

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036400**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.11.06

(51) Int. Cl. **C12N 15/87 (2006.01)**
C08F 8/32 (2006.01)

(21) Номер заявки
201600044

(22) Дата подачи заявки
2014.06.27

(54) КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ РНК В КЛЕТКИ

(31) **13174390.8; 13181380.0**

(32) **2013.06.28; 2013.08.22**

(33) **EP**

(43) **2016.06.30**

(86) **PCT/EP2014/063756**

(87) **WO 2014/207231 2014.12.31**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭТРИС ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
**Домен Кристиан, Планк Кристиан,
Рудольф Карстен, Кох Кристиан (DE)**

(74) Представитель:
**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,
Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) AZZAM T. ET AL.: "Dextran-spermine conjugate: an efficient vector for gene delivery", MACROMOLECULAR SYMPOSIA, WILEY VCH VERLAG, WEINHEIM, DE, vol. 195, no. 1, 2003, pages 247-261, XP003013580, ISSN: 1022-1360, DOI: 10.1002/MASY.200390130 scheme 1; figure 5
JOEL SUNSHINE ET AL.: "Small-Molecule End-Groups of Linear Polymer Determine Cell-type Gene-Delivery Efficacy", ADVANCED MATERIALS, vol. 21, no. 48, 28 December 2009 (2009-12-28), pages 4947-4951, XP055095832, ISSN: 0935-9648, DOI: 10.1002/adma.200901718 figure 1

WO-A2-2006066001

WO-A2-0009086

US-A1-2012301512

WO-A2-2010065660

WO-A1-2011154331

WO-A2-2010053572

WO-A1-2014066811

WO-A1-2014028487

(57) Описана композиция для введения РНК в клетку, содержащая одноцепочечную РНК и компонент, содержащий олиго(алкиленамин), где компонент выбран из олигомера, полимера и липидоида, содержащих характерные олиго(алкиленаминные) фрагменты. Описана также фармацевтическая композиция, содержащая указанную композицию, применение указанной композиции для введения РНК в клетку. Кроме того, описан способ введения РНК в клетку- или ткань-мишень, в котором используют указанную композицию.

B1**036400****036400****B1**

Настоящее изобретение относится к композиции, которая содержит, по меньшей мере, одноцепочечную РНК и компонент, содержащий олиго(алкиленамин), где компонент выбран из олигомера, полимера или липидоида, содержащего характерные олиго(алкиленаминные) фрагменты, и к способу введения РНК в клетку- или ткань-мишень с использованием указанной композиции. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям и к применению указанной композиции для введения РНК в клетку.

Возможность осуществления терапий на основе нуклеиновых кислот в конечном итоге зависит от доступности эффективных методов введения нуклеиновых кислот в клетки.

В целом, для трансфекции клеток путем введения нуклеиновых кислот в некоторых случаях возможно и достаточно использовать "оголенные" нуклеиновые кислоты (Wolff и др., *Science*, 247, 1990, сс. 1465-1468). Однако в большинстве рассматриваемых практических применений предпочтительно или даже необходимо объединять нуклеиновую кислоту, по меньшей мере, с вторым агентом, который защищает нуклеиновую кислоту от расщепления в процессе введения и/или облегчает доставку к ткани-мишени и распределение в ткани-мишени, и/или облегчает проникновение в клетку и обеспечивает возможность требуемого внутриклеточного процессинга. Указанные формы для введения нуклеиновых кислот в научной литературе обозначают как векторы. Ранее было описано множество соединений, которые можно применять для "векторизации" нуклеиновых кислот, так называемых трансфектирующих реагентов. Указанные соединения, как правило, представляют собой либо поликатионы, либо композиции, содержащие катионные липиды или липидоподобные соединения, такие как липидоиды (US 8450298). Комплексы нуклеиновых кислот с поликатионами называют полиплексами, а комплексы с катионными липидами называют липоплексами (Feigner и др., *Hum Gene Ther*, 8, 1997, сс. 511-512). Описаны также комплексы, которые содержат и поликатион, и липиды (Li и Huang в "Nonviral Vectors for Gene Therapy", изд-во Academic Press, гл. 13, 1999, сс. 295-303). Трансфектирующие реагенты применяют для связывания и уплотнения нуклеиновых кислот с получением первичных комплексов, размер которых находится в нанометровом диапазоне. В содержащих соль средах указанные комплексы имеют тенденцию к образованию агрегатов, что называют также индуцируемой солью агрегацией, что может обладать преимуществом для трансфекции клеточной культуры или локализованного введения *in vivo* (Ogris и др., *Gene Ther*, 5, 1998, сс. 1425-1433; Ogris и др., *AAPS Pharm Sci*, 3, 2001, E21). Можно избегать агрегации и можно стабилизировать комплексы нуклеиновых кислот с трансфектирующими реагентами посредством защиты поверхности с помощью полимеров, таких как поли(этиленгликоль). Защиту применяют также для того, чтобы избежать опсонизации и активации системы комплемента комплексами нуклеиновых кислот с трансфектирующими реагентами (Finsinger и др., *Gene Ther*, 7, 2000, сс. 1183-1192). Уплотнение нуклеиновых кислот с помощью трансфектирующих реагентов не только защищает их от расщепления нуклеазами, но также делает их пригодными для поглощения клетками путем эндоцитоза. Многочисленные линейные и разветвленные поликатионы можно применять для связывания и уплотнения нуклеиновых кислот, включая (но не ограничиваясь только ими) поли(этиленминные), поли(амидоаминные) (ПАМАМ) дендримеры, поли(2-(диметиламино)этилметакрилат) (пДМАЭМА) или катионные производные поли(N-(2-гидроксипропил)метакриламида) (пГПМА), сложные эфиры поли(β-амин) (Akinc и др., *Bioconj Chem* 14(5), 2003, сс. 979-988), встречающиеся в естественных условиях, и синтетические катионные поли(аминокислоты) или пептиды, такие как поли(лизины), гистоны, HMG-белки, или катионные углеводы, такие как хитозаны. Помимо полимеров, содержащих первичные, вторичные и/или третичные амины, указанные выше структуры, содержащие гуанидильные остатки, являются важным классом молекул для цели образования комплексов с нуклеиновыми кислотами и их введения. Модифицированные гуанидильным остатком полимеры типа структур на основе аргинина (Yamanouchi и др., *Biomaterials* 29(22), 2008, сс. 3269-3277), ПАМАМ, модифицированные аргинином (Son и др., *Bull. Korean Chem. Soc.* т. 34, № 3, 2013), или гуанидинированный-ПЭИ (полиэтиленмин) (Lee и др., *Bull. Korean Chem. Soc.* т. 29, № 3, 2008) обладают выраженной эффективностью в таких системах. Прежде всего, в случае взаимодействия с РНК молекулярные характеристики гуанидильного остатка обуславливают уникальные связывающие свойства (Calnan и др., *Science* 252(5009), 1991, сс. 167-1171). Можно применять методы создания таких структур, которые обобщены у Katritzky и Rogovoy (Katritzky и Rogovoy, *ARKIVOC* (iv), 2005, сс. 49-87). Часто полиплексы дополнительно модифицируют так, чтобы они содержали фрагмент, мишенью которого являются клетка или внутриклеточная область и/или дестабилизирующий мембрану компонент, такой как инактивированный вирус (Curiel и др., *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 1991, сс. 8850-8854), вирусный капсид или вирусный белок или пептид (Fender и др., *Nat Biotechnol*, 15, 1997, сс. 52-56, Zhang и др., *Gene Ther*, 6, 1999, сс. 171-181) или разрушающий мембрану синтетический пептид (Wagner и др., *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 1992, сс. 7934-7938, Plank и др., *J. Biol. Chem.*, 269, 1994, сс. 12918-12924).

