b.1 имеет структуру формулы I.b.1.ii (т.е. S4-SS-cKK-E12).

В некоторых вариантах реализации изобретения стереоизомер формулы I.b.1 имеет структуру формулы I.b.1.iii



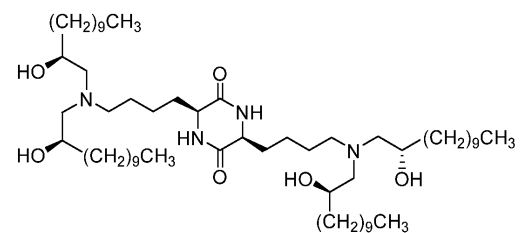
**I.b.1.iii**

В некоторых вариантах реализации изобретения стереоизомер формулы I.b.1 имеет структуру формулы I.b.1.iv



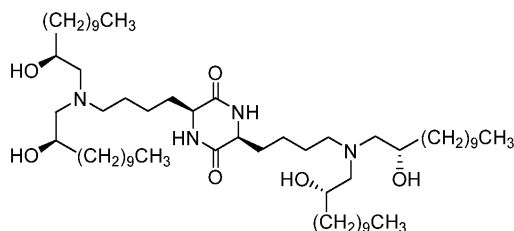
**I.b.1.iv**

В некоторых вариантах реализации изобретения стереоизомер формулы I.b.1 имеет структуру формулы I.b.1.v

**I.b.1.v**

В некоторых вариантах реализации изобретения стереоизомер формулы I.b.1 имеет структуру фор-

мулы I.b.1.vi



#### I.b.1.vi

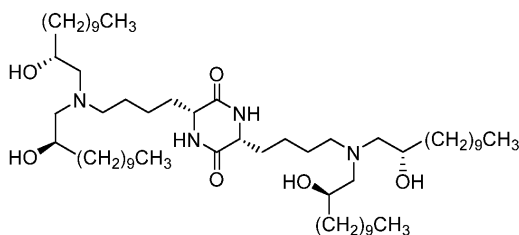
В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.b.1 в композиции составляют химические соединения формулы I.b.1.i. В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.b.1 в композиции составляют химические соединения формулы I.b.1.ii. В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.b.1 в композиции составляют химические соединения формулы I.b.1.iii. В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.b.1 в композиции составляют химические соединения формулы I.b.1.iv. В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.b.1 в композиции составляют химические соединения формулы I.b.1.v. В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.b.1 в композиции составляют химические соединения формулы I.b.1.vi.

В некоторых вариантах реализации изобретения первая формула представляет собой формулу I.b.2. В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше первого порогового значения общего количества химических соединений формулы I в композиции составляют химические соединения формулы I.b.2 и не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.b.2 в композиции составляют химические соединения того же стереоизомера формулы I.b.2.

В некоторых вариантах реализации изобретения стереоизомер формулы I.b.2 имеет структуру формулы I.b.2.i (т.е. R4-RR-cKK-E12).

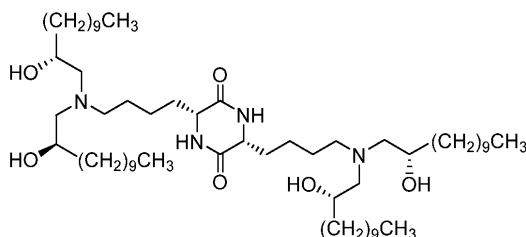
В некоторых вариантах реализации изобретения стереоизомер формулы I.b.2 имеет структуру формулы I.b.2.ii (т.е. S4-RR-cKK-E12).

В некоторых вариантах реализации изобретения стереоизомер формулы I.b.2 имеет структуру формулы I.b.2.iii



#### I.b.2.iii

В некоторых вариантах реализации изобретения стереоизомер формулы I.b.2 имеет структуру формулы I.b.2.iv



#### I.b.2.iv

В некоторых вариантах реализации изобретения стереоизомер формулы I.b.2 имеет структуру формулы I.b.2.v

CCCCC[C@H](O)CN(CCCCNC1=NC(=O)NC(=O)N1CCCCN(CCCO)CC(C)O)CC(C)O

- 18 -

В некоторых вариантах реализации изобретения первая формула представляет собой формулу I.f. В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше первого порогового значения общего количества химических соединений формулы I в композиции составляют химические соединения формулы I.f и не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.f в композиции составляют химические соединения того же стереоизомера формулы I.f. В некоторых вариантах реализации изобретения стереоизомер формулы I.f имеет структуру формулы I.a.vii. В некоторых вариантах реализации изобретения стереоизомер формулы I.f имеет структуру формулы I.a.ix. В некоторых вариантах реализации изобретения стереоизомер формулы I.f имеет структуру формулы I.b.1.vi. В некоторых вариантах реализации изобретения стереоизомер формулы I.f имеет структуру формулы I.b.2.vi. В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.f в композиции составляют химические соединения формулы I.a.iii. В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.f в композиции составляют химические соединения формулы I.a.ix. В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.f в композиции составляют химические соединения формулы I.b.1.vi. В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.f в композиции составляют химические соединения формулы I.b.2.vi.

В некоторых вариантах реализации изобретения первая формула представляет собой формулу I.h. В некоторых вариантах реализации изобретения не меньше первого порогового значения общего количества химических соединений формулы I в композиции составляют химические соединения формулы I.h и не меньше второго порогового значения общего количества химических соединений формулы I.h в композиции составляют химические соединения того же стереоизомера формулы I.h. В некоторых вариантах

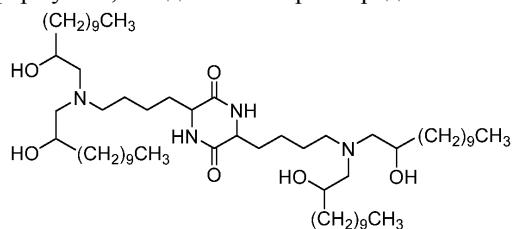




третье пороговое значение составляет 90 мас./мас.%. В некоторых вариантах реализации изобретения  
 третье пороговое значение составляет 95 мас./мас.%. В некоторых вариантах реализации изобретения  
 третье пороговое значение составляет 96 мас./мас.%. В некоторых вариантах реализации изобретения  
 третье пороговое значение составляет 97 мас./мас.%. В некоторых вариантах реализации изобретения  
 третье пороговое значение составляет 98 мас./мас.%.  
 В некоторых вариантах реализации изобретения

В некоторых вариантах реализации изобретения третье пороговое значение составляет 99 мас./мас. %.

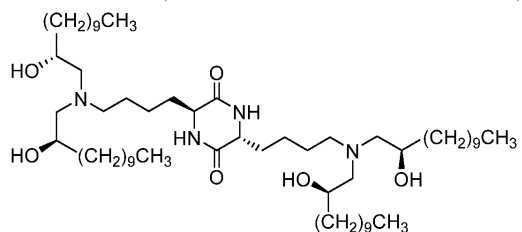
В некоторых вариантах реализации изобретение относится к композиции, содержащей одно или более химических соединений формулы I, каждое из которых представляет собой соединение формулы I



# I

его фармацевтически приемлемую соль, его сольват или сольват его фармацевтически приемлемой соли.

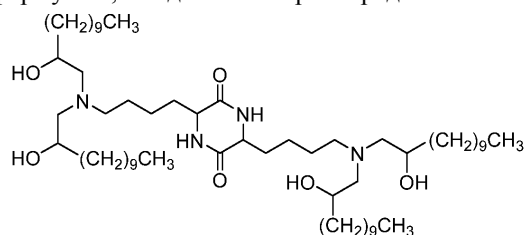
композиции, отличающейся тем, что больше третьего порогового значения общего количества химических соединений формулы I в композиции составляют химические соединения формулы I.a.i



**I.a.i** (то есть R4-SR-cKK-E12)

при этом третье пороговое значение составляет 50%.

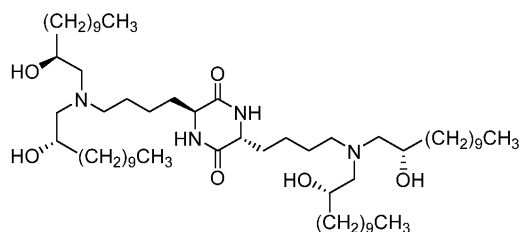
В некоторых вариантах реализации изобретение относится к композиции, содержащей одно или более химических соединений формулы I, каждое из которых представляет собой соединение формулы I



**I**

его фармацевтически приемлемую соль, его сольват или сольват его фармацевтически приемлемой соли,

композиции, отличающейся тем, что больше третьего порогового значения общего количества химических соединений формулы I в композиции составляют химические соединения формулы I.a.ii

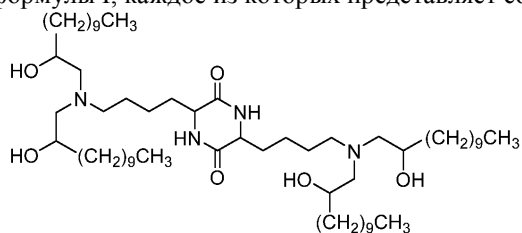


**I.a.ii** (*мо есмь S4-SR-cKK-E12*)

при этом третье пороговое значение составляет 50%.

В некоторых вариантах реализации изобретение относится к композиции, содержащей одно или бо-

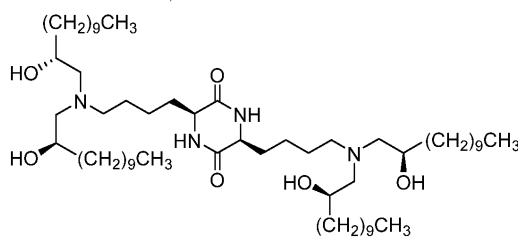
лее химических соединений формулы I, каждое из которых представляет собой соединение формулы I



I

его фармацевтически приемлемую соль, его сольват или сольват его фармацевтически приемлемой соли,

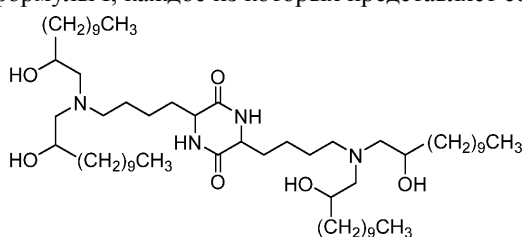
композиции, отличающейся тем, что больше третьего порогового значения общего количества химических соединений формулы I в композиции составляют химические соединения формулы I.b.1.i



I.b.1.i (то есть R4-SS-cKK-E12)

при этом третье пороговое значение составляет 50%.

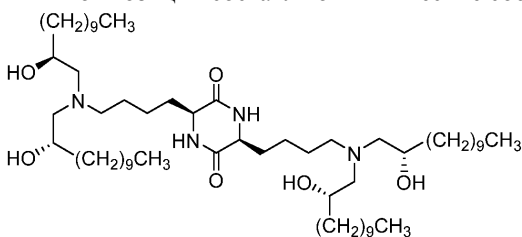
В некоторых вариантах реализации изобретение относится к композиции, содержащей одно или более химических соединений формулы I, каждое из которых представляет собой соединение формулы I



I

его фармацевтически приемлемую соль, его сольват или сольват его фармацевтически приемлемой соли,

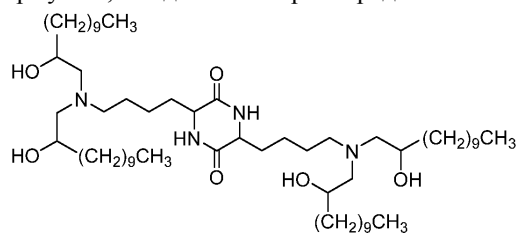
композиции, отличающейся тем, что больше третьего порогового значения общего количества химических соединений формулы I в композиции составляют химические соединения формулы I.b.1.ii



I.b.1.ii (то есть S4-SS-cKK-E12)

при этом третье пороговое значение составляет 50%.

В некоторых вариантах реализации изобретение относится к композиции, содержащей одно или более химических соединений формулы I, каждое из которых представляет собой соединение формулы I

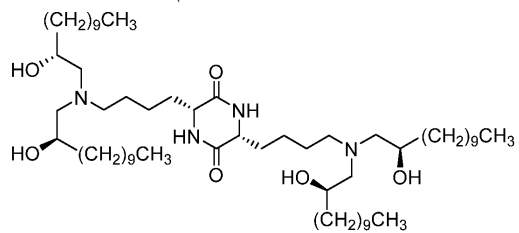


I



его фармацевтически приемлемую соль, его сольват или сольват его фармацевтически приемлемой соли,

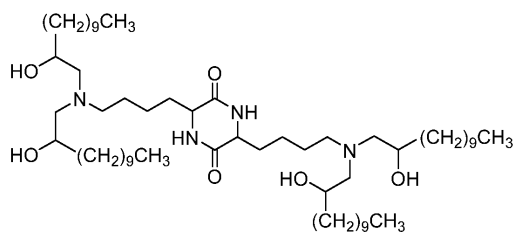
композиции, отличающейся тем, что больше третьего порогового значения общего количества химических соединений формулы I в композиции составляют химические соединения формулы I.b.2.i



**I.b.2.i** (то есть R4-RR-cKK-E12)

при этом третье пороговое значение составляет 50%.

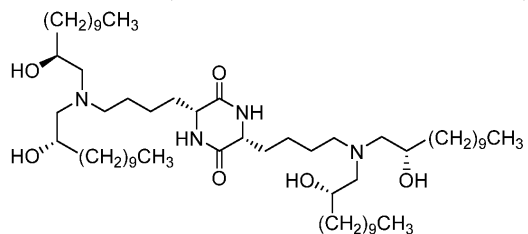
В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к композиции, содержащей одно или более химических соединений формулы I, каждое из которых представляет собой соединение формулы I



**I**

его фармацевтически приемлемую соль, его сольват или сольват его фармацевтически приемлемой соли,

композиции, отличающейся тем, что больше третьего порогового значения общего количества химических соединений формулы I в композиции составляют химические соединения формулы I.b.2.ii



**I.b.2.ii** (то есть S4-RR-cKK-E12)

при этом третье пороговое значение составляет 50%.

В некоторых вариантах реализации изобретения второе пороговое значение составляет 50, 60, 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%. В некоторых вариантах реализации изобретения второе пороговое значение составляет 50%. В некоторых вариантах реализации изобретения второе пороговое значение составляет 70%. В некоторых вариантах реализации изобретения второе пороговое значение составляет 80%. В некоторых вариантах реализации изобретения второе пороговое значение составляет 95%.

Липосомы для доставки средств, таких как мРНК.

Помимо всего прочего, изобретение относится к композиции, содержащей липидное соединение, описанное в данном документе, для доставки терапевтических средств. В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаемая композиция представляет собой наночастицу на основе липидов, такую как липосома. При использовании по тексту данного документа термин "липосома" относится к любой ламеллярной, мультисамеллярной везикуле или везикуле твердой липидной наночастицы. Как правило, липосома при использовании по тексту данного документа может быть получена посредством смешивания одного или более липидов или посредством смешивания одного или более липидов и полимера (полимеров). Таким образом, термин "липосома" при использовании по тексту данного документа охватывает наночастицы как на основе липида, так и на основе полимера. В частности, липосома по данному изобретению содержит липидное соединение, описанное в данном документе, в качестве компонента катионного липида. В качестве неограничивающего примера липосома по данному изобретению содержит композицию, содержащую одно или более химических соединений формулы I. Подходящая липосома может также содержать второй или дополнительные катионные липиды, вспомогательные липиды

(например, некатионные липиды и/или липиды на основе холестерина), ПЭГ-модифицированные липиды и/или полимеры.

В некоторых вариантах реализации изобретения катионный липид (липиды) (например, композиция, содержащая одно или более химических соединений формулы I) составляет (составляют) около 30-50% (например, около 30-45%, около 30-40%, около 35-50%, около 35-45% или около 35-40%) липосомы в молярном соотношении. В некоторых вариантах реализации изобретения катионный липид (например, композиция, содержащая одно или более химических соединений формулы I) составляет около 30%, около 35%, около 40%, около 45% или около 50% липосомы в молярном соотношении. В некоторых вариантах реализации изобретения липосома содержит второй липид или дополнительные катионные липиды.

Второй или дополнительные катионные липиды.

В некоторых вариантах реализации изобретения липосомы могут содержать второй или дополнительный катионный липид. При использовании по тексту данного документа словосочетание "катионный липид" относится к любому из ряда видов липидов, которые имеют суммарный положительный заряд при выбранном pH, таком как физиологический pH. Некоторые катионные липиды были описаны в литературе, многие из них являются коммерчески доступными. В частности, подходящие катионные липиды для применения в композициях и способах по данному изобретению включают липиды, описанные в международных патентных публикациях WO 2010/053572 (и, в частности, C12-200, описанные в пункте [00225]), WO 2012/170930 и WO 2013063468, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах реализации изобретения в композициях и способах по данному изобретению применяются липидные наночастицы, содержащие ионизируемый катионный липид, описанный в международной заявке на патент № PCT/US2013/034602, поданной 29 марта 2013 года, публикации № WO 2013/149140 (включенной в данный документ посредством ссылки), такие как, например, (15Z,18Z)-N,N-диметил-6-(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)тетракоза-15,18-диен-1-амин (HGT5000), (15Z,18Z)-N,N-диметил-6-((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)тетракоза-4,15,18-триен-1-амин (HGT5001) и (15Z,18Z)-N,N-диметил-6-((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)тетракоза-5,15,18-триен-1-амин (HGT5002).

В некоторых вариантах реализации изобретения применяется второй или дополнительный катионный липид N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмонийхлорид или "DOTMA". (Feigner et al. (Proc. Nat'l Acad. Sci. 84, 7413 (1987); патент США № 4897355). DOTMA может быть составлен отдельно или в комбинации с нейтральным липидом, диолеилфосфатидилэтаноламином или "DOPE", или другими катионными или некатионными липидами в липосомальном средстве переноса или липидной наночастице, и такие липосомы могут применяться для улучшения доставки нуклеиновых кислот в клетки-мишени. Другие подходящие катионные липиды включают, например, 5-карбоксиспермилглицидиоктадециламид или "DOGS", 2,3-диолеилокси-N-[2(сперминкарбоксамидо)этил]-N,N-диметил-1-пропанаммоний или "DOSPA" (Behr et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. 86, 6982 (1989); патент США № 5171678; патент США № 5334761), 1,2-диолеил-3-диметиламмоний-пропан или "DODAP", 1,2-диолеил-3-триметиламмонийпропан или "DOTAP". Дополнительные типовые катионные липиды также включают 1,2-дистеарилокси-N,N-диметил-3-аминопропан или "DSDMA", 1,2-диолеилокси-N,N-диметил-3-аминопропан или "DODMA", 1,2-дилинолеилокси-N,N-диметил-3-аминопропан или "DLinDMA", 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметил-3-аминопропан или "DLinDMA", N-диолеил-N,N-диметиламмонийхлорид или "DODAC", N,N-дистеарил-N,N-диметиламмонийбромид или "DDAB", N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксиэтиламмонийбромид или "DMRIE", 3-диметиламино-2-(холест-5-ен-3-бета-оксибутан-4-окси)-1-(цис,цис-9,12-октадекадиенокси)пропан или "CLinDMA", 2-[5'-(холест-5-ен-3-бета-окси)-3'-оксапентокси]-3-диметил-1-(цис,цис-9',1'-2'-октадекадиенокси)-пропан или "CpLinDMA", N,N-диметил-3,4-диолеилоксибензиламин или "DMOBA", 1,2-N,N'-диолеилкарбамил-3-диметиламинопропан или "DOcarbDAP", 2,3-дилинолеилокси-N,N-диметилпропиламин или "DLinDAP", 1,2-N,N'-дилинолеилкарбамил-3-диметиламинопропан или "DLincarbDAP", 1,2-дилинолеилкарбамил-3-диметиламинопропан или "DLinCDAP", 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан или "DLin- -DMA", 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан или "DLin-K-ХТС2-DMA" и 2-(2,2-ди-((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)-1,3-диоксолан-4-ил)-N,N-диметилэтанамин (DLin-KC2-DMA)) (см. WO 2010/042877; Semple et al., Nature Biotech. 28: 172-176 (2010)), или их смеси (Heyes J. et al., J. Controlled Release 107: 276-287 (2005); Morrissey D.V. et al., Nat. Biotechnol. 23(8): 1003-1007 (2005); публикация PCT WO 2005/121348 A1). В некоторых вариантах реализации изобретения один или более катионных липидов содержат по меньшей мере один из следующих фрагментов: имидазол, диалкиламино или гуанидиний.