После поглощения посредством эндоцитоза комплексы секвистрируются во внутриклеточных пузырьках, таких как эндосомы и лизосомы, в которых они доступны для клеточного механизма расщепления. Таким образом, установлено, что способность избегать внутриклеточных пузырьков имеет решающее значение для эффективного функционального введения нуклеиновых кислот, это требование относится также к функциональному инфицированию вирусами (Wagner и др., *Proc Natl Acad Sci USA*, 89,

1992, сс. 7934-7938, Plank и др., J. Biol. Chem., 269, 1994, сс. 12918-12924). Для достижения эффективного введения нуклеиновых кислот с помощью синтетических векторов осуществляли имитацию механизмов, которые в природе участвуют в инвазионной способности вирусов. Для этой цели в дополнение к поликатионным трансфектирующим реагентам с большим успехом использовали амфифильные дестабилизирующие мембраны пептиды, такие как пептиды INF, GALA и KALA, или мелиттин и производные мелиттина (Boeckle и др., J. Control Release, 2006, сс. 112, 240-248), которые обладали функциональной способностью избегать ("спасаться от") эндосом (Plank и др., Adv Drug Deliv Rev, 34, 1998, сс. 21-35). В липоплексах такая функциональность определяется способностью их липидных фрагментов сливаться с клеточными мембранами (Хи и Szoka, Biochemistry, 35, 1996, сс. 5616-5623, Zelfathi и Szoka Proc Natl Acad Sci USA, 93, 1996, сс. 11493-11498). Из основополагающей статьи Boussif с соавт. (Boussif и др., Proc Natl Acad Sci USA, 92, 1995, сс. 7297-7301) известно, что функциональность полиплексов, состоящую в способности избегать эндосомы, можно реализовать с помощью физико-химических путей. Когда в качестве поликатиона для формирования полиплексов применяют поли(этиленимин) (ПЭИ), то его забуферивающая способность при кислых значениях pH оказывается достаточной для запуска механизма избегания эндосом. Известно, что полость эндосом подкисляется с помощью протонного насоса, присутствующего в эндосомальных мембранах (Lafourcade и др., PLoS One, 3, 2008, e2758). Это подкисление запускает механизм избегания эндосом у некоторых вирусов, таких как вирус гриппа или аденовирус. Теория так называемой протонной губки, подтвержденная экспериментальными данными, описывает предполагаемое механистическое действие полимеров, обладающих химическими структурными особенностями ПЭИ: основная фракция аминокрупп ПЭИ является непротонированной при нейтральном (физиологическом) значении pH (Ziebarth и Wang Biomacromolecules, 11, 2010, сс. 29-38). Посредством протонированных и поэтому положительно заряженных аминокрупп ПЭИ-подобные полимеры могут связываться с нуклеиновыми кислотами и уплотнять их. Непротонированные амины могут становиться протонированными при кислом значении pH, и в результате обладать забуферивающей способностью в эндосомах. Подкисление эндосом с помощью протонного насоса приводит к накоплению хлоридных ионов (Sonawane и др., J. Biol. Chem., 278, 2003, сс. 44826-44831). В присутствии в эндосомальной полости забуферивающей молекулы, такой как ПЭИ, протонный насос должен обеспечивать челночный транспорт большего, чем в случае ее отсутствия, количества протонов в эндосомальной полости, наряду с накоплением хлоридов, вплоть до достижения естественного для эндосом кислого значения pH. Непропорциональное накопление ионов внутри эндосом, вероятно, приводит к осмотической дестабилизации пузырьков, приводя в конце концов к разрушению пузырьков и высвобождению содержащего нуклеиновую кислоту комплекса в цитоплазму.

Многочисленные исследователи использовали структурные особенности ПЭИ для создания на основе теории протонной губки новых библиотек полимеров, содержащих амины с забуферивающими свойствами при кислых значениях pH. В US 7780957 и US 7829657 Kataoka с соавт. описали полимеры на основе каркаса поли(глутаминовой кислоты) или поли(аспарагиновой кислоты), в которых боковые цепи карбоновых кислот дериватизировали с помощью аминных боковых цепей, которые могут протонироваться при кислых значениях pH. Однако богатое структурное многообразие олиго(алкиленаминов), содержащих чередующиеся неидентичные алкиленаминовые звенья в качестве усиливающих трансфекцию фрагментов в поликатионах, пока не исследовано. В частности, ранее не было изучено для трансфекции мРНК.

В противоположность этому многие из научных работ Kataoka с соавт. сфокусированы на поли{N-[N'-(2-аминоэтил)-2-аминоэтил]аспартамиде}. В публикации Uchida и др., J. Am. Chem. Soc., 133, 2001, сс. 15524-15532) авторы оценивали эту же группу в сериях N-замещенных полиаспартамидов, несущих повторяющиеся аминоэтиленовые звенья в боковых цепях общей формулы $-(CH_2-CH_2-NH)_n-H$. Важно отметить, что когда указанные авторы оценивали эффективность семейства полимеров в отношении трансфекции плазмидной ДНК, то было обнаружено выраженное "нечетно-четное" действие повторяющихся аминоэтиленовых звеньев в боковой цепи полимера на эффективность в отношении избегания эндосом и трансфекции на нескольких клеточных линиях. Полиплексы из полимеров с четным количеством повторяющихся аминоэтиленовых звеньев (PA-Es) обладали на порядок более высокой трансфектирующей эффективностью без заметной цитотоксичности по сравнению с полимерами с нечетным количеством повторяющихся аминоэтиленовых звеньев (PA-Os). Такое нечетно-четное действие согласуется с забуферивающей способностью указанных полимеров, а также с их способностью разрушать целостность мембран избирательно при характерном для эндосом значении pH, приводя к высокой эффективности в отношении избегания эндосом PA-E-полиплексов. Кроме того, установлено, что образование мновалентных заряженных конструкций с определенным расстоянием между протонированными аминокруппами в боковой цепи полимера имеет решающее значение для эффективного разрушения эндосомальной мембраны, облегчая тем самым транспорт полиплекса в цитоплазму (Uchida и др., J. Am. Chem. Soc., 133, 2011, сс. 15524-15532 (реферат)). Важно отметить, что когда одна и та же группа исследователей сравнивали поли(аспартамидные) производные, несущие боковые цепи с 1,2-диаминоэтаном [PAsp(DET)], и аналоги, несущие боковые цепи с 1,3-диаминопропаном [PAsp(DPT)], они обнаружили, что PAsp(DPT)-полиплексы обладали существенно более низкой эффективностью в отношении транс-

фекции плазмидной ДНК при высоких соотношениях N/P из-за прогрессивно возрастающей с увеличением соотношения N/P цитотоксичности, даже с учетом того, что физико-химические различия с [PAsp(DET)] касательно размера частиц и ζ -потенциала были незначительными (Miyata и др., J. Am. Chem. Soc., 130, 2008, сс. 16287-16294). Таким образом, на основе правила нечетности-четности можно ожидать, что полимеры, содержащие 3 обладающие способностью протонироваться аминогруппы и пропиленовые спейсерные группы, должны быть хуже, чем PAsp(DET), и что с содержащими 1,3-диаминопропан боковыми цепями ассоциированы связанные с токсичностью проблемы. Для таких полимеров отсутствуют данные о взаимосвязи структура-активность в отношении трансфекции мРНК.

Geall с коллегами описали карбаматы холестерин-полиаминов, в которых полиаминный фрагмент имел общую формулу $-\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$, в которой m обозначает 0, 1 или 2, и в которой n обозначает 0 или 1 (Geall и др., FEBS Lett, 459, 1999, сс. 337-342). Они определили величины pK_a указанных субстанций и характеристики, касающиеся конденсации ДНК тимуса телят. Они установили, что региохимическое распределение положительных зарядов в карбаматах холестерин-полиаминов играет важную роль в модуляции аффинности связывания ДНК и эффективности липофекции. Они установили, что из изученных карбаматов холестерин-полиаминов спермин, состоящий из полиаминного фрагмента, $-\text{HN}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ (пропил/бутил/пропил), обеспечивал наиболее высокую экспрессию репортерного гена после трансфекции кодирующей β -галактоидазу плазмидной ДНК в клеточной культуре, в то время как, например, $-\text{HN}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ (этил/пропил/этил) оказался в 3-10 раз менее эффективным. Таким образом, в свете данных, полученных Катаока с соавт. (правило нечетности-четности), и данных, полученных Geall с соавт., специалист в данной области может не рассматривать последнюю структуру в контексте введения нуклеиновых кислот.