В некоторых вариантах реализации изобретения второй или дополнительный катионный липид может быть выбран из ХТС (2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан), MC3 (((6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат), ALNY-100((3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин)), NC98-5 (4,7,13-трис(3-оксо-3-(ундециламино)пропил)-N1,N16-диундецил-4,7,10,13-тетраазагексадекан-1,16-диамид), DODAP (1,2-диолеил-3-диметиламмонийпропан), HGT4003 (WO 2012/170889, принципы которой включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме), ICE (WO 2011/068810, принципы

которой включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме), HGT5000 (международная патентная публикация WO 2013/149140, принципы которой включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме) или HGT5001 (цис или транс) (WO 2013/149140), аминоспиртовые липидоиды, такие как описанные в WO 2010/053572, DOTAP (1,2-диолеил-3-триметиламмонийпропан), DOTMA (1,2-ди-О-октадеценил-3-триметиламмонийпропан), DLinDMA (Heyes J.; Palmer L.; Bremner K.; MacLachlan, I. "Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids" J. Contr. Rel. 2005, 107, 276-287), DLin-KC2-DMA (Semple S.C. et al., "Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery" Nature Biotech. 2010, 28, 172-176), C12-200 (Love K.T. et al., "Lipid-like materials for low-dose in vivo gene silencing" PNAS 2010, 107, 1864-1869).

Некатионные/вспомогательные липиды.

В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаемые липосомы содержат один или более некатионных ("вспомогательных") липидов. При использовании по тексту данного документа словосочетание "некатионный липид" относится к любому нейтральному, цвиттерионному или анионному липиду. При использовании по тексту данного документа, словосочетание "анионный липид" относится к любому из ряда видов липидов, которые несут суммарный отрицательный заряд при выбранном pH, таком как физиологический pH. Некатионные липиды включают, не ограничиваясь ими, дистеароилфосфатидилхоллин (DSPC), диолеоилфосфатидилхоллин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхоллин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилхоллин (POPC), пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламин (POPE), диолеоилфосфатидилэтаноламин 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоил фосфатидил этаноламин (DPPE), димиристоилфосфоэтаноламин (DMPE), дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE), 16-О-монометил PE, 16-О-диметил PE, 18-1-транс PE, 1-стеароил-2-олеоилфосфатидилэтаноламин (SOPE) или их смесь.

В некоторых вариантах реализации такие некатионные липиды могут применяться по отдельности, но предпочтительно их применяют в комбинации с другими вспомогательными веществами, например катионными липидами. В некоторых вариантах реализации изобретения некатионный липид может содержаться в липосоме в молярном соотношении, составляющем от около 5% до около 90% или от около 10% до около 70%, от общего содержания липидов. В некоторых вариантах реализации изобретения некатионный липид представляет собой нейтральный липид, т.е. липид, который не несет суммарный заряд в условиях, при которых получают и/или вводят композицию. В некоторых вариантах реализации изобретения процентное содержание некатионного липида в липосоме может составлять более 5%, более 10%, более 20%, более 30% или более 40%.

Липиды на основе холестерина.

В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаемые липосомы содержат один или более липидов на основе холестерина. Например, подходящие катионные липиды на основе холестерина включают, например, DC-Choi (N,N-диметил-N-этилкарбоксамидохолестерин), 1,4-бис(3-N-олеиламинопропил)пиперазин (Gao et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 179, 280 (1991); Wolf et al., BioTechniques 23, 139 (1997); патент США № 5744335) или ICE. В некоторых вариантах реализации изобретения липид на основе холестерина может содержаться в липосоме в молярном соотношении, составляющем от около 2% до около 30% или от около 5% до около 20%, от общего содержания липидов. В некоторых вариантах реализации изобретения процентное содержание липида на основе холестерина в липидной наночастице может составлять более 5%, 10%, более 20%, более 30% или более 40%.

ПЭГилированные липиды.

В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаемые липосомы содержат один или более ПЭГилированных липидов. Например, данным изобретением также предполагается применение полиэтиленгликоль (ПЭГ)-модифицированных фосфолипидов и дериватизированных липидов, таких как дериватизированные церамиды (ПЭГ-CER), в том числе N-октаноил-сфингозин-1-[сукцинил(метоксиполиэтиленгликоль)-2000] (C8 ПЭГ-2000 церамид), в комбинации с одним или более катионными липидами и, в некоторых вариантах реализации, с другими липидами, составляющими липосому. Рассматриваемые ПЭГ-модифицированные липиды содержат, без ограничения ею, полиэтиленгликолевую цепь длиной до 5 кДа, ковалентно связанную с липидом алкильной цепью (цепями) длиной C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>. В некоторых вариантах реализации изобретения ПЭГ-модифицированный или ПЭГилированный липид представляет собой ПЭГилированный холестерин или ПЭГ-2К. Добавление таких компонентов может предотвращать агрегацию комплекса, а также может обеспечивать возможность увеличения продолжительности циркуляции в крови и увеличения доставки композиции на основе липидов и нуклеиновых кислот в клетку-мишень (Klibanov et al. (1990) FEBS Letters, 268 (1): 235-237), или они могут быть выбраны для быстрого обмена из композиции in vivo (см. патент США № 5885613).

В некоторых вариантах реализации особенно применимыми обменными липидами являются ПЭГ-церамиды, имеющие короткие ацильные цепи (например, C<sub>14</sub> или C<sub>18</sub>). ПЭГ-модифицированный фосфолипид и дериватизированные липиды по данному изобретению могут содержаться в липосоме в молярном соотношении, составляющем от около 0% до около 15%, от около 0,5% до около 15%, от около 1% до около 15%, от около 4% до около 10% или около 2%, от общего содержания липидов.

Согласно различным вариантам реализации выбор второго или дополнительных катионных липидов, некатионных липидов и/или ПЭГ-модифицированных липидов, которые содержат липидную наночастицу, а также относительное молярное соотношение таких липидов друг к другу, основан на свойствах выбранного липида (липидов), природе предполагаемых клеток-мишеней, свойствах мРНК, подлежащей доставке. Дополнительные факторы включают, например, насыщенность алкильной цепи, а также размер, заряд, рН, рКа, фузогенность и токсичность выбранного липида (липидов). Таким образом, молярные соотношения можно регулировать соответствующим образом. В некоторых вариантах реализации изобретения процентное содержание ПЭГ-модифицированного липида в липосоме может составлять более 1%, более 2%, более 5%, более 10% или более 15%.

#### Полимеры.

В некоторых вариантах реализации изобретения подходящая липосома по данному изобретению дополнительно содержит полимер, в комбинации с одним или более описанными катионными липидами и, в некоторых вариантах реализации, другими носителями, в том числе различными липидами, описанными в данном документе. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения липосомальные средства доставки, при использовании по тексту данного документа, также охватывают содержащие полимер наночастицы. Подходящие полимеры могут включать, например, полиакрилаты, полиалкил-ноакрилаты, полилактид, полилактид-полигликолидные сополимеры, поликапролактоны, декстран, альбумин, желатин, альгинат, коллаген, хитозан, циклодекстрины, протамин, ПЭГилированный протамин, PLL, ПЭГилированный PLL и полиэтиленмин (PEI). При наличии PEI, он может представлять собой разветвленный PEI с молекулярной массой в диапазоне от 10 до 40 кДа, например разветвленный PEI 25 кДа (Sigma № 408727).

#### Терапевтические средства.

Настоящее изобретение может применяться для доставки любых терапевтических средств. В частности, любые терапевтические средства, подлежащие введению субъекту, могут доставляться с помощью комплексов, пикочастиц, наночастиц, микрочастиц, мицелл или липосом, описанных в данном документе. Данное средство может представлять собой органическую молекулу (например, терапевтическое средство, лекарственное средство), неорганическую молекулу, нуклеиновую кислоту, белок, аминокислоту, пептид, полипептид, полинуклеотид, средство специфического воздействия, меченную изотопами органическую или неорганическую молекулу, вакцину, иммунологическое средство и т.д. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения средство, подлежащее доставке, может представлять собой смесь средств.

В некоторых вариантах реализации изобретения терапевтические средства представляют собой органические молекулы с фармацевтической активностью, например лекарственное средство. В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственное средство представляет собой антибиотик, противовирусное средство, анестезирующее средство, стероидное средство, противовоспалительное средство, противоопухолевое средство, противораковое средство, антиген, вакцину, антитело, противозастойное, антигипертензивное, седативное, противозачаточное средство, прогестагенное средство, антихолинергическое, болеутоляющее, антидепрессивное, антипсихотическое, I3-адреноблокирующее средство, мочегонное, сердечно-сосудистое активное средство, сосудистый препарат, нестероидное противовоспалительное средство, питательное вещество и т.д.

Диагностические средства включают газы; металлы; коммерчески доступные радиофармацевтические средства, применяемые в позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), компьютерной томографии (КТ), однофотонной эмиссионной компьютерной томографии, рентгене, рентгеноскопии и магнитно-резонансном исследовании (МРИ); и контрастные вещества. Примеры подходящих веществ для применения в качестве контрастных веществ в МРИ включают хелаты гадолиния, а также железо, магний, марганец, медь и хром. Примеры веществ, применимых для КТ и рентгенологического исследования, включают вещества на основе йода.

Терапевтические и профилактические средства включают, не ограничиваясь ими, антибиотики, пищевые добавки и вакцины. Вакцины могут содержать выделенные белки или пептиды, инактивированные организмы и вирусы, мертвые организмы и вирусы, генетически измененные организмы или вирусы, а также клеточные экстракты.

#### Полинуклеотиды.

Изобретение может применяться для доставки любого полинуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид представляет собой интерферирующую РНК (иРНК). Более подробно феномен иРНК обсуждается, например, в следующих ссылочных материалах: Elbashir et al., 2001, *Genes Dev.*, 15:188; Fire et al., 1998, *Nature*, 391:806; Tabara et al., 1999, *Cell*, 99:123; Hammond et al., *Nature*, 2000, 404:293; Zamore et al., 2000, *Cell*, 101:25; Chakraborty, 2007, *Curr. Drug Targets*, 8:469; и Morris and Rossi, 2006, *Gene Ther.*, 13:553. В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид представляет собой дцРНК (двухцепочечную РНК). В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид представляет собой киРНК (короткую интерферирующую РНК). В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид представляет собой кшРНК (короткую шпилечную РНК). В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид представляет собой миРНК (микроРНК).

МикроРНК (миРНК) представляют собой геномно кодируемые некодирующие РНК, составляющие около 21-23 нуклеотидов в длину, которые помогают регулировать экспрессию генов, в частности, в процессе развития. См., например, Bartel, 2004, *Cell*, 116:281; Novina and Sharp, 2004, *Nature*, 430:161; и публикацию патента США 2005/0059005; также рассматриваются у Wang and Li, 2007, *Front. Biosci.*, 12:3975; и Zhao, 2007, *Trends Biochem. Sci.*, 32:189. В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид представляет собой антисмысловую РНК.

В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид может быть представлен в виде антисмыслового средства или интерферирующей РНК (иРНК). См., например, Fire et al., *Nature* 391:806-811, 1998. Антисмысловая терапия предусматривает включение, например, введение или обеспечение *in situ* одно- или двухцепочечных олигонуклеотидов или их производных, которые специфически гибридизуются, например, связываются, в условиях клетки, с клеточной мРНК и/или геномной ДНК, или их мутантами, с возможностью ингибирования экспрессии кодируемого белка, например, посредством ингибирования транскрипции и/или трансляции. См., например, Crooke "Molecular mechanisms of action of antisense drugs" *Biochim. Biophys. Acta* 1489(1):31-44, 1999; Crooke "Evaluating the mechanism of action of antiproliferative antisense drugs" *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 10(2): 123-126, discussion 127, 2000; *Methods in Enzymology* volumes 313-314, 1999. Связывание может осуществляться обычной комплементарностью пар оснований или, например, в случае связывания с двуспиральными ДНК, посредством специфических взаимодействий в большой бороздке двойной спирали (т.е. образование тройной спирали). См., например, Chan et al., *J. Mol. Med.* 75(4):267-282, 1997.

В некоторых вариантах реализации изобретения дцРНК, киРНК, кшРНК, миРНК, антисмысловую РНК и/или иРНК можно сконструировать и/или смоделировать с помощью одного или более из множества доступных алгоритмов. В качестве нескольких примеров для конструирования и/или моделирования полинуклеотидов могут использоваться следующие ресурсы: алгоритмов интернет-ресурса Alnylum, интернет-ресурса Dharmason, интернет-ресурса OligoEngine, интернет-ресурса Molecula, интернет-ресурса Ambion, интернет-ресурса BioPredsi, интернет-ресурса RNAi Web, интернет-ресурса Chang Bioscience, интернет-ресурса Invitrogen, интернет-ресурса LentiWeb, интернет-ресурса GenScript, интернет-ресурса Protocol; Reynolds et al., 2004, *Nat. Biotechnol.*, 22:326; Naito et al., 2006, *Nucleic Acids Res.*, 34:W448; Li et al., 2007, *RNA*, 13:1765; Yiu et al., 2005, *Bioinformatics*, 21:144; и Jia et al., 2006, *BMC Bioinformatics*, 7: 271.

Полинуклеотиды могут иметь любой размер или последовательность, и они могут быть одно- или двухцепочечными. В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид составляет более 100 пар оснований в длину. В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид составляет более 1000 пар оснований в длину и может составлять более 10000 пар оснований в длину. Полинуклеотид может быть получен любыми способами, известными в данной области техники. В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид был сконструирован с помощью рекомбинантных методов. См., например, Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989). Полинуклеотид также может быть получен из природных источников и очищен от загрязняющих компонентов, как правило, присутствующих в природе. Полинуклеотид также может быть получен путем химического синтеза в лаборатории. В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид синтезируют с использованием стандартной твердофазной химии.

Полинуклеотид может быть модифицирован с помощью химических или биологических средств. В некоторых вариантах реализации изобретения эти модификации приводят к повышению устойчивости полинуклеотида. Модификации включают метилирование, фосфорилирование, блокирование концевых групп и т.д.

#### мРНК.

Изобретение может применяться для доставки любой мРНК. Как правило, мРНК рассматривается как тип РНК, который переносит информацию от ДНК к рибосоме. Как правило, период существования мРНК является очень коротким и включает процессинг и трансляцию с последующей деградацией. Как правило, в эукариотических организмах процессинг мРНК включает добавление "кэпа" в 5'-концевой (5') области и "хвоста" в 3'-концевой (3') области. Типовой кэп представляет собой 7-метилгуанозиновый кэп, который является гуанозином, связанным 5'-5'-трифосфатной связью с первым транскрибируемым нуклеотидом. Наличие кэпа играет важную роль в обеспечении устойчивости к действию нуклеаз, содержащихся в большинстве эукариотических клеток. Как правило, хвост образовывается в результате полиаденилирования, посредством которого полиадениловый фрагмент добавляется к 3'-концу молекулы мРНК. Наличие этого "хвоста" служит для защиты мРНК от экзонуклеазного расщепления. Как правило, матричная РНК транслируется рибосомами в последовательность аминокислот, которые составляют белок.

Предполагается, что любая мРНК, способная транслироваться в один или более пептидов (например, белки) или пептидных фрагментов, входит в пределы объема данного изобретения. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК кодирует один или более природных пептидов. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК кодирует один или более модифицированных или не природных пептидов.

В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК кодирует внутриклеточный белок. В некото-

рых вариантах реализации изобретения мРНК кодирует цитозольный белок. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК кодирует белок, ассоциированный с актиновым цитоскелетом. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК кодирует белок, ассоциированный с плазматической мембраной. В некоторых конкретных вариантах реализации изобретения мРНК кодирует трансмембранный белок. В некоторых конкретных вариантах реализации изобретения мРНК кодирует белок ионного канала. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК кодирует перинуклеарный (околоядерный) белок. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК кодирует ядерный белок. В некоторых конкретных вариантах реализации изобретения мРНК кодирует фактор транскрипции. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК кодирует шаперон. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК кодирует внутриклеточный фермент (например, мРНК, кодирующая фермент, ассоциированный с метаболическими нарушениями цикла мочевины или лизосомными болезнями накопления). В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК кодирует белок, участвующий в клеточном метаболизме, репарации ДНК, транскрипции и/или трансляции. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК кодирует внеклеточный белок. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК кодирует белок, ассоциированный с внеклеточным матриксом. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК кодирует секретируемый белок. В конкретных вариантах реализации изобретения мРНК, применяемая в композиции и способах по данному изобретению, может применяться для экспрессии функциональных белков или ферментов, которые экскретируются или секретируются одной или более клетками-мишенями в окружающей внеклеточной жидкости (например, мРНК, кодирующая гормоны и/или нейромедиаторы).

#### Синтез мРНК.

мРНК по данному изобретению могут быть синтезированы любым из множества известных методов. Например, мРНК по данному изобретению могут быть синтезированы посредством транскрипции *in vitro* (IVT). Вкратце, IVT, как правило, выполняется с помощью линейной или кольцевой ДНК-матрицы, содержащей промотор, пул рибонуклеотидтрифосфатов, буферную систему, которая может содержать ДТТ и ионы магния, а также соответствующую РНК-полимеразу (например, Т3, Т7 или SP6 РНК-полимеразу), ДНКазу I, пирофосфатазу и/или ингибитор РНКазы. Точные условия будут зависеть от конкретного применения.

В некоторых вариантах реализации изобретения для получения мРНК по данному изобретению ДНК-матрицу транскрибируют *in vitro*. Подходящая ДНК-матрица, как правило, имеет промотор, например промотор Т3, Т7 или SP6, для транскрипции *in vitro*, за которым следует желаемая нуклеотидная последовательность для желаемой мРНК и сигнал терминации.