Wang с соавт. описали привитые сополимеры поли(метилметакрилата) и олигоаминов в качестве эффективных и обладающих низкой токсичностью трансфетирующих реагентов для плазмидной ДНК (Wang и др., Molecular BioSystems, 6, 2010, сс. 256-263). Эти полимеры получали путем аминолита поли(метилметакрилата) с олигоаминами общей формулы $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_m-\text{NH}_2$, в которой m обозначает 1, 2 или 3. Авторы установили, что эффективность трансфекции повышалась с увеличением длины аминов.

Ои с соавторами описали поли(дисульфидамидоамины), полученные из защищенных на конце олигоаминов, имеющих структуру $\text{Dde}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_a-\text{NH}-(\text{CH}_2)_b-\text{NH}-(\text{CH}_2)_a-\text{NH}-\text{Dde}$, путем сополимеризации с $\text{N}_2\text{N}'$ -дистаминбисакриламидом (Ou и др., Biomaterials 30, 2009, сс. 5804-5814; WO 2010/065660). Они изучали комбинации, в которых a обозначает 2 и b обозначает 2, a обозначает 2 и b обозначает 3, a обозначает 3 и b обозначает 2, a обозначает 3 и b обозначает 3, a обозначает 3 и b обозначает 4 (спермин). Dde обозначает защитную группу, 2-ацетилдимедон. После удаления защитной группы в результате синтеза получают поли(дисульфидамидоамины), в которых внутренние исходно вторичные амины становятся третичными аминами в качестве части главной цепи полимера, а концевые амины становятся частью концевых этилен- или пропиленаминовых боковых цепей. Указанные полимеры обладают буферизирующей способностью в диапазоне значений pH, пригодных для введения нуклеиновых аминокислот и пригодных для трансфекции клеток плазмидной ДНК.

В последние годы описано применение нового класса липидоподобных и нелипидных синтетических структур, так называемых липидоидов, для введения нуклеиновых кислот *in vitro* и *in vivo* (US 8450298; Love и др., PNAS 107, 2010, сс. 1864-1869; WO 2006/138380; Akinc и др., Nat Biotechnol 26, 2008, сс. 561-569). Липидоиды получают путем взаимодействия содержащих амин соединений с алифатическими эпоксидами, акрилатами, акриламидами или альдегидами. Указанные авторы/заявители разработали процедуры синтеза для получения библиотек липидоидов и процедуры скрининга для отбора ценных соединений, которые можно применять для введения нуклеиновых кислот в клетки *in vitro*.

Как видно из вышесказанного, многие из ранее проведенных научно-исследовательских работ касались введения и других молекул нуклеиновых кислот, таких как плазмидная ДНК, олигонуклеотиды, siРНК или аналоги нуклеиновых кислот. Введение мРНК не было изучено столь глубоко. Некоторые авторы считали, что соединения и композиции, которые хорошо зарекомендовали себя в случае введения ДНК или siРНК, должны "работать" также и в случае введения мРНК. Однако в отличие от плазмидной ДНК или siРНК, мРНК представляет собой одноцепочечную молекулу. Поэтому, принимая во внимание структурные особенности, можно ожидать другие требования к соединениям и композициям, предназначенным для введения мРНК, по сравнению с предназначенным для введения ДНК или siРНК.

В процитированной выше литературе описано введение двухцепочечных нуклеиновых кислот, таких как плазмидная ДНК или siРНК, в клетки, однако остается неизвестным, можно ли применять описанные методы и соединения для введения в клетки одноцепочечных нуклеиновых кислот, таких как мРНК. Следует подчеркнуть, что ранее установлено, что трансфекция клеток мРНК существенно отличается от трансфекции плазмидной ДНК (Bettinger и др., Nucleic Acids Res, 29, 2001, сс. 3882-3891, Uzgun и др., Pharm Res, 28, 2011, сс. 2223-2232).

В соответствии с вышесказанным при создании настоящего изобретения в результате скрининга

более 100 представителей семейства полимеров, описанных в WO 2011/154331, в отношении возможности их применения для введения в клетки РНК, предпочтительно для введения одноцепочечной РНК, такой как мРНК, было установлено, что ни одно из указанных соединений не оказалось приемлемым для такой трансфекции мРНК, при которой повышался бы уровень экспрессии гена, кодируемого мРНК. И, наоборот, все указанные соединения обладали эффективностью в отношении введения ДНК и/или siРНК. Таким образом, установленные правила, касающиеся введения двухцепочечных нуклеиновых кислот в клетки, не применимы априори к введению одноцепочечной мРНК. В WO 2011/154331 описаны олигомеры с определенной химической структурой, содержащие 2-60 единиц олиго(алкиленамино)кислотных звеньев, которые соответствуют общей формуле $\text{HOOC-Z-R-NH-}[(\text{CH}_2)_b\text{-NH}]_a\text{-H}$, в которой Z обозначает серии метиленовых или различных других группировок, R обозначает метилен или карбоксильный остаток и a и b независимо друг от друга обозначают целые числа от 1 до 7 или от 2 до 7 соответственно. Олигомеры этого семейства содержат способные протонироваться аминогруппы, которые могут создавать эффект так называемой протонной губки и, как установлено, обладают высокой активностью в отношении трансфекции плазмидной ДНК и siРНК *in vitro* и *in vivo*. Важно отметить, что в WO 2011/154331 и связанных научных публикациях очень подробно описан метод создания в зависимости от последовательности библиотек олигомеров/полимеров из конструктивных блоков, соответствующих общей формуле $\text{HOOC-Z-R-NH-}[(\text{CH}_2)_b\text{-NH}]_a\text{-H}$.