Желаемая последовательность (последовательности) мРНК по данному изобретению может быть определена и включена в ДНК-матрицу с помощью стандартных методов. Например, начиная с желаемой аминокислотной последовательности (например, последовательности ферментов), осуществляется фактическая обратная трансляция на основе вырожденного генетического кода. Затем могут применяться алгоритмы оптимизации для выбора подходящих кодонов. Как правило, с одной стороны, содержание G/C может быть оптимизировано для достижения максимально возможного уровня G/C, с другой стороны, следует учитывать оптимальную частоту тРНК, соответствующую частоте использования кодона. Оптимизированная последовательность РНК может создаваться и отображаться, например, с помощью соответствующего устройства отображения, и сравниваться с исходной (дикого типа) последовательностью. Вторичная структура также может быть проанализирована с целью определения стабилизирующих и дестабилизирующих свойств или, соответственно, областей РНК.

#### Модифицированная мРНК.

В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК по данному изобретению может быть синтезирована в виде немодифицированной или модифицированной мРНК. Как правило, мРНК модифицируют для повышения устойчивости. Модификации мРНК могут включать, например, модификации нуклеотидов РНК. Таким образом, модифицированная мРНК по данному изобретению может содержать, например, модификации остова, модификации сахаров или модификации оснований. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК могут быть синтезированы из природных нуклеотидов и/или нуклеотидных аналогов (модифицированных нуклеотидов), в том числе, не ограничиваясь ими, пуринов (аденин (А), гуанин (G)) или пиримидинов (тимин (Т), цитозин (С), урацил (U)), а также модифицированных аналогов нуклеотидов или производных пуринов и пиримидинов, таких как, например, 1-метиладенин, 2-метиладенин, 2-метилтио-N-6-изопентениладенин, N6-метиладенин, N6-изопентениладенин, 2-тиоцитозин, 3-метилцитозин, 4-ацетилцитозин, 5-метилцитозин, 2,6-диаминопурин, 1-метилгуанин, 2-метилгуанин, 2,2-диметилгуанин, 7-метилгуанин, инозин, 1-метиинозин, псевдоурацил (5-урацил), дигидроурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоурацил, 5-(карбоксигидроксиметил)урацил, 5-фторурацил, 5-бромурасил, 5-карбоксиметиламинометилурацил, 5-метил-2-тиоурацил, 5-метилурацил, метиловый эфир N-урацил-5-оксиуксусной кислоты, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, 5'-метоксикарбонилметилурацил, 5-метоксиурацил, метиловый эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, урацил-5-оксиуксусная кислота (v), 1-метилпсевдоурацил, квеозин, β-D-маннозилквеозин, вибутозин, а также фосфороамидаты, фосфоротиоа-

ты, пептидные нуклеотиды, метилфосфонаты, 7-дезагуанозин, 5-метилцитозин и инозин. Получение таких аналогов известно специалисту в данной области техники, например, из патента США № 4373071, патента США № 4401796, патента США № 4415732, патента США № 4458066, патента США № 4500707, патента США № 4668777, патента США № 4973679, патента США № 5047524, патента США № 5132418, патента США № 5153319, патентов США № 5262530 и 5700642, описания которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК (например, фермент-кодирующие мРНК) могут содержать модификации остова РНК. Как правило, модификация остова представляет собой модификацию, в которой фосфаты остова нуклеотидов, содержащиеся в РНК, являются химически модифицированными. Типовые модификации остова, как правило, включают, не ограничиваясь ими, модификации из группы, состоящей из метилфосфонатов, метилфосфорамидатов, фосфорамидатов, фосфотиоатов (например, цитидин 5'-О-(1-тиофосфат)), боранофосфатов, положительно заряженных гуанидиневых групп и т.д., а значит посредством замены фосфодиэфирной связи другими анионными, катионными или нейтральными группами.

В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК (например, фермент-кодирующие мРНК) могут содержать модификации сахаров. Типичная модификация сахаров представляет собой химическую модификацию сахара, содержащегося в нуклеотидах, в том числе, не ограничиваясь ими, модификации сахаров, выбранные из группы, состоящей из 2'-дезоксид-2'-фтор-олигорибонуклеотида (2'-фтор-2'-дезоксидцитидин-5'-трифосфат, 2'-фтор-2'-дезоксидуридин-5'-трифосфат), 2'-дезоксид-2'-диамин-олигорибонуклеотида (2'-амино-2'-дезоксидцитидин-5'-трифосфат, 2'-амино-2'-дезоксидуридин-5'-трифосфат), 2'-О-алкилолигорибонуклеотида, 2'-дезоксид-2'-С-алкилолигорибонуклеотида (2'-О-метилцитидин-5'-трифосфат, 2'-метилуридин-5'-трифосфат), 2'-С-алкилолигорибонуклеотида и их изомеров (2'-арацитидин-5'-трифосфат, 2'-арауридин-5'-трифосфат) или азидотрифосфатов (2'-азидо-2'-дезоксидцитидин-5'-трифосфат, 2'-азидо-2'-дезоксидуридин-5'-трифосфат).

В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК (например, фермент-кодирующие мРНК) могут содержать модификации оснований нуклеотидов (модификации оснований). Модифицированный нуклеотид, который содержит модификацию основания, также называется нуклеотидом с модифицированным основанием. Примеры таких нуклеотидов с модифицированным основанием включают, не ограничиваясь ими, 2-амино-6-хлорпуринрибозид-5'-трифосфат, 2-аминоаденозин-5'-трифосфат, 2-тиоцитидин-5'-трифосфат, 2-тиоуридин-5'-трифосфат, 4-тиоуридин-5'-трифосфат, 5-аминоаллилцитидин-5'-трифосфат, 5-аминоаллилуридин-5'-трифосфат, 5-бромцитидин-5'-трифосфат, 5-бромуридин-5'-трифосфат, 5-йодцитидин-5'-трифосфат, 5-йодуридин-5'-трифосфат, 5-метилцитидин-5'-трифосфат, 5-метилуридин-5'-трифосфат, 6-азацитидин-5'-трифосфат, 6-азауридин-5'-трифосфат, 6-хлорпуринрибозид-5'-трифосфат, 7-дезааденозин-5'-трифосфат, 7-дезагуанозин-5'-трифосфат, 8-азааденозин-5'-трифосфат, 8-азидоаденозин-5'-трифосфат, бензимидазолрибозид-5'-трифосфат, N1-метиладенозин-5'-трифосфат, N1-метилгуанозин-5'-трифосфат, N6-метиладенозин-5'-трифосфат, Об-метилгуанозин-5'-трифосфат, псевдоуридин-5'-трифосфат, пуромицин-5'-трифосфат или ксантозин-5'-трифосфат.

Кэп-структура.

Как правило, синтез мРНК включает добавление "кэпа" в N-концевой (5') области и "хвоста" в С-концевой (3') области. Наличие кэпа играет важную роль в обеспечении устойчивости к действию нуклеаз, содержащихся в большинстве эукариотических клеток. Наличие "хвоста" служит для защиты мРНК от экзонуклеазного расщепления.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения мРНК (например, фермент-кодирующие мРНК) содержат 5'-кэп-структуру. Добавление 5'-кэпа происходит, как правило, следующим образом: во-первых, концевая фосфатаза РНК удаляет одну из концевых фосфатных групп из 5'-нуклеотида, оставляя два концевых фосфата; затем к концевым фосфатам с помощью гуанилилтрансферазы добавляют гуанозинтрифосфат (ГТФ) с образованием 5'5'-трифосфатной связи; а затем метилируют 7-азот гуанина с помощью метилтрансферазы. Примеры кэп-структур включают, не ограничиваясь ими, m<sup>7</sup>G(5')ppp(5'(A,G(5')ppp(5')A и G(5')ppp(5')G.

В некоторых вариантах реализации изобретения природные кэп-структуры включают 7-метилгуанозин, который связан через трифосфатный мостик с 5'-концом первого транскрибируемого нуклеотида с образованием динуклеотидного кэпа m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')N, где N представляет собой любой нуклеозид. In vivo добавление кэпа происходит под воздействием ферментов. Кэп добавляют в ядро и катализируют с помощью фермента гуанилилтрансферазы. Добавление кэпа к 5'-концевой области РНК происходит сразу же после инициации транскрипции. Концевой нуклеозид, как правило, представляет собой гуанозин и находится в обратной ориентации ко всем другим нуклеотидам, т.е. G(5')ppp(5')GpNpNp.

Обычный кэп для мРНК, образованный посредством транскрипции in vitro, представляет собой m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G, который использовали в качестве динуклеотидного кэпа в транскрипции с участием T7 или SP6 РНК-полимеразы in vitro с получением РНК, содержащих кэп-структуру на своих 5'-концах. Преимущественный способ in vitro синтеза кэпированной мРНК включает применение предварительно сформированного динуклеотида вида m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G ("m<sup>7</sup>GpppG") в качестве инициатора транскрипции.

На настоящий момент обычной формой синтетического динуклеотидного кэпа, используемого в

экспериментах по трансляции *in vitro*, является антиинвертированный аналог кэп-структуры ("ARCA") или модифицированный ARCA, который, как правило, представляет собой модифицированный аналог кэп-структуры, в котором 2'- или 3'-ОН группа замещена на -OCH<sub>3</sub>.

Дополнительные аналоги кэп-структуры включают, не ограничиваясь ими, химические структуры, выбранные из группы, состоящей из m<sup>7</sup>GpppG, m<sup>7</sup>GpppA, m<sup>7</sup>GpppC; неметилированные аналоги кэп-структуры (например, GpppG); диметилированный аналог кэп-структуры (например, m<sup>2,7</sup>GpppG), триметилированный аналог кэп-структуры (например, m<sup>2,2,7</sup>GpppG), диметилированные симметричные аналоги кэп-структуры (например, m<sup>7</sup>Gpppm<sup>7</sup>G) или антиинвертированные аналоги кэп-структуры (например, ARCA; m<sup>7,2</sup>OmeGpppG, m<sup>7,2</sup>dGpppG, m<sup>7,3</sup>OmeGpppG, m<sup>7,3</sup>dGpppG и их тетрафосфатные производные) (см., например, Jemielity J. et al., "Novel "anti-reverse" cap analogs with superior translational properties", RNA, 9: 1108-1122 (2003)).

В некоторых вариантах реализации изобретения подходящий кэп представляет собой 7-метилгуанилат ("m<sup>7</sup>G"), который связан через трифосфатный мостик с 5'-концом первого транскрибируемого нуклеотида с образованием m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')N, где N представляет собой любой нуклеозид. Предпочтительным вариантом реализации кэпа m<sup>7</sup>G, применяемого в вариантах реализации данного изобретения, является m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G.

В некоторых вариантах реализации изобретения кэп представляет собой структуру Кэп0. В структурах Кэп0 отсутствует 2'-О-метильный остаток рибозы, прикрепленный к основаниям 1 и 2. В некоторых вариантах реализации изобретения кэп представляет собой структуру Кэп1. Структуры Кэп1 имеют 2'-О-метильный остаток в основании 2. В некоторых вариантах реализации изобретения кэп представляет собой структуру Кэп2. Структуры Кэп2 имеют 2'-О-метильный остаток, прикрепленный к обоим основаниям 2 и 3.

В данной области техники известно множество аналогов кэп-структуры m<sup>7</sup>G, многие из которых являются коммерчески доступными. Они включают описанный выше m<sup>7</sup>GpppG, а также аналоги кэп-структуры ARCA 3'-OCH<sub>3</sub> и 2'-OCH<sub>3</sub> (Jemielity J. et al., RNA, 9: 1108-1122 (2003)). Дополнительные аналоги кэп-структуры для применения в вариантах реализации данного изобретения включают N7-бензилированные динуклеозидтетрафосфатные аналоги (описанные в публикации Grudzien E. et al., RNA, 10: 1479-1487 (2004)), фосфоротиоатные аналоги кэп-структуры (описанные в публикации Grudzien-Nogalska E., et al., RNA, 13: 1745-1755 (2007)) и аналоги кэп-структуры (в том числе биотинилированные аналоги кэп-структуры), описанные в патентах США № 8093367 и 8304529, которые включены в данный документ посредством ссылки.

#### Хвостовая структура.

Как правило, наличие "хвоста" служит для защиты мРНК от экзонуклеазного расщепления. Поли(А)-хвост, как полагают, стабилизирует природную матричную и синтетическую смысловую РНК. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения длинный поли(А)-хвост может быть добавлен к молекуле мРНК, тем самым делая РНК более устойчивой. Поли(А)-хвосты могут быть добавлены с помощью различных принятых в данной области техники методов. Например, длинные поли(А)-хвосты можно добавлять в синтетическую или транскрибируемую *in vitro* РНК при помощи поли(А)-полимеразы (Yokoe et al., Nature Biotechnology, 1996; 14: 1252-1256). Вектор транскрипции может также кодировать длинные поли(А)-хвосты. Кроме того, поли(А)-хвосты могут быть добавлены посредством транскрипции непосредственно из продуктов ПЦР. Поли(А) также может быть лигирован к 3'-концу смысловой РНК РНК-лигазой (см., например, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1991 edition)).

В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК (например, фермент-кодирующие мРНК) содержат 3'-поли(А)-хвостовую структуру. Как правило, длина поли(А)-хвоста может составлять по меньшей мере около 10, 50, 100, 200, 300, 400 или по меньшей мере 500 нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации изобретения поли(А)-хвост на 3'-конце мРНК, как правило, содержит от около 10 до 300 аденозиновых нуклеотидов (например, от около 10 до 200 аденозиновых нуклеотидов, от около 10 до 150 аденозиновых нуклеотидов, от около 10 до 100 аденозиновых нуклеотидов, от около 20 до 70 аденозиновых нуклеотидов или от около 20 до 60 аденозиновых нуклеотидов). В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК содержат 3'-поли(С)-хвостовую структуру. Подходящий поли(С)-хвост на 3'-конце мРНК, как правило, содержит от около 10 до 200 цитозиновых нуклеотидов (например, от около 10 до 150 цитозиновых нуклеотидов, от около 10 до 100 цитозиновых нуклеотидов, от около 20 до 70 цитозиновых нуклеотидов, от около 20 до 60 цитозиновых нуклеотидов или от около 10 до 40 цитозиновых нуклеотидов). Поли(С)-хвост может быть добавлен к поли(А)-хвосту или может заменять поли(А)-хвост.

В некоторых вариантах реализации изобретения длину поли(А)- или поли(С)-хвоста регулируют с целью контроля устойчивости модифицированной молекулы смысловой мРНК по данному изобретению и, следовательно, с целью транскрипции белка. Например, в связи с тем, что длина поли(А)-хвоста может влиять на период полужизни молекулы смысловой мРНК, длина поли(А)-хвоста может регулироваться с целью изменения уровня устойчивости мРНК к действию нуклеаз и, следовательно, с целью регулирования времени экспрессии полинуклеотида и/или получения полипептида в клетке-мишени.



5'- и 3'-нетранслируемая область.

В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК содержат 5'- и/или 3'-нетранслируемую область. В некоторых вариантах реализации изобретения 3'-нетранслируемая область содержит один или более элементов, которые влияют на устойчивость или трансляцию мРНК, например железосвязывающий элемент. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-нетранслируемая область может составлять от около 50 до 500 нуклеотидов в длину.

В некоторых вариантах реализации изобретения 3'-нетранслируемая область содержит один или более сигналов полиаденилирования, участок связывания для белков, которые влияют на устойчивость мРНК в местоположении в клетке, или один или более участков связывания миРНК. В некоторых вариантах реализации изобретения 3'-нетранслируемая область может составлять от 50 до 500 нуклеотидов в длину или быть длиннее.

Типовые последовательности 3'- и/или 5'-НТО могут быть получены из молекул мРНК, которые являются устойчивыми (например, глобина, актина, GAPDH, тубулина, гистона или ферментов цикла лимонной кислоты), с целью повышения устойчивости молекулы смысловой мРНК. Например, последовательность 5'-НТО может содержать частичную последовательность предраннего 1 (LE1) гена ЦМВ или ее фрагмент, для повышения устойчивости к действию нуклеаз и/или повышения периода полужизни полинуклеотида. Также предполагается включение последовательности, кодирующей гормон роста человека (hGH), или ее фрагмента, в 3'-конец или нетранслируемую область полинуклеотида (например, мРНК) для придания дополнительной устойчивости полинуклеотиду. В целом, указанные модификации улучшают устойчивость и/или фармакокинетические свойства (например, время полужизни) полинуклеотида по сравнению с его немодифицированными аналогами, и включают, например, модификации, осуществленные для улучшения устойчивости таких полинуклеотидов к нуклеазному расщеплению *in vivo*.

Согласно различным вариантам реализации изобретения мРНК любого размера могут быть инкапсулированы в предлагаемые липосомы. В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаемые липосомы могут инкапсулировать мРНК длиной более чем около 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 т.н.

Липосомы.

Липосомы для применения в предлагаемых композициях могут быть получены с помощью различных методик, которые в настоящее время известны в данной области техники. Например, мультиламеллярные везикулы (MLV) могут быть получены в соответствии с обычными методиками, например путем нанесения выбранного липида на внутреннюю стенку подходящего контейнера или сосуда путем растворения липида в подходящем растворителе с последующим выпариванием растворителя до образования тонкой пленки внутри сосуда или путем распылительной сушки. Затем водная фаза может быть добавлена в сосуд с перемешиванием на вортексе, что приводит к образованию MLV. При этом моноламеллярные везикулы (ULV) могут быть образованы посредством гомогенизации, обработки ультразвуком или экструзии мультиламеллярных везикул. Кроме того, моноламеллярные везикулы могут быть образованы с помощью методик удаления детергента.

В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаемые композиции содержат липосомы, в которых средство, такое как нуклеиновая кислота, например мРНК, одновременно связано на поверхности липосомы и инкапсулировано в ту же липосому. Например, при получении композиций по данному изобретению, катионные липосомы могут вступать в ассоциацию с мРНК посредством электростатических взаимодействий. Например, при получении композиций по данному изобретению, катионные липосомы могут вступать в ассоциацию с мРНК посредством электростатических взаимодействий.

В некоторых вариантах реализации композиции и способы по данному изобретению включают мРНК, инкапсулированную в липосому. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более видов мРНК могут быть инкапсулированы в одну липосому. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более видов мРНК могут быть инкапсулированы в разные липосомы. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК инкапсулирована в одну или более липосом, которые отличаются по липидному составу, молярному соотношению липидных компонентов, размеру, заряду (дзета-потенциал), специфическим лигандам и/или их комбинациям. В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более липосом могут иметь разный состав катионных липидов, нейтрального липида, ПЭГ-модифицированного липида и/или их комбинаций. В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более липосом могут иметь разное молярное соотношение катионного липида, нейтрального липида, холестерина и ПЭГ-модифицированного липида, используемых для создания липосомы.

Способ включения желаемого терапевтического средства, такого как нуклеиновая кислота (например, мРНК), в липосому зачастую носит название "нагрузка". Типовые способы описаны в публикации Lasic et al., FEBS Lett., 312: 255-258, 1992, которая включена в данный документ посредством ссылки. Нуклеиновые кислоты, включенные в липосомы, могут быть полностью или частично расположены во внутреннем пространстве липосомы, в двухслойной мембране липосомы или связаны с внешней поверхностью липосомной мембраны. Включение нуклеиновой кислоты в липосому также называется в данном документе "инкапсуляцией", при этом нуклеиновая кислота полностью содержится во внутреннем пространстве липосомы. Зачастую целью включения мРНК в средство переноса, такое как липосома, является

ся защита нуклеиновой кислоты от воздействия окружающей среды, которая может содержать ферменты или химические вещества, разрушающие нуклеиновые кислоты и/или системы, или рецепторы, которые вызывают быстрое выделение нуклеиновых кислот. Следовательно, в некоторых вариантах реализации изобретения подходящее средство доставки способно усиливать устойчивость мРНК, содержащейся в нем, и/или содействовать доставке мРНК в клетку-мишень или ткань-мишень.

Размер липосом.

Подходящие липосомы по данному изобретению могут быть получены в разных размерах. В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаемые липосомы могут быть меньше, чем ранее известные липосомы для инкапсулирования мРНК. В некоторых вариантах реализации изобретения уменьшение размера липосом обусловлено более эффективной доставкой мРНК. При выборе подходящего размера липосомы можно учитывать место клетки-мишени или ткани-мишени и, в некоторой степени, применение, для которого создана липосома.

В некоторых вариантах реализации изобретения подходящий размер липосомы выбирают для облегчения системного распределения антигена, кодируемого мРНК. В некоторых вариантах реализации изобретения может быть желательным ограничить трансфекцию мРНК в некоторые клетки или ткани. Например, для воздействия на гепатоциты, размеры липосомы можно задать таким образом, чтобы они были меньше, чем поры эндотелиального слоя, выстилающего печеночные синусоиды в печени; в таких случаях липосома может легко проникать через такие эндотелиальные поры с достижением гепатоцитов-мишеней.

В альтернативном или дополнительном варианте, размеры липосомы можно задать таким образом, чтобы размеры липосомы имели достаточный диаметр для ограничения или полного предотвращения распределения в некоторые клетки или ткани. Например, размеры липосомы можно задать таким образом, чтобы ее размеры были больше, чем поры эндотелиального слоя, выстилающего печеночные синусоиды, чтобы тем самым ограничить распределение липосом в гепатоциты.

В некоторых вариантах реализации изобретения подходящая липосома имеет размер, равный или составляющий менее чем около 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 125, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55 или 50 нм. В некоторых вариантах реализации изобретения подходящая липосома имеет размер, составляющий не более чем около 250 нм (например, составляющий не более чем около 225, 200, 175, 150, 125, 100, 75 или 50 нм). В некоторых вариантах реализации изобретения подходящая липосома имеет размер, находящийся в диапазоне около 10-250 нм (например, находящийся в диапазоне около 10-225, 10-200, 10-175, 10-150, 10-125, 10-100, 10-75 или 10-50 нм). В некоторых вариантах реализации изобретения подходящая липосома имеет размер, находящийся в диапазоне около 100-250 нм (например, находящийся в диапазоне около 100-225, 100-200, 100-175, 100-150 нм). В некоторых вариантах реализации изобретения подходящая липосома имеет размер, находящийся в диапазоне около 10-100 нм (например, находящийся в диапазоне около 10-90, 10-80, 10-70, 10-60 или 10-50 нм).

Существует ряд альтернативных способов оптимизации размеров совокупности липосом, известных в данной области техники. Один из таких способов оптимизации размеров описан в патенте США № 4737323, который включен в данный документ посредством ссылки. Обработка липосомной суспензии ультразвуком с помощью ультразвуковой ванны или зонда обеспечивает постепенное уменьшение размеров до небольших ULV, составляющих менее чем около 0,05 мкм в диаметре. Гомогенизация является еще одним способом, который основан на сдвиговой энергии фрагментации больших липосом на более мелкие. В типичной методике гомогенизации MLV рециркулируют через стандартный эмульсионный гомогенизатор до тех пор, пока не станут наблюдаться выбранные размеры липосом, как правило, от около 0,1 до 0,5 мкм. Размер липосом можно определять с помощью квазиупругого рассеяния света (QELS), описанного в публикации Bloomfield, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10:421-150 (1981), которая включена в данный документ посредством ссылки. Средний диаметр липосом может быть уменьшен посредством обработки полученных липосом ультразвуком. Циклы прерывистой обработки ультразвуком могут чередоваться с оценкой QELS для управления эффективным синтезом липосом.

Фармацевтические композиции.

Для облегчения доставки средства, такого как нуклеиновая кислота, например мРНК, и/или экспрессии мРНК *in vivo*, средства доставки, такие как липосомы, могут быть составлены в комбинации с одной или более дополнительными нуклеиновыми кислотами, носителями, специфическими лигандами или стабилизирующими реагентами, или в фармакологических композициях, в которых их смешивают с подходящими наполнителями. Методики составления и введения лекарственных средств можно найти в публикации "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Истон, штат Пенсильвания, последнее издание.

Предлагаемые инкапсулированные в липосомы средства, такие как нуклеиновая кислота, например мРНК, и композиции, содержащие их, можно вводить и дозировать согласно обычной медицинской практике с учетом клинического состояния субъекта, места и способа введения, схемы введения, возраста, пола, массы тела субъекта и других факторов, имеющих значение для практикующих врачей, являющихся средними специалистами в своей области. "Эффективное количество" в контексте данного документа можно определить с помощью важных факторов, которые известны средним специалистам в об-

ласти экспериментальных клинических исследований, фармакологической, клинической и медицинской областях. В некоторых вариантах реализации изобретения вводимое количество является эффективным для достижения, по меньшей мере, некоторой стабилизации, улучшения или устранения симптомов и других показателей, которые выбраны специалистами в данной области техники в качестве соответствующих критериев прогрессирования, ремиссии или положительной динамики заболевания. Например, подходящим количеством и режимом дозирования являются те, которые вызывают, по меньшей мере, временное продуцирование белка (например, фермента).

Подходящие способы введения включают, например, пероральное, ректальное, вагинальное, чресслизистое, легочное, в том числе интратрахеальное или ингаляционное, или интестинальное введение; парентеральную доставку, в том числе внутривенные, чрескожные (местные), внутримышечные, подкожные, интрамедуллярные инъекции, а также интратекальное, прямое внутрижелудочковое, внутривенное, внутрибрюшинное или интраназальное введение.

В альтернативном или дополнительном варианте инкапсулированные в липосомы средства, такие как нуклеиновая кислота, например мРНК, и композиции по данному изобретению можно вводить местно, а не системно, например, посредством инъектирования фармацевтической композиции непосредственно в ткань-мишень, предпочтительно в виде препарата с замедленным высвобождением. Локальную доставку можно осуществлять различными способами в зависимости от ткани, подлежащей воздействию. Например, аэрозоли, содержащие композиции по данному изобретению, могут быть ингаляционными (для назального, трахеального или бронхиального введения); композиции по данному изобретению можно инъектировать, например, в место поражения, проявления заболевания или боли; композиции могут быть предложены в виде пастилок для воздействия в полости рта, трахее или пищеводе; могут поставляться в жидкой, таблетированной или капсулированной форме для введения в желудок или кишечник, могут поставляться в форме суппозиториев для ректального или вагинального применения; или даже могут доставляться в глаз с помощью кремов, капель или даже инъекции. Препараты, содержащие предлагаемые композиции в виде комплекса с терапевтическими молекулами или лигандами, можно вводить даже хирургическим путем, например в сочетании с полимером или другой структурой или веществом, которые могут обеспечивать композиции возможность диффундировать от места имплантации к окружающим клеткам. В альтернативном варианте, их можно применять хирургически без использования полимеров или носителей.

В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаемые липосомы и/или композиции составляют таким образом, чтобы они были пригодны для замедленного высвобождения содержащегося в них средства, например, мРНК. Такие композиции с замедленным высвобождением могут быть удобными для введения субъекту при широких интервалах дозирования. Например, в одном варианте реализации изобретения композиции по данному изобретению вводят субъекту два раза в день, ежедневно или через день. В предпочтительном варианте реализации изобретения композиции по данному изобретению вводят субъекту два раза в неделю, один раз в неделю, каждые десять дней, каждые две недели, каждые три недели или более предпочтительно каждые четыре недели, один раз в месяц, каждые шесть недель, каждые восемь недель, раз в два месяца, каждые три месяца, каждые четыре месяца, каждые шесть месяцев, каждые восемь месяцев, каждые девять месяцев или один раз в год. Также рассматриваются композиции и липосомы, которые составлены для введения депо-формы (например, внутримышечно, подкожно, интравитреально) с целью доставки или высвобождения мРНК в течение длительных периодов времени. Предпочтительно, применяемые средства замедленного высвобождения комбинируют с модификациями, внесенными в мРНК для повышения устойчивости.

Также в данном документе рассматриваются лиофилизированные фармацевтические композиции, содержащие одну или больше липосом, описанных в данном документе, а также соответствующие способы для применения таких композиций, как описано, например, в международной заявке на патент № PCT/US2012/041663, поданной 8 июня, 2012 года, публикации № WO 2012/170889, принципы которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Например, лиофилизированные фармацевтические композиции по данному изобретению можно восстановить перед введением или можно восстановить *in vivo*. Например, лиофилизированную фармацевтическую композицию можно приготовить в подходящей лекарственной форме (например, лекарственной форме для внутривенного введения, такой как диск, стержень или мембрана) и ввести таким образом, чтобы через некоторое время произошла регидратация лекарственной формы *in vivo* под воздействием биологических жидкостей индивидуума.

Предлагаемые липосомы и композиции можно вводить в любую желаемую ткань. В некоторых вариантах реализации изобретения средство, например мРНК, доставляемое предлагаемыми липосомами или композициями, экспрессируется в ткани, в которую были введены данные липосомы и/или композиции. В некоторых вариантах реализации изобретения доставляемая мРНК экспрессируется в ткани, отличной от ткани, в которую были введены липосомы и/или композиции. Типовые ткани, в которых доставляемая мРНК может доставляться и/или экспрессироваться, включают, не ограничиваясь ими, печень, почку, сердце, селезенку, сыворотку, головной мозг, скелетную мышцу, лимфатические узлы, кожу и/или спинномозговую жидкость.

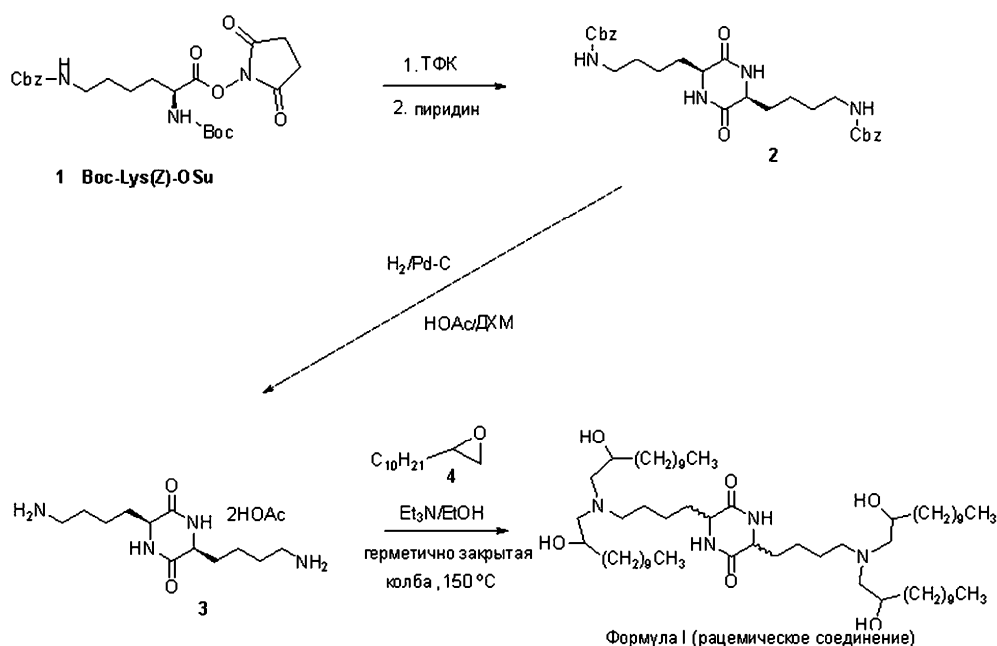
Согласно различным вариантам реализации изобретения время экспрессии доставляемых средств,

например мРНК, можно регулировать для удовлетворения конкретной медицинской потребности. В некоторых вариантах реализации изобретения экспрессия белка, кодируемого доставляемой мРНК, детектируется в сыворотке или тканях-мишенях через 1, 2, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 и/или 72 ч после однократного введения предлагаемых липосом или композиций. В некоторых вариантах реализации изобретения экспрессия белка, кодируемого мРНК, детектируется в сыворотке или тканях-мишенях через 1, 2, 3, 4, 5, 6 и/или 7 дней после однократного введения предлагаемых липосом или композиций. В некоторых вариантах реализации изобретения экспрессия белка, кодируемого мРНК, детектируется в сыворотке или тканях-мишенях через 1, 2, 3 и/или 4 недели после однократного введения предлагаемых липосом или композиций. В некоторых вариантах реализации изобретения экспрессия белка, кодируемого мРНК, детектируется через месяц или более после однократного введения предлагаемых липосом или композиций.

### Примеры

Пример 1. Синтез рацемических соединений формулы I.

Схема 1. Путь синтеза до рацемических соединений формулы I



Рацемическое соединение 10 получали из защищенного производного 1 лизина, Boc-Lys(Z)-OSu, расщеплением альфа-амино-трет-бутилкарбамата трифторуксусной кислотой и димеризацией полученного свободного амина с образованием 3,6-диоксопиперазина 2. Гидрирование 2 на палладиевом катализаторе приводит к получению первичного диамина 3, который обрабатывают четырьмя эквивалентами эпоксида 4 и триэтиламина с образованием рацемического 3,6-диоксопиперазина 10 формулы I.

Дибензил(((2S,5S)-3,6-диоксопиперазин-2,5-диил)бис(бутан-4,1-диил))дикарбамат 2. К охлажденному на бане со льдом Boc-Lys(Z)-OSu 1 (50 г) медленно добавляли ТФК (60 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 20 мин. Баню со льдом убирали и продолжали перемешивание в течение 1 ч. ТФК удаляли ротационным выпариванием. Маслянистый остаток растворяли в ДМФА (80 мл) и медленно добавляли к перемешиваемому пиридину (безводный, 2,5 л). Масс-спектрометрия показала завершение реакции через 1 ч. Пиридин удаляли ротационным выпариванием и разбавляли остаток EtOAc (2 л). Через 20 мин перемешивания смесь фильтровали с получением 2 в виде не совсем белого твердого вещества (20 г после сушки в вакууме на протяжении ночи. Выход: 73%).

(3S,6S)-3,6-бис(4-Аминобутил)пиперазин-2,5-дион - 2HOAc 3. К соединению 2 в смеси AcOH (550 мл) и ДХМ (550 мл) добавляли Pd/C (10%, влажный, 10 г). Эту смесь перемешивали в атмосфере H<sub>2</sub> в течение 4 ч после того, как масс-спектрометрия показала завершение реакции. Реакционную смесь продували азотом в течение 10 мин и фильтровали через слой целита. Целит промывали MeOH (3×250 мл). Объединенный фильтрат выпаривали и перемешивали остаток с EtOAc (1,0 л) в течение 30 мин. После фильтрации получали 3 в виде белого твердого вещества (16,37 г после сушки в вакууме на протяжении ночи. Выход: 114%. <sup>1</sup>H ЯМР показывает чистый продукт, но с дополнительным содержанием HOAc в образце).

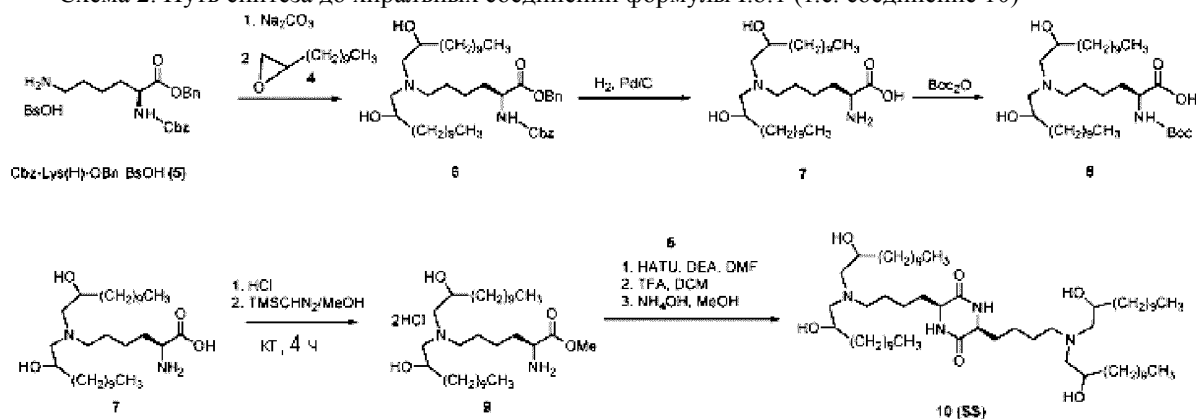
3,6-бис(4-(бис(2-Гидроксидодецил)амино)бутил)пиперазин-2,5-дион 10. К смеси 3 (15,87 г, 42,2 ммоль) и 4 (57 мл, 261 ммоль) в EtOH (75 мл), перемешиваемой в 500 мл герметичной колбе при комнатной температуре, добавляли Et<sub>3</sub>N (23 мл, 165 ммоль). Колбу продували азотом в течение 5 мин и герметично закрывали. Смесь (твердой и жидкой суспензии) перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре, затем нагревали до 150-155 °C (температура масляной бани) и перемешивали в течение 5 ч.

Прозрачный раствор получали после того, как температура достигала 150°C. После охлаждения до комнатной температуры реакционный раствор выпаривали и очищали остаток с помощью колоночной флэш-хроматографии: 9 раз с применением 0-30% MeOH/ДХМ в качестве элюента и 2 раза с применением 0-30% MeOH/EtOAc в качестве элюента. Применение ДХМ к 50% 75:22:3 ДХМ/MeOH/NH<sub>4</sub>OH (водн.) в качестве элюента привело к совместному элюированию продукта с менее полярным побочным продуктом. Побочный продукт шел в тесном контакте с продуктом на ТСХ с применением 30% MeOH/ДХМ в качестве проявляющих растворителей. Его полностью отделяли от продукта на ТСХ с применением 30% MeOH/EtOAc в качестве проявляющих растворителей. Чистые фракции продукта, полученные в результате колоночной очистки, объединяли и выпаривали. Маслянистый остаток растворяли в Et<sub>2</sub>O и выпаривали. Сушкой в вакууме на протяжении ночи удаляли все растворители с получением рацемического соединения 10 в виде светло-желтого геля (9,85 г, выход: 24%). ВЭЖХ с детекцией ELSD показала два одинаковых по размеру пика с одинаковой массой продукта. Элементный анализ: (расчета.): C, 72,63; H, 12,17; N, 5,64; (наблюд.): C, 72,25; H, 12,37; N, 5,68. Масс-спектрометрия: 993,8 m/z.

В другом опыте с 7,15 г 3 и 25,6 мл 4 неочищенный продукт очищали дважды с применением 0-30% MeOH/EtOAc в качестве элюента с получением двух партий продукта: 1,55 г партии из ранних фракций и 7,38 г партии из поздних фракций. Обе партии очищали с помощью <sup>1</sup>H ЯМР. ВЭЖХ с детекцией ELSD показала два одинаковых по размеру пика с одинаковой массой продукта в случае 7,38 г партии и только один пик продукта в случае 1,55 г партии.

Пример 2. Синтез хиральных соединений формулы I.b.1 (т.е. соединение 10).