Таким образом, в основу настоящего изобретения положена задача создать композицию, пригодную для введения с высокой эффективностью в клетку или ткань одноцепочечной РНК, такой как мРНК.

Решение указанной задачи представлено в вариантах осуществления изобретения, охарактеризованных в формуле изобретения и дополнительно более подробно проиллюстрированных в приведенном ниже подробном описании изобретения и примерах. В частности, изобретение описано с помощью следующих различных вариантов осуществления изобретения, дополнительно представленных в настоящем описании:

композиции, содержащие указанные олигомеры, полимеры или липидоиды, которые содержат олиго(алкиленамины), содержащие чередующиеся не идентичные алкиленаминные звенья в комбинации с мРНК, которые применят для введения одноцепочечной РНК, такой как мРНК, в клетку или ткань,

способы применения указанных композиций для введения РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, в клетку- или ткань-мишень, а также

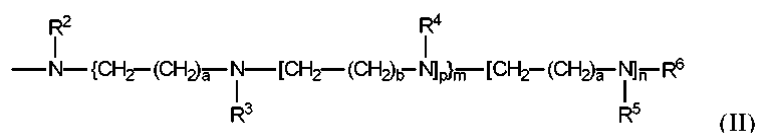
применение указанной композиции для введения РНК в клетку и фармацевтические композиции.

Богатое структурное многообразие олиго(алкиленаминов), содержащих чередующиеся неидентичные алкиленаминные звенья в олигомерных или полимерных соединениях, включая линейные, разветвленные и дендритные соединения со случайной или определенной последовательностью, или липидоидные соединения, входящие в композицию, которую можно применять для введения РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, в клетку, пока не исследовано. Ранее никогда не было изучено многообразие последовательностей указанных соединений.

При создании изобретения неожиданно был установлен ранее неизвестный общий принцип для олигомеров, полимеров и липидоидов, состоящий в том, что расположение алкиленаминных звеньев группами из трех или большего количества звеньев, чередующихся по длине, и наличие этиленаминного звена в композициях для введения одноцепочечной РНК в клетки, предпочтительно мРНК, оказалось существенно более эффективным, чем аналогичные расположения алкиленаминных единиц с нечередующейся длиной.

В частности, первым объектом изобретения является композиция, содержащая РНК, а именно одноцепочечную РНК, предпочтительно мРНК, и компонент, содержащий олиго(алкиленамин), где указанный компонент выбран из

а) олигомера или полимера, содержащего множество групп формулы (II) в качестве боковой цепи и/или концевой группы



где переменные a, b, p, m, n и $\text{R}^2\text{-R}^6$ имеют указанные ниже значения независимо в каждой группе формулы (II) во множестве указанных групп:

a обозначает 1 и b обозначает целое число от 2 до 4; или a обозначает целое число от 2 до 4 и b обозначает 1,

p обозначает 1 или 2,

m обозначает 1 или 2;

n обозначает 0 или 1 и

$m+n \geq 2$;

$\text{R}^2\text{-R}^5$, каждый независимо друг от друга, выбран из водорода; группы $\text{-CH}_2\text{-CH(OH)-R}^7$, $\text{-CH(R}^7\text{)-}$

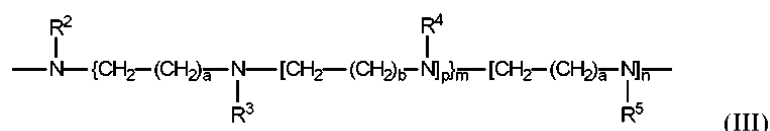
$\text{CH}_2\text{-OH}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(C=O)-O-R}^7$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(C=O)-NH-R}^7$ или $\text{-CH}_2\text{-R}^7$, где R^7 выбран из $\text{C}_3\text{-C}_{18}$ -алкила или $\text{C}_3\text{-C}_{18}$ -алкенила, имеющего одну двойную связь C-C ;

R^6 выбран из водорода; группы $\text{-CH}_2\text{-CH(OH)-R}^7$, $\text{-CH(R}^7\text{)-CH-OH}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(C=O)-O-R}^7$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(C=O)-NH-R}^7$ или $\text{-CH}_2\text{-R}^7$, где R^7 выбран из $\text{C}_3\text{-C}_{18}$ -алкила или $\text{C}_3\text{-C}_{18}$ -алкенила, имеющего одну двойную связь C-C ; и -C(NH)-NH_2 ;

где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (II), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионной группы формулы (II),

и где полимерный или олигомерный каркас полимера или олигомера содержит множество групп формулы (II) в качестве боковой цепи и/или концевой группы, обеспеченные полимерным или олигомерным каркасом, выбранным из поли(аминокислот), содержащих множество звеньев глутаминовой или аспарагиновой кислоты, полиакриловой кислоты, полиметакриловой кислоты, сополимера этилакрилата и акриловой кислоты и сополимера метилметакрилата и метакриловой кислоты;

б) олигомера или полимера, содержащего множество групп формулы (III) в виде повторяющихся звеньев