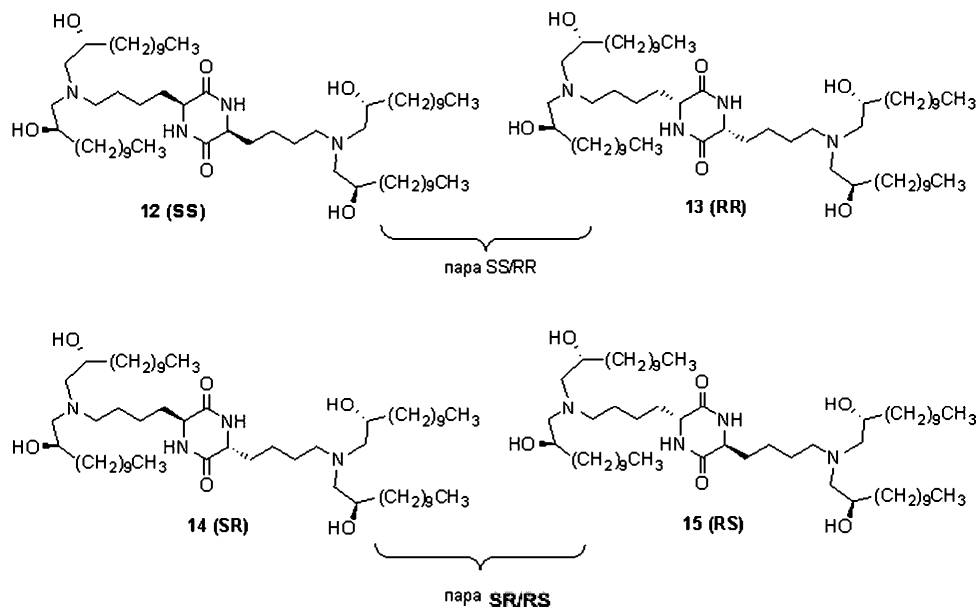
Схема 2. Путь синтеза до хиральных соединений формулы I.b.1 (т.е. соединение 10)



Хиральное соединение 10 синтезировали N-алкилированием защищенного производного 5 лизина двумя эквивалентами эпоксида 4 с образованием диола 6. Гидрирование диола 6 на палладиевом катализаторе приводит к образованию α-аминокислоты 7, которую разделяют на две части. Альфа-аминогруппа первой части α-аминокислоты 7 имеет защиту в виде трет-бутилкарбамата, в результате обработки Вос-ангидридом, с образованием карбоновой кислоты 8. Свободная кислота второй части α-аминокислоты 7 превращена в сложный метиловый эфир с образованием амина 9. Карбоновая кислота 8 и амин 9 соединяются с амидным промежуточным соединением с помощью конденсирующего реагента для образования пептидной связи, такого как HATU и диэтиламин в апротонном растворителе, таком как ДМФА, трет-бутилкарбаматная группа амидного промежуточного соединения расщепляется трифторуксусной кислотой в дихлорметане и полученный в результате amino-эфирный продукт циклизуется до пиперазин-2,5-диона 10. Стереохимия во всех хиральных центрах сохраняется по этому пути.

Приведенные ниже хиральные соединения 12-15 получают через описанные пути синтеза с помощью соответствующих хиральных эпоксидных исходных материалов.

Схема 3. Хиральные соединения 12-15



Пример 3. Соединение формулы I.a.i (т.е. R4-SR-cKK-E12)

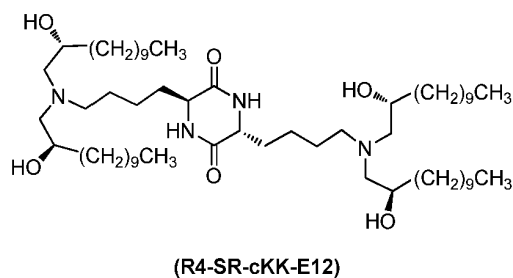
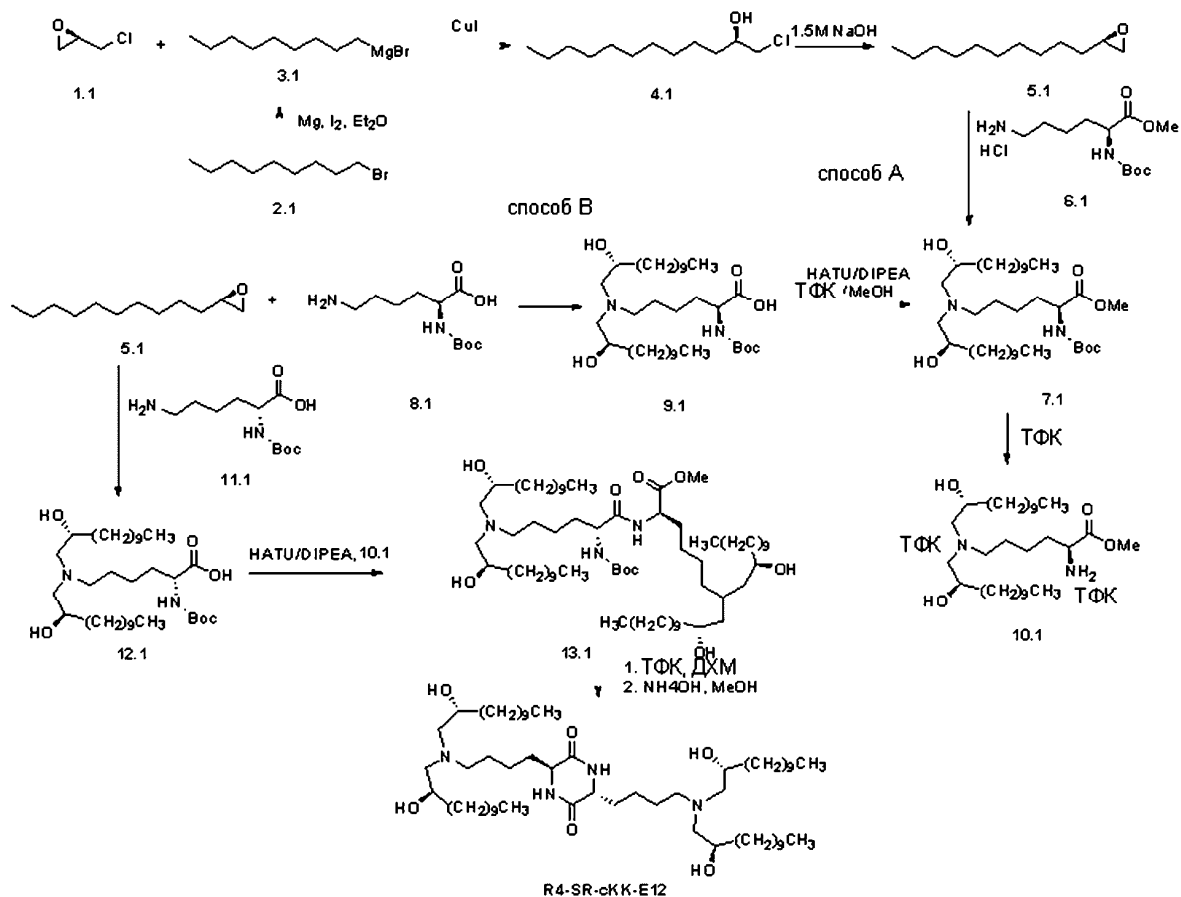


Схема 4. Синтез соединения формулы I.a.i (т.е. R4-SR-cKK-E12)



Синтез соединения 3.1. К суспензии Mg (60 г, 2,5 моль) в безводном Et<sub>2</sub>O (1000 мл) добавляли один кристалл йода с последующим добавлением 1-бромнонана (25 мл). Реакция инициировалась, и раствор начинал интенсивно кипеть после нагревания реакционной колбы на водяной бане. Оставшийся 1-бромнонан (360 мл, 2,0 моль всего) добавляли с помощью капельной воронки через 1,5 ч для поддержания кипения. После добавления реакционный раствор нагревали с обратным холодильником с помощью водяной бани в течение еще 30 мин, а затем охлаждали до комнатной температуры. Этот эфирный раствор 3.1 использовали непосредственно в следующей реакции.

Синтез соединения 4.1. К суспензии CuI (39 г, 0,2 моль) в безводном ТГФ (1000 мл), перемешиваемой механической мешалкой при -78°C в 5 л трехгорлой колбе, добавляли R-эпихлоргидрин (185 г, 2,0 моль) (капельной воронкой). После добавления добавляли указанный выше эфирный раствор 3.1 с помощью канюли в течение 1 ч. Смесь перемешивали при -78°C в течение 3,5 ч, затем гасили насыщенным водным раствором NH<sub>4</sub>Cl (1500 мл). Отделяли органический слой. Водный слой экстрагировали Et<sub>2</sub>O (2000 мл). Объединенную органическую фазу промывали насыщенным раствором хлорида натрия, сушили (над MgSO<sub>4</sub>) и выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (2,5 кг SiO<sub>2</sub>, с элюированием градиентом 0-10% EtOAc в гексанах) с получением 292 г 4.1 (выход: 66%) в виде светло-желтого масла.

Синтез соединения 5.1. К раствору 4.1 (292 г, 1,33 моль) в MeOH (600 мл) и ТГФ (600 мл) добавляли водный раствор NaOH (1,5 М, 1000 мл) с помощью капельной воронки при 0°C. После добавления реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2,5 ч, ТСХ показала основной продукт, очень незначительное количество исходного материала (EtOAc:гексаны = 1:9, R<sub>f</sub> = 0,6). ТГФ и MeOH удаляли ротационным выпариванием в вакууме. Водный остаток экстрагировали Et<sub>2</sub>O (600 мл×3). Объединенную органическую фазу промывали насыщенным раствором хлорида натрия, сушили над MgSO<sub>4</sub> и выпаривали. Желтый маслянистый остаток очищали с помощью колонки (SiO<sub>2</sub>, 2,5 кг, с элюированием градиентом 0-10% EtOAc в гексанах) с получением 205 г (84%) чистого 5.1.

Синтез соединения 7.1.

Способ А. К раствору 6.1 (75 г, 0,25 моль) в смеси ДХМ (1000 мл) и MeOH (71 мл), перемешиваемому при комнатной температуре, добавляли водный раствор Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,0М, 135 мл). Органический слой отделяли и экстрагировали водный слой с помощью ДХМ (250 мл×2). Объединенную органическую фазу сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и выпаривали в вакууме. Остаток растворяли в MeOH (375 мл), затем добавляли соединение 5.1 (185 г, 1,0 моль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 дней после того, как МС и ТСХ показали преимущественно желаемый продукт. После выпаривания неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (2,0 кг SiO<sub>2</sub>, с элюированием градиентом 0-60% EtOAc в гексанах) с получением 7.1 (131 г, 82%) в виде бледного вязкого масла.

Способ Б. К суспензии 8.1 (50 г, 0,2 моль) в MeOH (600 мл) добавляли DIPEA (45 мл), затем добавляли соединение 5.1 (150 г, 0,813 моль, 4,0 экв.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 7 дней. Растворители удаляли, а остаток очищали с помощью колонки (1,0 кг SiO<sub>2</sub>, с элюированием градиентом 0-30% MeOH в EtOAc) с получением 9.1 в виде воскообразного твердого вещества (83 г, 67%). К раствору 9.1 (81 г, 0,13 моль) в ДМФА (1000 мл), перемешиваемому при 0°C, добавляли NATU (50,1 г, 0,13 моль) с последующим добавлением DIPEA (92 мл, 0,52 моль). Смесь перемешивали при 0°C в течение 40 мин, а затем добавляли MeOH (53,2 мл, 10,0 экв.). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре на протяжении ночи. Затем ее разбавляли водой (5000 мл) и экстрагировали EtOAc (500 мл×4). Объединенную органическую фазу промывали насыщенным раствором хлорида натрия (600 мл×3), сушили над безводным MgSO<sub>4</sub> и выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали с помощью колонки (1,0 кг SiO<sub>2</sub>, с элюированием градиентом 0-80% EtOAc в гексанах) с получением 7.1 (69 г, 55% за 2 стадии) в виде бледного вязкого масла.

Синтез соединения 10.1. К раствору 7.1 (69 г, 0,11 моль) в ДХМ (200 мл) добавляли ТФК (200 мл), полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, МС детектирование показало только желаемый продукт. Все растворители выпаривали в вакууме с получением 115 г маслообразного продукта 10.1 коричневого цвета, который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

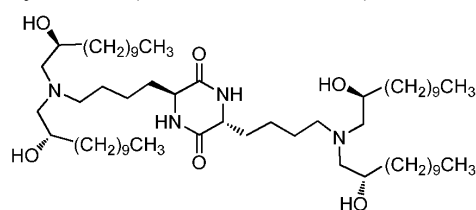
Синтез соединения 12.1. К суспензии 11.1, Вос-D-лизин (75 г, 0,305 моль) в MeOH (900 мл), добавляли DIPEA (68 мл) и 5.1 (196 г, 1,06 моль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 7 дней. Летучие вещества удаляли и очищали неочищенный продукт с помощью колонки (2,5 кг SiO<sub>2</sub>, с элюированием градиентом 0-40% MeOH в EtOAc) с получением 118 г (63%) чистого соединения 12.1.

Синтез соединения 13.1. К раствору 12.1 (67,5 г, 0,11 моль) в ДМФА (600 мл, нагретом до 50°C в течение 30 мин с получением гомогенного раствора), охлажденному на бане со льдом, добавляли NATU (50 г, 0,12 моль) и DIPEA (95 мл, 0,55 моль). Полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 45 мин, затем добавляли соединение 10.1 (115 г, полученное выше) в ДМФА (400 мл) с помощью капельной воронки. Смесь перемешивали при комнатной температуре на протяжении ночи. Добавляли простой эфир (1000 мл), а затем воду (1000 мл). Органическую фазу отделяли; водную фазу экстрагировали простым

эфиром (250 мл×2). Объединенную органическую фазу промывали водой, сушили над безводным  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и выпаривали. Остаток очищали с помощью колонки (1,0 кг  $\text{SiO}_2$ , с элюированием градиентом 0-20%  $\text{MeOH}$  в  $\text{EtOAc}$ ) с получением 94,2 г (76%) соединения 13.1.

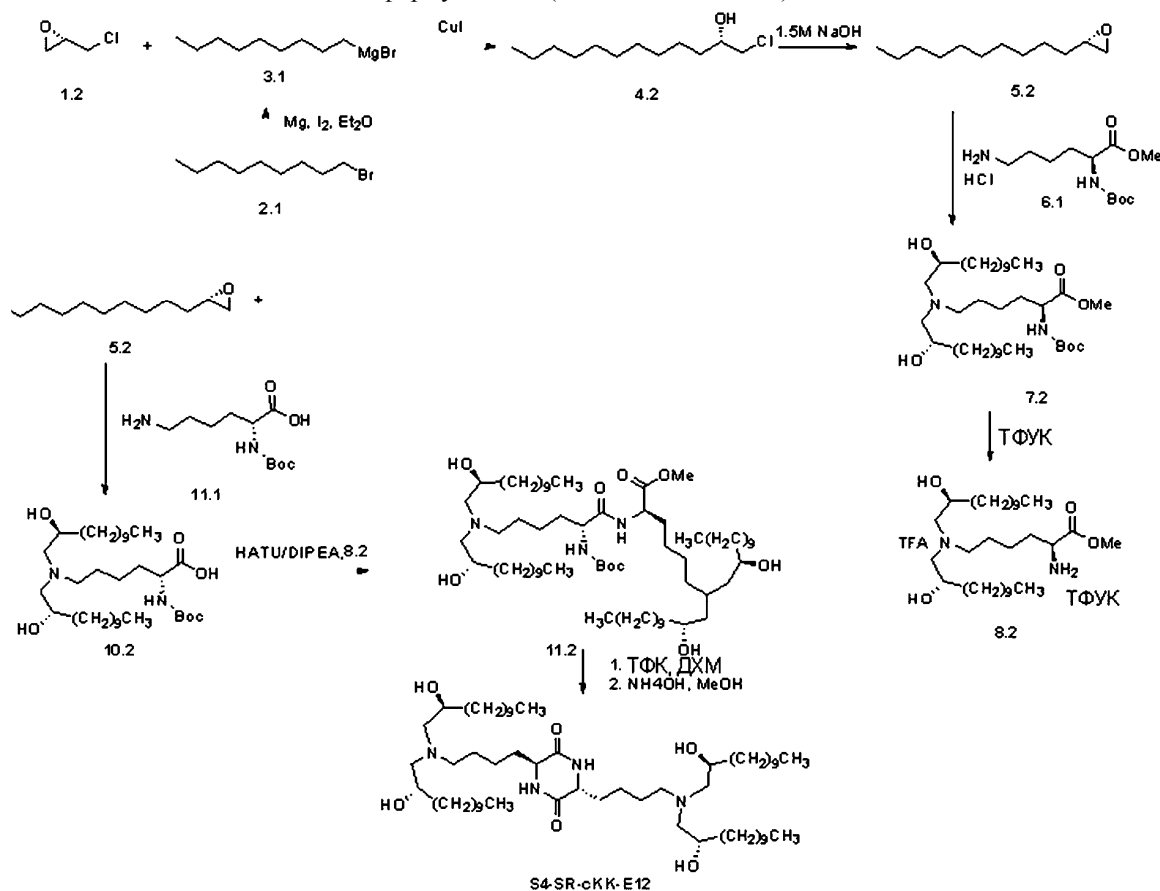
Синтез соединения формулы I.a.i (т.е. R4-SR-cKK-E12). К раствору 13.1 (94 г, 0,084 моль) в ДХМ (300 мл) добавляли ТФК (300 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. МС детектирование показало завершение реакции. Растворители выпаривали в вакууме. Остаток растворяли в ДХМ (500 мл) и промывали водным раствором  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1,0М, 500 мл). Водную промывку снова экстрагировали ДХМ (100 мл). Объединенную органическую фазу сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и выпаривали. Остаток растворяли в  $\text{MeOH}$  (1500 мл) и охлаждали на бане со льдом. Водный раствор  $\text{NH}_4\text{OH}$  (28%, 80 мл) добавляли с помощью капельной воронки. Реакционную смесь оставляли медленно нагреваться до комнатной температуры и перемешивали при температуре окружающей среды в течение 2 дней. Летучие вещества выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали с помощью колонки (1,0 кг  $\text{SiO}_2$ , с элюированием градиентом растворителей: 1%  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 4-9%  $\text{MeOH}$ , 95-90%  $\text{EtOAc}$ ) с получением 34 г чистого R4-SR-cKK-E12 и 22 г R4-SR-cKK-E12 с примесями. R4-SR-cKK-E12 с примесями повторно очищали с помощью колонки с получением 12 г чистого R4-SR-cKK-E12. Таким образом, всего получали 46 г (55%) чистого R4-SR-cKK-E12 (смолистое твердое вещество).

Пример 4. Соединение формулы I.a.ii (т.е. S4-SR-cKK-E12)



(S4-SR-cKK-E12)

Схема 5. Синтез соединения формулы I.a.ii (т.е. S4-SR-cKK-E12)



Синтез соединения 3.1. К суспензии  $\text{Mg}$  (30 г, 1,25 моль) в безводном  $\text{Et}_2\text{O}$  (600 мл) добавляли один кристалл йода с последующим добавлением 1-бромнонан-1-ола (30 мл). Реакция инициировалась, и раствор начинал интенсивно кипеть после нагревания реакционной колбы на водяной бане. Оставшийся 1-бромнонан-1-ол (161 мл, 2,0 моль всего) добавляли с помощью капельной воронки через 1,5 ч для поддержания кипения. После добавления реакционный раствор нагревали с обратным холодильником с помощью водяной бани в течение еще 30 мин, а затем охлаждали до комнатной температуры. Этот эфирный рас-



твор 3.1 использовали непосредственно в следующей реакции.

Синтез соединения 4.2. К суспензии CuI (19 г, 0,1 моль) в безводном ТГФ (1000 мл), перемешиваемой механической мешалкой при  $-78^{\circ}\text{C}$  в 5 л трехгорлой колбе, добавляли S-эпихлоргидрин (92 г, 1,0 моль) с помощью капельной воронки. После добавления добавляли указанный выше эфирный раствор 3.2 с помощью канюли в течение 1 ч. Смесь перемешивали при  $-78^{\circ}\text{C}$  в течение 3,5 ч, затем гасили насыщенным водным раствором  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (400 мл). Отделяли органический слой. Водный слой экстрагировали  $\text{Et}_2\text{O}$  (1000 мл). Объединенную органическую фазу промывали насыщенным раствором хлорида натрия, сушили (над  $\text{MgSO}_4$ ) и выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (2,5 кг  $\text{SiO}_2$ , с элюированием градиентом 0-10%  $\text{EtOAc}$  в гексанах) с получением 111,6 г 4.2 (выход: 66%) в виде светло-желтого масла.

Синтез соединения 5.2. К раствору 4.2 (111,3 г, 0,506 моль) в  $\text{MeOH}$  (230 мл) и ТГФ (230 мл) добавляли водный раствор  $\text{NaOH}$  (1,5 М, 395 мл) с помощью капельной воронки при  $0^{\circ}\text{C}$ . После добавления реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2,5 ч, ТСХ показала основной продукт и очень незначительное количество исходного материала ( $\text{EtOAc}$ :гексаны = 1:9,  $R_f$  = 0,6). ТГФ и  $\text{MeOH}$  удаляли ротационным выпариванием в вакууме. Водный остаток экстрагировали  $\text{Et}_2\text{O}$  (200 мл $\times$ 3). Объединенную органическую фазу промывали насыщенным раствором хлорида натрия, сушили над  $\text{MgSO}_4$  и выпаривали. Желтый маслянистый остаток очищали с помощью колонки ( $\text{SiO}_2$ , 1,0 кг, с элюированием градиентом 0-10%  $\text{EtOAc}$  в гексанах) с получением 81 г (87%) чистого 5.2.

Синтез соединения 7.2. К раствору 6.1 (13 г, 0,044 моль) в смеси ДХМ (100 мл) и  $\text{MeOH}$  (10 мл), перемешиваемому при комнатной температуре, добавляли водный раствор  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2,0 М, 25 мл). Органический слой отделяли и экстрагировали водный слой с помощью ДХМ (250 мл $\times$ 2). Объединенную органическую фазу сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и выпаривали в вакууме. Остаток растворяли в  $\text{MeOH}$  (60 мл), затем добавляли соединение 5.2 (32 г, 0,174 моль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 дней после того, как МС и ТСХ показали преимущественно желаемый продукт. После выпаривания неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (600 г  $\text{SiO}_2$ , с элюированием градиентом 0-60%  $\text{EtOAc}$  в гексанах) с получением 7.2 (23 г, 85%) в виде бледного вязкого масла.

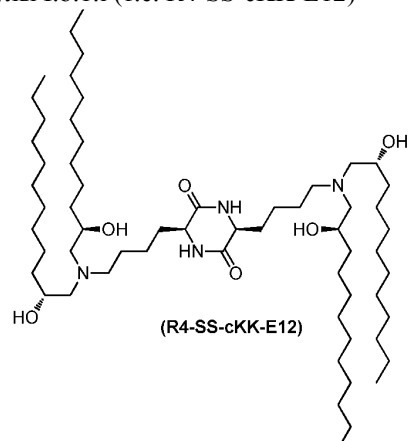
Синтез соединения 8.2. К раствору 7.2 (23 г, 0,0366 моль) в ДХМ (60 мл) добавляли ТФК (60 мл), полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, МС детектирование показало только желаемый продукт. Все растворители выпаривали в вакууме с получением 40 г маслообразного продукта 8.2 коричневого цвета, который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Синтез соединения 10.2. К суспензии 11.1, Вос-D-лизин (14 г, 0,057 моль) в  $\text{MeOH}$  (900 мл), добавляли ТЭА (11,6 мл) и 5.2 (42 г, 0,228 моль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 7 дней. Летучие вещества удаляли и очищали неочищенный продукт с помощью колонки (1,0 кг  $\text{SiO}_2$ , с элюированием градиентом 0-40%  $\text{MeOH}$  в  $\text{EtOAc}$ ) с получением 24 г (70%) чистого соединения 10.2.

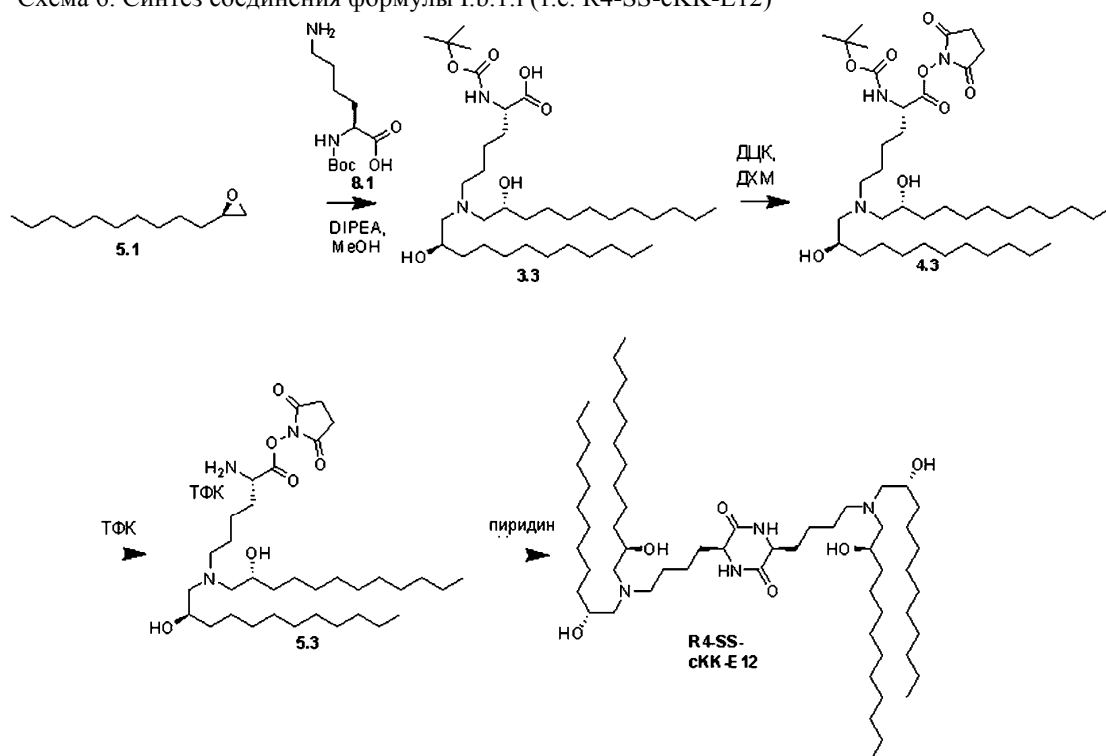
Синтез соединения 11.2. К раствору 10.2 (9,1 г, 14,82 моль) в ДМФА (120 мл), охлаждаемому на бане со льдом, добавляли НАТУ (8,4 г, 22,23 моль) и DIPEA (25 мл, 148,2 ммоль). Полученную смесь перемешивали при  $0^{\circ}\text{C}$  в течение 45 мин, затем добавляли соединение 8.2 в ДМФА (80 мл) с помощью капельной воронки. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре на протяжении ночи. МС детектирование показало отсутствие исходного материала. Добавляли простой эфир (1000 мл), а затем воду (1000 мл). Органическую фазу отделяли, водную фазу экстрагировали простым эфиром (200 мл $\times$ 2). Объединенную органическую фазу промывали насыщенным раствором хлорида натрия, сушили безводным  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и выпаривали. Остаток очищали с помощью колонки (330 г  $\text{SiO}_2$ , с элюированием градиентом 0-20%  $\text{MeOH}$  в  $\text{EtOAc}$ ) с получением 10,6 г желаемого соединения 11.2.

Синтез соединения формулы I.a.ii (т.е. S4-SR-cKK-E12). К раствору 11.2 (10,6 г, 0,084 моль) в ДХМ (30 мл) добавляли ТФК (30 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. МС детектирование показало завершение реакции. Растворители выпаривали в вакууме. Остаток растворяли в ДХМ (150 мл) и промывали водным раствором  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1,0 М, 200 мл). Водную промывку снова экстрагировали ДХМ (100 мл). Объединенную органическую фазу сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и выпаривали. Остаток растворяли в  $\text{MeOH}$  (200 мл) и охлаждали на бане со льдом. Водный раствор  $\text{NH}_4\text{OH}$  (28%, 10 мл) добавляли с помощью капельной воронки. Реакционную смесь оставляли медленно нагреваться до комнатной температуры и перемешивали при температуре окружающей среды в течение 2 дней. Летучие вещества выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали с помощью колонки (600 г  $\text{SiO}_2$ , с элюированием градиентом растворителей: 1%  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 4-9%  $\text{MeOH}$ , 95-90%  $\text{EtOAc}$ ) с получением 5,1 г чистого S4-SR-cKK-E12.

## Пример 5. Соединение формулы I.b.1.i (т.е. R4-SS-cKK-E12)



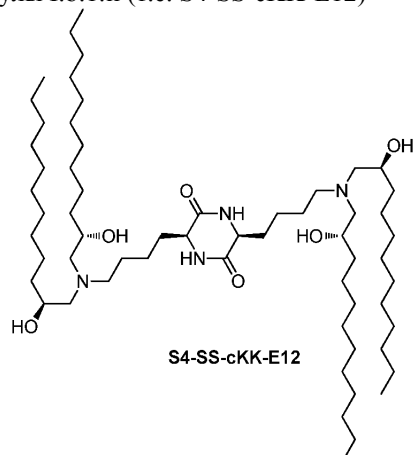
## Схема 6. Синтез соединения формулы I.b.1.i (т.е. R4-SS-cKK-E12)



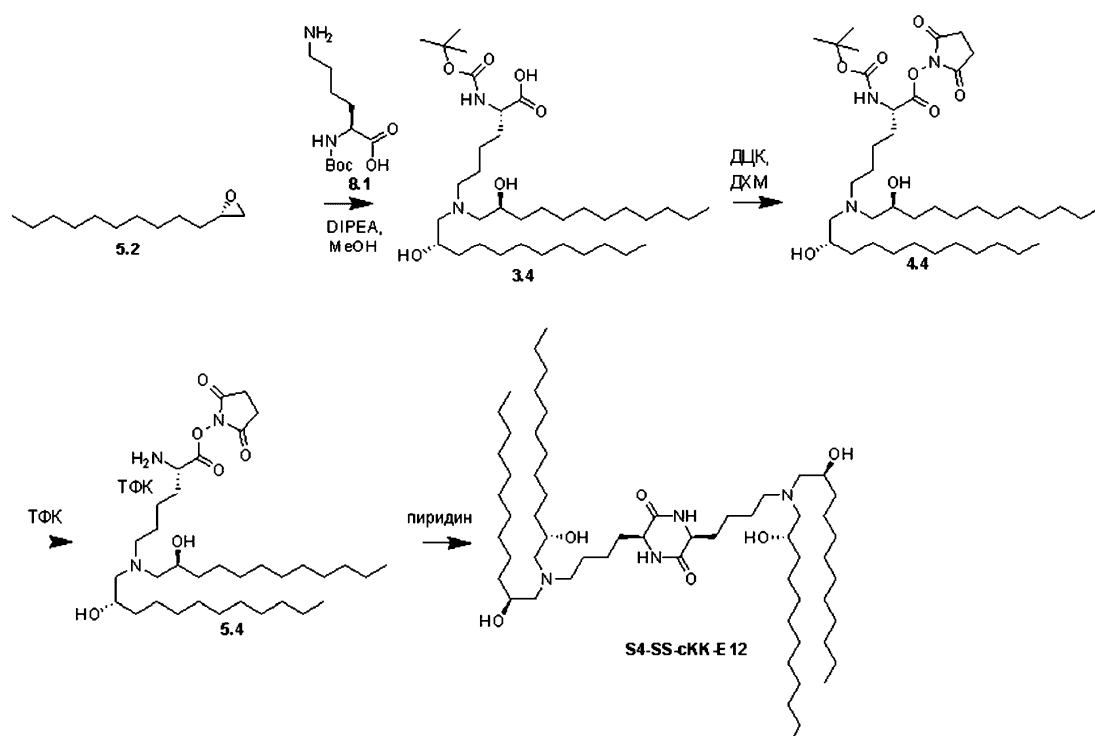
Синтез соединения 3.3 ( $N^2$ -(трет-бутоксикарбонил)- $N^6, N^6$ -бис((R)-2-гидроксидодецил)-L-лизин). Смесь R-эпоксида (5.1, 46 г, 250 ммоль), Вос-L-лизина 8.1 (15 г, 61 ммоль) и диизопропилэтиламина (11 мл) в метаноле (80 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 3 д. Летучие вещества удаляли, а желтый маслянистый остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле (330 г), с элюированием смесью EtOAc/MeOH (от 100/0 до 70/30, 20 мин) с получением продукта 3.3 в виде белого твердого вещества (9,7 г, 26%).

Синтез соединения формулы I.b.1.i. (т.е. R4-SS-cKK-E12; ((3S,6S)-3,6-бис(4-(бис((S)-2-гидроксидодецил)амино)бутил)пиперазин-2,5-дион)). К раствору 3.3 (7,4 г, 12 ммоль) и NHS (1,38 г, 12 ммоль) в ДХМ (280 мл) добавляли ДЦК (2,97 г, 14,4 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 ч. Затем растворитель удаляли, а остаток (неочищенный 4.3) растворяли в ТФК (30 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем удаляли ТФК и к остатку добавляли ДХМ (30 мл) и совместно выпаривали с удалением остаточной ТФК. Неочищенный 5.3 растворяли в ДХМ (30 мл) и добавляли к безводному пиридину (480 мл) при 0°C в атмосфере  $N_2$ . Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре на протяжении ночи. Затем пиридин удаляли, а остаток разбавляли диэтиловым эфиром (300 мл). Образовавшееся белое твердое вещество удаляли фильтрованием. Фильтрат промывали водным раствором  $Na_2CO_3$  (1M, 150 мл) и насыщенным раствором хлорида натрия (150 мл), сушили над  $Na_2SO_4$  и выпаривали. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии пять раз (один на 330 г колонке, а затем четыре на 80 г колонке) с элюированием смесью 3%  $NH_4OH$ /7%  $MeOH$ /90%  $EtOAc$  с получением 1,05 г чистого R4-SS-cKK-E12 в виде бледной смолы.

## Пример 6. Соединение формулы I.b.1.ii (т.е. S4-SS-cKK-E12)



## Схема 7. Синтез соединения формулы I.b.1.ii (т.е. S4-SS-cKK-E12)



Синтез соединения 3 ( $N^2$ -(трет-бутоксикарбонил)- $N^6,N^6$ -бис((S)-2-гидроксидодецил)-L-лизин). Смесь S-эпоксида (5.2, 46 г, 250 ммоль), Вос-L-лизина 8.1 (15 г, 61 ммоль) и диизопропилэтиламина (11 мл) в метаноле (80 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 8 д. Летучие вещества удаляли, а желтый маслянистый остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле (330 г), с элюированием смесью EtOAc/MeOH (от 100/0 до 70/30, 20 мин) с получением продукта 3.4 в виде белого твердого вещества (22 г, 59%).

Синтез соединения формулы I.b.1.ii (т.е. S4-SS-cKK-E12; ((3S,6S)-3,6-бис(4-(бис((S)-2-гидроксидодецил)амино)бутил)пиперазин-2,5-дион). К раствору 3.4 (24,5 г, 40 ммоль) и NHS (4,6 г, 40 ммоль) в ДХМ (280 мл) добавляли ДЦК (9,9 г, 48 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Затем растворитель удаляли, а остаток (неочищенный 4.4) растворяли в ТФК (100 мл) при 0°C. Полученную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры и перемешивали в течение 45 мин. Затем удаляли ТФК и к остатку добавляли ДХМ (120 мл), а затем совместно выпаривали с удалением остаточной ТФК. Неочищенный 5.4 растворяли в безводном пиридине (1,6 л) при 0°C в атмосфере  $N_2$  и перемешивали полученную смесь при комнатной температуре на протяжении ночи. Затем пиридин удаляли с помощью ротационного испарителя, а остаток разбавляли диэтиловым эфиром (1 л). Образовавшееся белое твердое вещество удаляли фильтрованием и промывали диэтиловым эфиром (200 мл). Фильтрат промывали водным раствором  $Na_2CO_3$  (1 М, 500 мл) и насыщенным раствором хлорида натрия (500 мл), сушили над  $Na_2SO_4$  и выпаривали. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (330 г) с элюированием градиентом 0-50% (3%  $NH_4OH$ /7% MeOH/90% EtOAc)/EtOAc с получением 6,8 г TCX чистого S4-SS-cKK-E12 и 7,1 г S4-SS-cKK-E12 с незначительным количеством примесей. 6,8 г (6,8 ммоль) TCX чистого S4-SS-cKK-E12 растворяли в 120 мл эти-

лацетата. Добавляли  $\text{Wos}_2\text{O}$  (0,22 г, 1,0 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Растворитель удаляли, а остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (120 г) с элюированием градиентом 0-50% (3% $\text{NH}_4\text{OH}$ /7% $\text{MeOH}$ /90% $\text{EtOAc}$ )/ $\text{EtOAc}$  с получением 5,7 г (84%) чистого продукта S4-SS-cKK-E12, свободного от аминного побочного продукта.