где переменные a , b , p , m , n и $\text{R}^2\text{-R}^5$ независимо друг от друга имеют указанные ниже значения для каждой группы формулы (III) во множестве указанных групп:

a обозначает 1 и b обозначает целое число от 2 до 4; или a обозначает целое число от 2 до 4 и b обозначает 1,

p обозначает 1 или 2,

m обозначает 1 или 2;

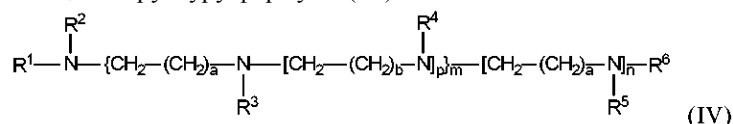
n обозначает 0 или 1 и

$m+n \geq 2$;

$\text{R}^2\text{-R}^5$, каждый независимо друг от друга, выбран из водорода; группы $\text{-CH}_2\text{-CH(OH)-R}^7$, $\text{-CH(R}^7\text{)-CH}_2\text{-OH}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(C=O)-O-R}^7$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(C=O)-NH-R}^7$ или $\text{-CH}_2\text{-R}^7$, где R^7 выбран из $\text{C}_3\text{-C}_{18}$ -алкила или $\text{C}_3\text{-C}_{18}$ -алкенила, имеющего одну двойную связь C-C ; и -C(NH)-NH_2 ;

и где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (III), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионной группы формулы (III); и

в) липидоида, имеющего структуру формулы (IV)



в которой переменные a , b , p , m , n и $\text{R}^1\text{-R}^6$ имеют указанные ниже значения:

a обозначает 1 и b обозначает целое число от 2 до 4; или a обозначает целое число от 2 до 4 и b обозначает 1,

p обозначает 1 или 2,

m обозначает 1 или 2;

n обозначает 0 или 1 и

$m+n \geq 2$;

$\text{R}^1\text{-R}^6$, каждый независимо друг от друга, выбран из водорода; группы $\text{-CH}_2\text{-CH(OH)-R}^7$, $\text{-CH(R}^7\text{)-CH}_2\text{-OH}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(C=O)-O-R}^7$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(C=O)-NH-R}^7$ или $\text{-CH}_2\text{-R}^7$, где R^7 выбран из $\text{C}_3\text{-C}_{18}$ -алкила или $\text{C}_3\text{-C}_{18}$ -алкенила, имеющего одну двойную связь C-C ; и -C(NH)-NH_2 ; при условии, что по меньшей мере два остатка из $\text{R}^1\text{-R}^6$ обозначают группу $\text{-CH}_2\text{-CH(OH)-R}^7$, $\text{-CH(R}^7\text{)-CH}_2\text{-OH}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(C=O)-O-R}^7$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(C=O)-NH-R}^7$ или $\text{-CH}_2\text{-R}^7$, где R^7 выбран из $\text{C}_3\text{-C}_{18}$ -алкила или $\text{C}_3\text{-C}_{18}$ -алкенила, имеющего одну двойную связь C-C ; и где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (IV), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионного липидоида формулы (IV).

Другим объектом изобретения являются фармацевтические композиции, которые содержат композиции, предлагаемые в изобретении.

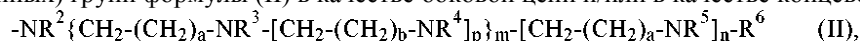
Дополнительными объектами изобретения являются применение композиции, предлагаемой в изобретении, для введения одноцепочечной РНК, предпочтительно мРНК, в клетку-мишень или ткань-мишень и способ введения РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, в клетку- или ткань-мишень, заключающийся в том, что осуществляют стадию, на которой приводят в контакт композицию, предлагаемую в изобретении, с клеткой- или тканью-мишенью.

Олиго(алкиленаминные) группы.

Олиго(алкиленаминные) структуры формул (II), (III) и (IV) отличаются тем, что они объединяют более короткие (обозначенные с целью иллюстрации как "S") этиленаминные звенья (т.е. a или b обозначает 1) с более длинными (обозначенными также с целью иллюстрации как "L") алкиленаминными зве-

ниями (т.е. другая одна из переменных а или b обозначает целое число от 2 до 4) чередующимся образом. При создании изобретения неожиданно было установлено, что такое расположение звеньев, которые могут протонироваться, обеспечивает преимущество с позиций пригодности образовавшейся группы представлять собой носитель для введения РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, в клетку.

Как отмечалось выше, олигомеры или полимеры, которые можно применять в композициях, указанных в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения, содержат множество олиго(алкиленаминных) групп формулы (II) в качестве боковой цепи и/или в качестве концевой группы



где переменные а, b, p, m, n и R^2 - R^6 независимо друг от друга имеют указанные ниже значения для каждой группы формулы (II) во множестве указанных групп:

а обозначает 1 и b обозначает целое число от 2 до 4; или а обозначает целое число от 2 до 4 и b обозначает 1,

p обозначает 1 или 2,

m обозначает 1 или 2;

n обозначает 0 или 1 и

$m+n \geq 2$;

R^2 - R^5 , каждый независимо друг от друга, выбран из водорода; группы $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}^7$, $-\text{CH}(\text{R}^7)-\text{CH}_2-\text{OH}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-\text{R}^7$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-\text{R}^7$ или $-\text{CH}_2-\text{R}^7$, где R^7 выбран из C_3 - C_{18} -алкила или C_3 - C_{18} -алкенила, имеющего одну двойную связь;

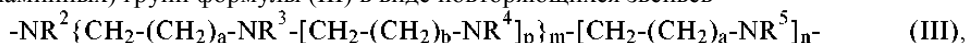
R^6 выбран из водорода; группы $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}^7$, $-\text{CH}(\text{R}^7)-\text{CH}_2-\text{OH}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-\text{R}^7$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-\text{R}^7$ или $-\text{CH}_2-\text{R}^7$, где R^7 выбран из C_3 - C_{16} -алкила или C_3 - C_{16} -алкенила, имеющего одну двойную связь C-C.