Пример 7. Соединение формулы I.b.2.i (т.е. R4-RR-cKK-E12)

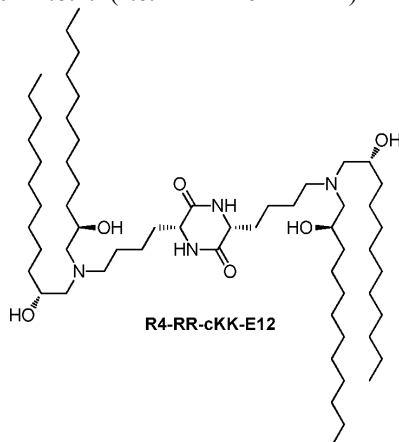
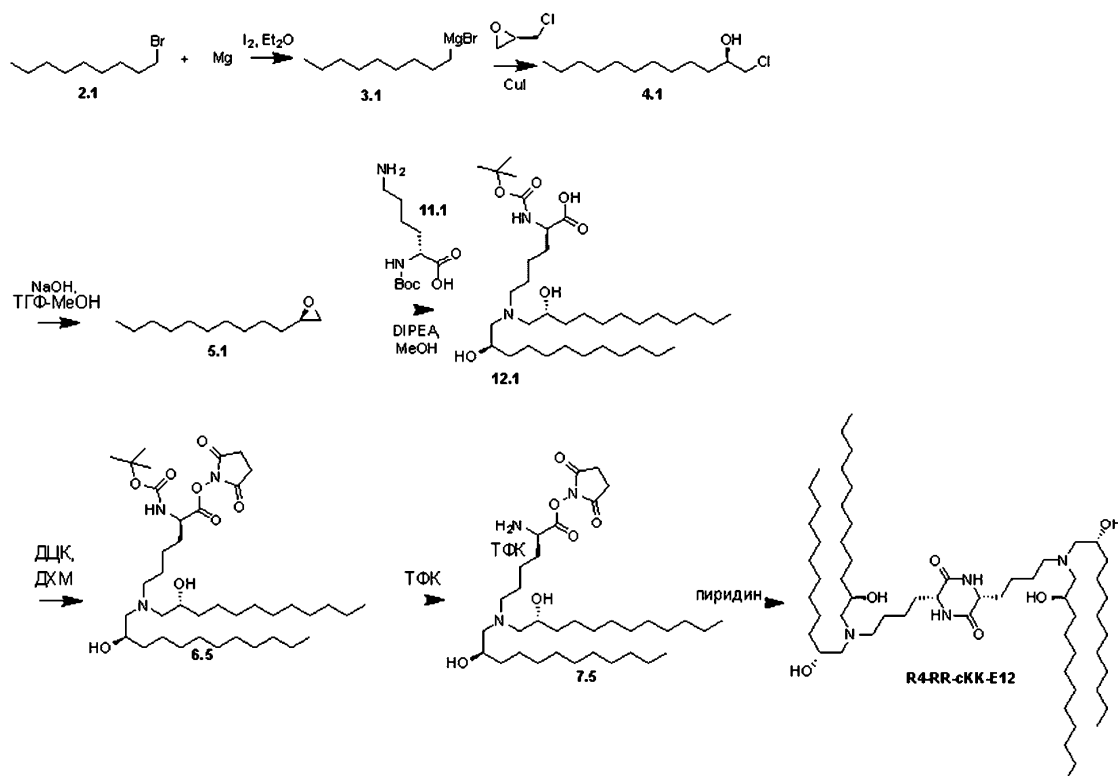


Схема 8. Синтез соединения формулы I.b.2.i (т.е. R4-RR-cKK-E12)



Синтез соединения 3.1. К магнию (60 г), суспендированному в безводном  $\text{Et}_2\text{O}$  (0,9 л), добавляли 1-бромнонан 2.1 (20 мл) с последующим добавлением каталитического количества йода (50 мг). Полученную смесь нагревали на горячей водяной бане до тех пор, пока не начиналась реакция  $\text{Mg}$  с 2.1. Баню убрали и добавляли оставшийся 1-бромнонан (379,1 мл) с поддержанием слабого кипения. После добавления 2.1 кипение поддерживали с помощью горячей водяной бани в течение еще 30 мин. Полученный в результате раствор Гриньяра 3.1 охлаждали и использовали непосредственно в следующей стадии.

Синтез соединения 4.1. К  $\text{CuI}$  (38,1 г), суспендированному в ТГФ (1,5 л) при  $-78^\circ\text{C}$ , добавляли R-(-)-эпихлоргидрин (156,8 мл). Затем с помощью канюли добавляли указанный выше раствор Гриньяра 3.1, при этом температуру реакции поддерживали на уровне  $<-65^\circ\text{C}$ . Полученную реакционную смесь перемешивали при  $-78^\circ\text{C}$  в течение еще 3 ч. Затем осторожно добавляли насыщенный водный раствор хлорида аммония (0,8 л) с последующим добавлением воды (1,0 л). Полученную смесь перемешивали и оставляли нагреваться до комнатной температуры. Органический слой отделяли, а водный слой экстрагировали  $\text{Et}_2\text{O}$  (0,5 л×2). Органический слой объединяли с экстрактами  $\text{Et}_2\text{O}$ , а полученный раствор промывали насыщенным раствором хлорида натрия (0,5 л×2) и сушили над безводным сульфатом магния. Растворители выпаривали в вакууме, а полученный остаток очищали на колонке с силикагелем (градиент от гек-

санов до 20% EtOAc/гексаны) с получением 4.1 (243,5 г, 55%) в виде желтого масла.

Синтез соединения 5.1. К раствору 4.1 (243,49 г) в соотношении 1: 2,6 MeOH-ТГФ (3,6 л), перемешиваемому при 0°C, медленно добавляли водный раствор NaOH (1,5 М, 0,89 л, 1,33 моль). Полученную смесь оставляли нагреваться и перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Анализ ТСХ показал полное исчезновение 4.1. Органические растворители выпаривали, а водный слой экстрагировали Et<sub>2</sub>O (1 л + 500 мл×2). Органические экстракты объединяли, промывали насыщенным раствором хлорида натрия (600 мл) и сушили над безводным сульфатом магния. Растворители выпаривали в вакууме с получением остатка, который очищали на колонке с силикагелем (градиент от гексанов до 10% EtOAc/гексаны) с получением эпоксида 5.1 (193,7 г, 95%) в виде светло-желтого масла.

Синтез соединения 12.1. Смесь N-Вос-D-лизина 11.1 (49,2 г, 0,2 моль) и эпоксида 5.1 (147,2 г, 0,8 моль) в MeOH (1,04 л) перемешивали при комнатной температуре. Добавляли DIPEA (51,9 г, 0,4 моль). Затем полученную смесь перемешивали в течение 8 дней, а затем выпаривали досуха. Остаток очищали на колонке с силикагелем (2 кг, MeOH/ДХМ, от 0 до 10%) с получением 49,2 г преимущественно чистого 12.1 (MZ-550-180) и 58,3 г 12.1 с примесями, который очищали с помощью второй колонки (1,5 кг, MeOH/EtOAc, от 10 до 40%) с получением 41,4 г преимущественно чистого 12.1. Две преимущественно чистые партии объединяли и перемешивали с EtOAc (0,5 л) в течение 3 ч. Смесь фильтровали с получением 41,4 г чистого 12.1 в виде белого твердого вещества. Фильтрат выпаривали досуха. Остаток перемешивали с EtOAc (0,1 л) в течение 1 ч и фильтровали с получением 10,6 г чистого 12.1. Фильтрат выпаривали досуха, а остаток очищали на колонке с силикагелем (330 г, MeOH/EtOAc, от 10 до 40%) с получением третьей партии, состоящей из 26,9 г чистого 12.1. Всего было получено 78,9 г чистого 12.1. Выход: 64%.

Получение соединения формулы I.b.2.i (т.е. R4-RR-сКК-E12). Партия 1. К раствору 12.1 (6,14 г, 10 ммоль) и N-гидроксисукцинимид (1,15 г, 10 ммоль) в ДХМ (70 мл) добавляли ДЦК (2,47 г, 12 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Летучие вещества выпаривали в вакууме с получением остатка (сложный эфир NHS 6.5), который растворяли в ТФК (25 мл) и перемешивали в течение 0,5 ч. ТФК удаляли в вакууме, а остаток (соединение 7.5) охлаждали до 0°C. Добавляли пиридин (безводный, 400 мл) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 2 ч. Удаляли пиридин в вакууме и суспендировали остаток в Et<sub>2</sub>O (300 мл). Твердое вещество удаляли фильтрованием. Фильтрат промывали 1М водного раствора Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (150 мл) и насыщенным раствором хлорида натрия (150 мл), сушили над безводным сульфатом магния и выпаривали досуха. Остаток отделяли с помощью колоночной хроматографии (80 г, 7:3 MeOH-NH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O (4×EtOAc)/EtOAc, от 0 до 50%) с получением R4-RR-сКК-E12 в виде смолистого твердого вещества (2,22 г). Неоднократные образования осадка и растирания с EtOAc приводили к получению чистого R4-RR-сКК-E12 (0,46 г) в виде смолы.

Пример 8. Соединение формулы I.b.2.ii (т.е. S4-RR-сКК-E12)

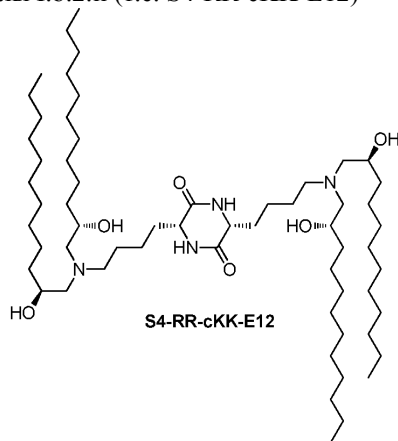
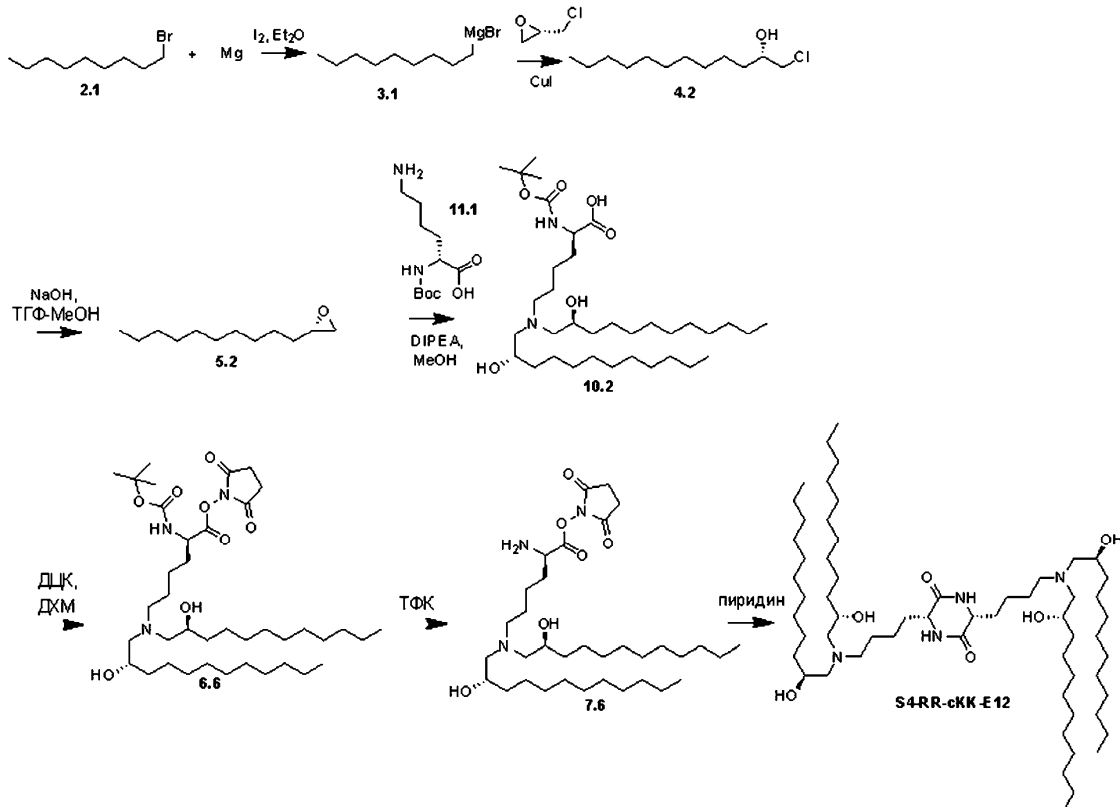


Схема 9. Синтез соединения формулы I.b.2.ii (т.е. S4-RR-сКК-Е12)



Синтез соединения 3.1. К магнию (60 г), суспендированному в безводном Et<sub>2</sub>O (0,9 л), добавляли 1-бромнонан 2.1 (20 мл) с последующим добавлением каталитического количества йода (50 мг). Полученную смесь нагревали на горячей водяной бане до тех пор, пока не начиналась реакция Mg с 2.1. Баню убрали и добавляли оставшийся 1-бромнонан (379,1 мл) с поддержанием слабого кипения. После добавления 2.1 кипение поддерживали с помощью горячей водяной бани в течение еще 30 мин. Полученный в результате раствор Гриньяра 3.1 охлаждали и использовали непосредственно в следующей стадии.

Синтез соединения 4.2. К CuI (38,1 г), суспендированному в ТГФ (1,5 л) при -78°C, добавляли S-(-)-эпихлоргидрин (156,8 мл). Затем с помощью канюли добавляли указанный выше раствор Гриньяра 3.1, при этом температуру реакции поддерживали на уровне <-65°C. Полученную реакционную смесь перемешивали при -78°C в течение еще 3 ч. Затем осторожно добавляли насыщенный водный раствор хлорида аммония (0,8 л) с последующим добавлением воды (1,0 л). Полученную смесь перемешивали и оставляли нагреваться до комнатной температуры. Органический слой отделяли, а водный слой экстрагировали Et<sub>2</sub>O (0,5 л×2). Органический слой объединяли с экстрактами Et<sub>2</sub>O, а полученный раствор промывали насыщенным раствором хлорида натрия (0,5 л×2) и сушили над безводным сульфатом магния. Растворители выпаривали в вакууме, а остаток очищали на колонке с силикагелем (градиент от гексанов до 20% EtOAc/гексаны) с получением 4.2 (250,8 г, 57%) в виде желтого масла.

Синтез соединения 5.2. К раствору 4.2 (250,8 г) в соотношении 1:2,6 MeOH-ТГФ (3,9 л), перемешиваемому при 0°C, медленно добавляли водный раствор NaOH (1,5M, 1,36 моль, 0,90 л). Полученную смесь оставляли нагреваться и перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Анализ ТСХ показал полное исчезновение 4.2. Органические растворители выпаривали, а водный слой экстрагировали Et<sub>2</sub>O (1 л + 500 мл×2). Органические экстракты объединяли, промывали насыщенным раствором хлорида натрия (600 мл) и сушили над безводным сульфатом магния. Растворители выпаривали в вакууме с получением остатка, который очищали на колонке с силикагелем (градиент от гексанов до 10% EtOAc/гексаны) с получением 5.2 (195,4 г, 93%) в виде светло-желтого масла.

Смесь N-Вос-D-лизина 11.1 (49,2 г, 0,2 моль) и эпоксида 5.2 (147,2 г, 0,8 моль) в MeOH (1,04 л) перемешивали при комнатной температуре. Добавляли DIPEA (51,9 г, 0,4 моль). Затем полученную смесь перемешивали в течение 8 дней, а затем выпаривали досуха. Полученный остаток очищали на колонке с силикагелем (2 кг, MeOH/EtOAc, от 10 до 30%) с получением 10.2 (79,9 г, 65%) в виде белого твердого вещества.

Получение соединения формулы I.b.2.ii (т.е. S4-RR-сКК-Е12). К раствору 10.2 (61,4 г, 100 ммоль) и N-гидроксисукцинимид (11,5 г, 100 ммоль) в ДХМ (800 мл) добавляли ДЦК (24,7 г, 120 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Летучие вещества выпаривали в вакууме с получением остатка (сложный эфир NHS 6.6), который растворяли в ТФК (25 мл) и перемешивали.

вали в течение 40 мин. ТФК удаляли в вакууме, а остаток (соединение 7.6) охлаждали до 0°C. Добавляли пиридин (безводный, 3,5 л) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 19 ч. Удаляли пиридин в вакууме и суспендировали остаток в Et<sub>2</sub>O (3,0 л). Твердое вещество удаляли фильтрованием. Фильтрат промывали 1М водным раствором Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,0 л) и насыщенным раствором хлорида натрия (1,0 л), сушили над безводным сульфатом магния и выпаривали досуха. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (4×330 г колонка с силикагелем, элюируемая смесью (7%MeOH/3%NH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O/90%EtOAc)/EtOAc, от 0 до 50%) с получением S4-RR-сКК-Е12 в виде смолистого твердого вещества (15,9 г, 16%).

#### Пример 9. Препараты.

Препараты, описанные в данном документе, состояли из многокомпонентной смеси липидов в различных соотношениях с использованием одного или более катионных липидов, вспомогательных липидов и ПЭГилированных липидов, выполненных с возможностью инкапсулирования различных материалов на основе нуклеиновых кислот. Катионным липидом, используемым повсеместно, является соединение формулы I (3,6-бис(4-(бис(2-гидроксидодецил)амино)бутил)пиперазин-2,5-дион). Вспомогательные липиды могут включать (но не исключительно) DSPC (1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин), DPPC (1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин), DOPE (1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфэтаноламин), DOPC (1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин), DPPE (1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфэтаноламин), DMPE (1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфэтаноламин), DOPG (1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфо-(1'-рац-глицерин)), холестерин и т.д. ПЭГилированные липиды могут содержать (но не исключительно) поли(этилен)гликолевую цепь длиной до 5 кДа, ковалентно связанную с липидом алкильной цепью (цепями) длиной C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>.

#### Материал матричной РНК.

Матричную РНК фактора IX человека (FIX), кодон-оптимизированной люциферазы светлячка (FFL) и кодон-оптимизированной аргининосукцинат-синтетазы человека (ASS1) синтезировали с помощью транскрипции *in vitro* из матрицы плазмидой ДНК, кодирующей ген, после чего добавляли 5'-кэп-структуру (Кэп 1) (Fechter P.; Brownlee G.G. "Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins" J. Gen. Virology 2005, 86, 1239-1249) и 3'-поли(А)-хвост из около 250 нуклеотидов в длину, как установлено с помощью электрофореза в геле. 5'- и 3'-нетранслируемые области, присутствующие в каждом продукте мРНК, представлены в виде X и Y, соответственно, и определены как указано (ниже).

#### Кодон-оптимизированная мРНК аргининосукцинат-синтетазы человека (ASS1)

XAUGAGCAGCAAGGGCAGCGUGGUGCUGGCCUACAGCGGCGGCCUGGACACCAGC  
UGCAUCCUGGUGUGGCUGAAGGAGCAGGGCUACGACGUGAUCGCCUACCUGGCCA  
ACAUCGGCCAGAAGGAGGACUUCGAGGAGGCCCGCAAGAAGGCCUGAAGCUGGG  
CGCCAAGAAGGUGUUAUCGAGGACGUGAGCCGCGAGUUCGUGGAGGAGUUAU  
CUGGCCCCGCAUCCAGAGCAGCGCCCCUGUACGAGGACCGCUACCUGCUGGGCACC  
AGCCUGGCCCCGCCCGUGCAUCGCCCCGCAAGCAGGUGGAGAUCGCCCAGCGCGAGG  
GCGCCAAGUACGUGAGCCACGGCGCCACCGGCAAGGGCAACGACCAGGUGCGCUU  
CGAGCUGAGCUGCUACAGCCUGGCCCCCAGAUCAAGGUGAUCGCCCCCUGGCGC  
AUGCCCCGAGUUCUACAACCGCUUCAAGGGCCGCAACGACCUGAUGGAGUACGCCA  
AGCAGCACGGCAUCCCCAUCCCCGUGACCCCCAAGAACCCUGGAGCAUGGACGA  
GAACCUGAUGCACAUCAGCUACGAGGCCGGCAUCCUGGAGAACCCCAAGAACCAG

GGGGGGGGGGCCUGUACACCAAGACCCAGGACCCCGCCAAGGGCCCCAACACCCC  
 CGACAUCUGGAGAUCGAGUUCAGAAGGGCGUGCCCGUGAAGGUGACCAACGU  
 GAAGGACGGCACCCACCCACCAGACCAGCCUGGAGCUGUUCUUGUACCUGAACGAG  
 GUGGCCGGCAAGCACGGCGUGGGCCGCAUCGACAUCGUGGAGAACCGCUUCAUCG  
 GCAUGAAGAGCCGCGGCAUCUACGAGACCCCGCCGGCACCAUCCUGUACCACGC  
 CCACCUGGACAUCGAGGCCUUCACCAUGGACCGCGAGGUGCGCAAGAUAAGCAG  
 GGCCUGGGCCUGAAGUUCGCCGAGCUGGUGUACACCGGCUUCUGGCACAGCCCCG  
 AGUGCGAGUUCGUGCGCCACUGCAUCGCCAAGAGCCAGGAGCGCGUGGAGGGCAA  
 GGUGCAGGUGAGCGUGCUGAAGGGCCAGGUGUACAUCUGGGCCGCGAGAGCCCC  
 CUGAGCCUGUACAACGAGGAGCUGGUGAGCAUGAACGUGCAGGGCGACUACGAG  
 CCCACCGACGCCACCGGCUUCAUCAACAUAACAGCCUGCGCCUGAAGGAGUACC  
 ACCGCCUGCAGAGCAAGGUGACCGCCAAGUGAY

*Последовательности 5'- и 3'-НТО:*

X =

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGACACC  
 GGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCCTCG  
 UGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG

Y =

CGGGUGGCAUCCUGUGACCCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGGCCUGGAAGUUGCC  
 ACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUC

Протокол составления препарата.