Предпочтительно R^2 - R^5 обозначают водород и R^6 выбран из водорода. Предпочтительно R^7 выбран из C_8 - C_{18} -алкила или C_8 - C_{18} -алкенила, имеющего одну двойную связь C-C, и более предпочтительно из C_8 - C_{12} -алкила или C_8 - C_{12} -алкенила, имеющего одну двойную связь C-C, и наиболее предпочтительно из C_{10} - C_{12} -алкила или C_{10} - C_{12} -алкенила, имеющего одну двойную связь C-C.

Один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (II) или ее предпочтительных вариантах, может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионной группы формулы (II).

"Множество групп формулы (II)" обозначает, что в олигомерах или полимерах, предлагаемых в изобретении, содержатся две или большее количество, предпочтительно три или большее количество, групп формулы (II) или ее предпочтительных вариантов. В полимерах, которые содержат множество групп формулы (II), предпочтительно присутствует 10 или большее количество групп формулы (II). Следует понимать, что группы формулы (II) или ее предпочтительных вариантов могут иметь одинаковую структуру в полимере или олигомере или могут иметь две или большее количество различных структур, подпадающих под объем формулы (II).

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения олигомеры или полимеры, которые можно применять в композициях, предлагаемых в изобретении, содержат множество олиго(алкиленаминных) групп формулы (III) в виде повторяющихся звеньев



где переменные а, b, p, m, n и R^2 - R^5 независимо друг от друга имеют указанные ниже значения для каждой группы формулы (III) во множестве указанных групп:

а обозначает 1 и b обозначает целое число от 2 до 4; или а обозначает целое число от 2 до 4 и b обозначает 1,

p обозначает 1 или 2,

m обозначает 1 или 2;

n обозначает 0 или 1 и

$m+n \geq 2$;

R^2 - R^5 , каждый независимо друг от друга, выбран из водорода; группы $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}^7$, $-\text{CH}(\text{R}^7)-\text{CH}_2-\text{OH}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-\text{R}^7$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-\text{R}^7$ или $-\text{CH}_2-\text{R}^7$, где R^7 выбран из C_3 - C_{18} -алкила или C_3 - C_{18} -алкенила, имеющего одну двойную связь C-C. Предпочтительно R^2 - R^5 обозначают водород. Предпочтительно R^7 выбран из C_8 - C_{18} -алкила или C_8 - C_{18} -алкенила, имеющего одну двойную связь C-C, и более предпочтительно из C_8 - C_{12} -алкила или C_8 - C_{12} -алкенила, имеющего одну двойную связь C-C, и наиболее предпочтительно из C_{10} - C_{12} -алкила или C_{10} - C_{12} -алкенила, имеющего одну двойную связь C-C.

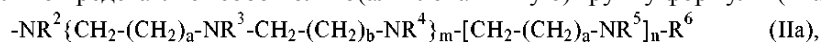
Один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (III) или ее предпочтительных вариантах, может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионной группы формулы (III).

Необязательно олигомеры или полимеры, которые содержат множество групп формулы (III) или ее предпочтительных вариантов в виде повторяющихся звеньев, могут содержать дополнительно одну или несколько олиго(алкиленаминную(ые)) группу(ы) формулы (II) в виде боковой цепи и/или концевой группы.

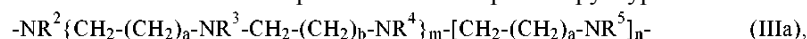
"Множество групп формулы (III) в виде повторяющихся звеньев" означает, что в олигомерах или полимерах, предлагаемых в изобретении, содержатся две или большее количество, предпочтительно три

или большее количество, групп формулы (III) или ее предпочтительных вариантов. Как правило, субстанции, содержащие 2-9 повторяющихся звеньев в контексте настоящего описания, обозначают как олигомеры, содержащие 10 и большее количество повторяющихся звеньев, обозначают как полимеры. Таким образом, в полимерах, которые содержат множество групп формулы (III) в качестве повторяющихся звеньев, предпочтительно присутствует 10 или большее количество групп формулы (III). Следует понимать, что группы формулы (III) или ее предпочтительных вариантов могут иметь одинаковую структуру в полимере или олигомере или могут иметь две или большее количество различных структур, подпадающих под объем формулы (III). Целесообразно и согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения олигомеры или полимеры, содержащие множество групп формулы (III) в качестве повторяющихся звеньев, можно получать в форме библиотеки последовательностей определенных полимеров, которые получают из различных групп формулы (III) с помощью регулируемой, ступенчатой полимеризации.