Аликвоты по 50 мг/мл спиртовых растворов одного или более соединений формулы I, DOPE, холестерина и DMG-PEG2K смешивали и разбавляли этанолом до 3 мл конечного объема. Отдельно готовили водный забуференный раствор (10 мМ цитрата/150 мМ NaCl, pH 4,5) мРНК ASS1 из 1 мг/мл исходного раствора. Липидный раствор быстро вводили в водный раствор мРНК и встряхивали с получением конечной суспензии в 20% этаноле. Полученную суспензию наночастиц фильтровали, диафильтровали с применением 1×PBS (pH 7,4), выпаривали и хранили при 2-8°C. Конечная концентрация = 0,64 мг/мл мРНК ASS1 (инкапсулированной).  $Z_{\text{средн.}} = 78 \text{ нм}$  ( $Dv_{(50)} = 46 \text{ нм}$ ;  $Dv_{(90)} = 96 \text{ нм}$ ).

Пример 10. Анализ белка ASS1, полученного с помощью внутривенно доставленных наночастиц, несущих мРНК ASS1.

Протокол инъектирования.

Все исследования проводили на самцах мышей CD-1 в возрасте около 6-8 недель на начало каждого эксперимента. Образцы вводили в хвостовую вену посредством однократной болюсной инъекции, эквивалентной общей дозе, составляющей 1,0 мг/кг (или другой указанной) инкапсулированной мРНК ASS1. Мышей умерщвляли и перфузировали физиологическим раствором в определенные моменты времени.

Выделение тканей органов для анализа.

Печень, селезенку, почку и сердце каждой мыши собирали, разделяли на отдельные части и хранили либо в 10% нейтральном забуференном формалине, либо мгновенно замораживали и хранили при -80°C для анализа.

Выделение плазмы для анализа.

Всех животных умерщвляли асфиксией CO<sub>2</sub> в определенные моменты времени после введения дозы ( $\pm 5\%$ ) с последующей торакотомией и терминальным забором крови из сердца. Цельную кровь (максимально допустимый объем) посредством пункции сердца умерщвленных животных собирают в пробирки для отделения сыворотки, дают свернуться при комнатной температуре в течение по меньшей мере 30 мин, центрифугируют при 22 $\pm$ 5°C при 9300 g в течение 10 мин и экстрагируют сыворотку. В случае промежуточного забора крови собирают около 40-50 мкл цельной крови посредством прокола лицевой вены или хвостового среза. Образцы, отобранные у необработанных животных, использовали в качестве исходных уровней ASS1 для сравнения с исследуемыми животными.

Анализ твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

ELISA ASS1 человека. Стандартные процедуры ELISA сопровождалось использованием IgG 2D1-2E12 к ASS1 мыши в качестве захватывающего антитела с IgG #3285 к ASS1 кролика в качестве вторичного (идентифицирующего) антитела (Shire Human Genetic Therapies). Козьи антитела к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP), использовали для активации раствора субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ). Реакцию гасили с помощью 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> через 20 мин. Детектирование кон-



тролировали путем абсорбции (450 нм) на приборе SpectraMax от Molecular Devices. Необработанную сыворотку и органы мышей и белок ASS1 человека использовали в качестве отрицательного и положительного контроля, соответственно.

Пример 11. Получение белка ASS1 человека *in vivo*.

Получение белка ASS1 человека с помощью кодон-оптимизированных несущих мПНК hASS1 липидных наночастиц, содержащих соединения формулы I, испытывали на мышах CD-1 в виде однократной болюсной внутривенной инъекции, описанной выше. Фиг. 1 иллюстрирует количество белка ASS1 человека, детектированного с помощью ELISA после обработки мышей несущими мПНК ASS1 человека липидными наночастицами, с различными рацемическими и хиральными соединениями формулы I, в дозах, составляющих 1,0 мг/кг. Мышей умерщвляли через двадцать четыре часа после инъекции и собирали органы, такие как печень.

Пример 12. Исследования токсичности.

Уровни экспрессии аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) измеряли для различных рацемических и хиральных соединений формулы I. Повышенные уровни экспрессии АСТ и/или АЛТ, как правило, вызваны средствами, которые вызывают гепатотоксичность. Хиральные соединения формулы I, как правило, давали более низкие уровни экспрессии АЛТ и/или АСТ, т.е. сопоставимые с проблемами более низкой гепатотоксичности, по сравнению со стереохимически необогащенными, или стереохимически менее обогащенными, композициями того же липида. См. приведенные ниже табл. 1 и 2.

Таблица 1

| Структура                                   | АЛТ (ед./л) | АСТ (ед./л) | ASS1 (нг/мг общего белка) |
|---------------------------------------------|-------------|-------------|---------------------------|
| Рацемическая смесь                          | 190 ± 43    | 212 ± 54    | 471 ± 309                 |
|                                             | 201 ± 89    | 403 ± 42    | 937 ± 337                 |
|                                             | 207 ± 84    | 425 ± 169   | 497 ± 213                 |
|                                             | 344 ± 57    | 555 ± 122   | 1387 ± 593                |
|                                             | 426 ± 112   | 757 ± 158   | 1509 ± 598                |
|                                             | 457 ± 274   | 728 ± 126   | 910 ± 327                 |
|                                             | 503 ± 201   | 653 ± 133   | 1010 ± 154                |
|                                             | 618 ± 503   | 638 ± 273   | 209 ± 169                 |
| S <sub>4</sub> с ядром рацемического лизина | 170 ± 40    | 132 ± 44    | 375 ± 244                 |
|                                             | 155 ± 57    | 157 ± 38    | 674 ± 147                 |
| R <sub>4</sub> с ядром рацемического лизина | 188 ± 22    | 265 ± 122   | 823 ± 215                 |
|                                             | 236 ± 163   | 237 ± 139   | 568 ± 248                 |
| Рацемическая –ОН с ядром SS лизина          | 378 ± 58    | 622 ± 76    | 117 ± 80                  |
|                                             | 618 ± 503   | 638 ± 273   | 209 ± 169                 |
| S <sub>4</sub> -S,S-cKKE12                  | 226 ± 71    | 384 ± 233   | 1121 ± 468                |
| R <sub>4</sub> -S,S-cKKE12                  | 175 ± 102   | 144 ± 35    | 449 ± 105                 |
| S <sub>4</sub> -S,R-cKKE12                  | 190 ± 75    | 193 ± 71    | 2303 ± 491                |
| R <sub>4</sub> -S,R-cKKE12                  | 75 ± 13     | 82 ± 12     | 264 ± 317                 |
|                                             | 86 ± 27     | 119 ± 32    | 1369 ± 233                |
|                                             | 94 ± 22     | 88 ± 16     | 467 ± 149                 |
|                                             | 59 ± 13     | 73 ± 18     | 401 ± 137                 |
|                                             | 139 ± 28    | 177 ± 73    | 1182 ± 150                |
|                                             | 180 ± 19    | 141 ± 25    | 750 ± 324                 |
|                                             | 269 ± 80    | 424 ± 156   | 2790 ± 464                |
|                                             | 123 ± 39    | 124 ± 22    | 1113 ± 35                 |
|                                             | 60 ± 4      | 49 ± 5      | 846 ± 226                 |
|                                             | 70 ± 10     | 78 ± 24     | 1082 ± 189                |

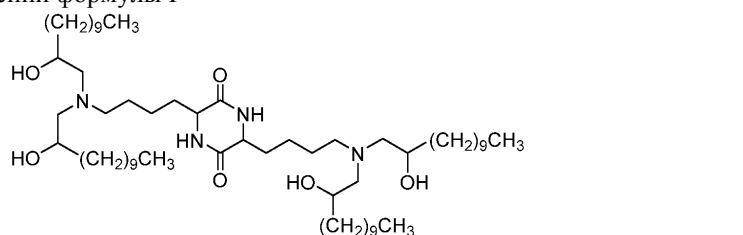
Таблица 2

| сКК-Е12 однократной внутривенной дозы. Через 24 часа препаратом, применяемым для скрининга, был сКК-Е12:DOPE:Chol:DMG-PEG2K | Присваивание структур | АЛТ       | АСТ       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------|-----------|
| Серия №1                                                                                                                    | "Рацемическая" смесь  | 885 ± 489 | 982 ± 350 |
|                                                                                                                             |                       | 207 ± 84  | 425 ± 169 |
|                                                                                                                             |                       | 504 ± 317 | 657 ± 176 |
|                                                                                                                             |                       | 503 ± 201 | 653 ± 133 |
| Серия №2                                                                                                                    |                       | 365 ± 152 | 604 ± 136 |
| Серия №3                                                                                                                    |                       | 401 ± 265 | 586 ± 193 |
|                                                                                                                             |                       | 197 ± 50  | 309 ± 33  |
|                                                                                                                             |                       |           |           |
| Серия №1                                                                                                                    | S <sub>4</sub> -SS    | 226 ± 71  | 384 ± 233 |
|                                                                                                                             |                       |           |           |
| Серия №1                                                                                                                    | R <sub>4</sub> -SS    | 175 ± 102 | 144 ± 35  |
|                                                                                                                             |                       |           |           |
| Серия №1                                                                                                                    | S <sub>4</sub> -RR    | 152 ± 9   | 180 ± 42  |
|                                                                                                                             |                       |           |           |
| Серия №1                                                                                                                    | R <sub>4</sub> -RR    | 136 ± 34  | 194 ± 80  |
|                                                                                                                             |                       |           |           |
| Серия №1                                                                                                                    | S <sub>4</sub> -RS/SR | 143 ± 29  | 240 ± 98  |
|                                                                                                                             |                       | 189 ± 47  | 203 ± 87  |
| Серия №2                                                                                                                    |                       | 190 ± 75  | 193 ± 71  |
|                                                                                                                             |                       |           |           |
| Серия №1                                                                                                                    | R <sub>4</sub> -RS/SR | 86 ± 27   | 119 ± 32  |
|                                                                                                                             |                       | 75 ± 13   | 82 ± 12   |
|                                                                                                                             |                       | 76 ± 4    | 79 ± 4    |
|                                                                                                                             |                       | 94 ± 22   | 88 ± 16   |
| Серия №2                                                                                                                    |                       | 269 ± 80  | 424 ± 156 |
| 139 ± 28                                                                                                                    |                       | 177 ± 73  |           |
| 180 ± 19                                                                                                                    |                       | 141 ± 25  |           |
| 91 ± 13                                                                                                                     |                       | 98 ± 18   |           |
| Серия №3                                                                                                                    |                       | 125 ± 47  | 104 ± 27  |
| Серия №4                                                                                                                    |                       | 94 ± 24   | 91 ± 14   |
| Серия №5                                                                                                                    |                       | 60 ± 4    | 49 ± 5    |
| Серия №6                                                                                                                    |                       | 70 ± 10   | 78 ± 24   |
| Серия №7                                                                                                                    |                       | 308 ± 115 | 354 ± 128 |
|                                                                                                                             |                       | 123 ± 39  | 124 ± 22  |

Несмотря на то что некоторые варианты реализации настоящего изобретения были описаны и проиллюстрированы в данном документе, специалистам в данной области техники будет легко представить себе множество других средств и/или структур для выполнения функций и/или получения результатов и/или одного или более преимуществ, описанных в данном документе, и каждая из таких вариаций и/или модификаций считается входящей в пределы объема данного изобретения. В более общем смысле специалисты в данной области техники легко поймут, что все параметры, размеры, вещества и конфигурации, описанные в данном документе, предназначены являться типовыми, и что фактические параметры, размеры, вещества и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения или применений, для которых используются принципы изобретения. Специалисты в данной области техники поймут или будут в состоянии определить множество эквивалентов конкретных вариантов реализации изобретения, описанных в данном документе, с применением не более чем рутинных экспериментов. Поэтому следует понимать, что указанные выше варианты реализации изобретения представлены только в качестве примера и что в пределах объема прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов изобретение может быть осуществлено на практике иначе, чем конкретно описано и заявлено. Изобретение относится к каждому отдельному признаку, системе, изделию, материалу, набору и/или способу, описанным в данном документе. Помимо этого, любая комбинация двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов, наборов и/или способов, если такие признаки, системы, изделия, материалы, наборы и/или способы не являются взаимно несогласованными, включается в объем изобретения.

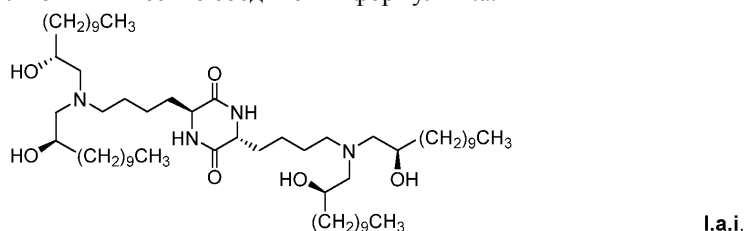
## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Катионная липидная композиция для доставки нуклеиновых кислот, содержащая одно или более химических соединений формулы I



его фармацевтически приемлемых солей, его сольватов или сольватов его фармацевтически приемлемых солей,

характеризующаяся тем, что более 50 мас.% общего количества химических соединений формулы I в композиции составляют химические соединения формулы I.a.i



2. Катионная липидная композиция по п.1, отличающаяся тем, что количество химических соединений формулы I.a.i составляет более 70%.

3. Катионная липидная композиция по п.1, отличающаяся тем, что количество химических соединений формулы I.a.i составляет более 80%.

4. Катионная липидная композиция по п.1, отличающаяся тем, что количество химических соединений формулы I.a.i составляет более 90%.

5. Композиция для доставки матричной РНК (мРНК) *in vivo*, содержащая мРНК, кодирующую белок, инкапсулированную в липосому, причем указанная липосома содержит катионную липидную композицию по любому из пп.1-4.

6. Композиция по п.5, отличающаяся тем, что липосома дополнительно содержит один или более некатионных липидов, один или более липидов на основе холестерина и/или один или более ПЭГ-модифицированных липидов, причем необязательно один или более некатионных липидов выбирают из DSPC (1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин), DPPC (1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин), DOPE (1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин), DOPC (1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин), DPPE (1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин), DMPE (1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин), DOPG (1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфо-(1'-рац-глицерин)).

7. Композиция по п.6, отличающаяся тем, что один или более липидов на основе холестерина представляет собой холестерин и/или ПЭГилированный холестерин.

8. Композиция по любому из пп.6, 7, отличающаяся тем, что один или более ПЭГ-модифицированных липидов содержат поли(этилен)гликолевую цепь длиной до 5 кДа, ковалентно связанную с липидом алкильной цепью (цепями) длиной C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>.

9. Композиция по любому из пп.5-8, отличающаяся тем, что липосома имеет размер менее чем примерно 250, 200, 150, 100, 75 или 50 нм.

10. Композиция по любому из пп.5-9, отличающаяся тем, что мРНК имеет длину, равную или составляющую более чем примерно 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 т.н.

11. Композиция по любому из пп.5-10, отличающаяся тем, что:

- (а) белок, кодируемый мРНК, представляет собой цитозольный белок; или
- (б) белок, кодируемый мРНК, представляет собой секретлируемый белок; или
- (в) белок, кодируемый мРНК, представляет собой фермент.

12. Композиция по любому из пп.5-11, отличающаяся тем, что белок, кодируемый мРНК, представляет собой внутриклеточный фермент.

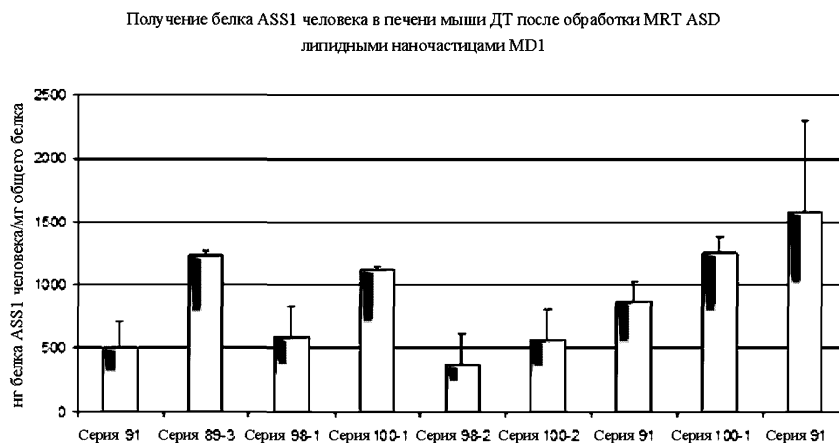
13. Композиция по п.12, отличающаяся тем, что белок, кодируемый мРНК, представляет собой фермент, ассоциированный с метаболическими нарушениями цикла мочевины или лизосомального накопления.

14. Композиция по любому из пп.5-11, отличающаяся тем, что белок, кодируемый мРНК, представляет собой трансмембранный белок.

15. Композиция по любому из пп.5-11, отличающаяся тем, что белок, кодируемый мРНК, представляет собой белок ионного канала.

16. Композиция по любому из пп.5-15, отличающаяся тем, что мРНК содержит один или более модифицированных нуклеотидов; причем необязательно один или более модифицированных нуклеотидов включает псевдоуридин, N-1-метилпсевдоуридин, 2-аминоаденозин, 2-тиотимидин, инозин, пирролопиримидин, 3-метиладенозин, 5-метилцитидин, C5-пропинилцитидин, C5-пропинилуридин, 2-аминоаденозин, C5-бромурин, C5-фторурин, C5-йодурин, C5-пропинилуридин, C5-пропинилцитидин, C5-метилцитидин, 2-аминоаденозин, 7-дезааденозин, 7-дезагуанозин, 8-оксоаденозин, 8-оксогуанозин, O(6)метилгуанин и/или 2-тиоцитидин.

17. Композиция по любому из пп.5-15, отличающаяся тем, что мРНК является немодифицированной.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2