В соответствии с приведенными выше формулами (II) и (III) алкиленаминное звено может повторяться один раз в чередующейся цепи, что может приводить к получению олиго(алкиленаминных) фрагментов типа -S-L-L-S- или -L-S-S-L-, где S обозначает более короткое этиленаминное звено, а L обозначает более длинное алкиленаминное звено. Однако предпочтительные группы формул (II) и (III) представляют собой группы, в которых отсутствует повторение, т.е. в которых p обозначает 1, в результате чего более короткие или более длинные звенья не образуют пары. Другими словами, группа формулы (II) предпочтительно представляет собой олиго(алкиленаминную) группу формулы (IIa), а группа формулы (III) предпочтительно представляет собой олиго(алкиленаминную) группу формулы (IIIa)

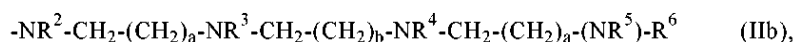


где a , b , m , n и R^2 - R^6 имеют значения, указанные для формулы (II), включая предпочтительные варианты, и где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (IIa), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионной олигомерной или полимерной структуры

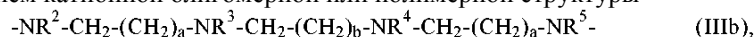


где a , b , m , n и R^2 - R^5 имеют значения, указанные для формулы (III), включая предпочтительные варианты, и где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (IIIa), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионной олигомерной или полимерной структуры.

Кроме того, как правило, предпочтительно для олиго(алкиленаминной) группы формул (II) и (III), чтобы переменная n обозначала 1, и более предпочтительно, чтобы m обозначала 1 и p обозначала 1. Так, наиболее предпочтительно, чтобы группа формулы (II) представляла собой олиго(алкиленаминную) группу формулы (IIb), а группа формулы (III) представляла собой олиго(алкиленаминную) группу формулы (IIIb)

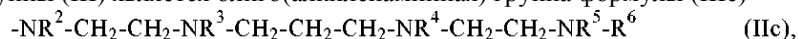


где a , b и R^2 - R^6 имеют значения, указанные для формулы (II), включая предпочтительные варианты, и где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (IIb), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионной олигомерной или полимерной структуры

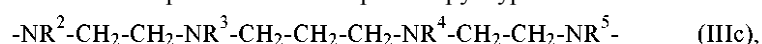


где a , b и R^2 - R^5 имеют значения, указанные для формулы (III), включая предпочтительные варианты, и где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (IIIb), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионной олигомерной или полимерной структуры.

Касательно длины алкиленаминных звеньев в олиго(алкиленаминных) группах формул (II), (IIa), (IIb) и (III), (IIIa), (IIIb) должно быть очевидно, что одно из чередующихся звеньев должно представлять собой этиленаминное звено (т.е. либо переменная a , либо переменная b должна обозначать 1). Другое чередующееся звено может представлять собой пропиленаминное звено, бутиленаминное звено или пентиленаминное звено (т.е. другая одна из переменных a или b обозначает целое число от 2 до 4). Предпочтительно другая одна из переменных a или b обозначает 2 или 3 и наиболее предпочтительно a обозначает 1 и b обозначает 2 или a обозначает 2 и b обозначает 1. Таким образом, еще более предпочтительной в качестве группы (II) является олиго(алкиленаминная) группа формулы (IIc) и еще более предпочтительной в качестве группы (III) является олиго(алкиленаминная) группа формулы (IIIc)

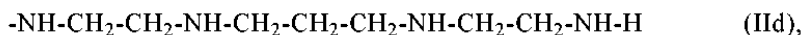


где R^2 - R^6 имеют значения, указанные для формулы (II), включая предпочтительные варианты, и где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (IIc), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионной олигомерной или полимерной структуры



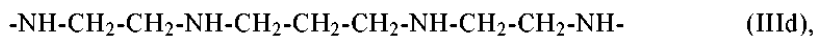
где R^2 - R^5 имеют значения, указанные для формулы (III), включая предпочтительные варианты, и где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (IIIc), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионной олигомерной или полимерной структуры.

Наиболее предпочтительной в качестве группы (II) является олиго(алкиленаминная) группа формулы (IIId)



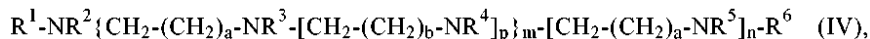
в которой один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (IIId), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионной полимерной или дендримерной структуры.

Наиболее предпочтительной в качестве группы (III) является олиго(алкиленаминная) группа формулы (IIIId)



в которой один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (IIIId), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионной полимерной или дендримерной структуры.

Как отмечалось выше, липидоиды, которые можно применять в композициях согласно одному из предпочтительных вариантов осуществления изобретения, имеют структуру формулы (IV)



где переменные a, b, p, m, n и R²-R⁶ имеют указанные ниже значения:

a обозначает 1 и b обозначает целое число от 2 до 4; или a обозначает целое число от 2 до 4 и b обозначает 1,

p обозначает 1 или 2,

m обозначает 1 или 2;

n обозначает 0 или 1 и

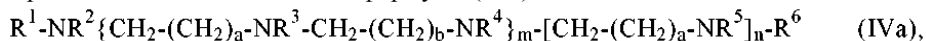
m+n ≥ 2;

R¹-R⁶, каждый независимо друг от друга, выбран из водорода; группы -CH₂-CH(OH)-R⁷, -CH(R⁷)-CH₂-OH, -CH₂-CH₂-(C=O)-O-R⁷, -CH₂-CH₂-(C=O)-NH-R⁷ или -CH₂-R⁷, где R⁷ выбран из C₃-C₁₈-алкила или C₃-C₁₈-алкенила, имеющего одну двойную связь C-C; защитной группы для аминогруппы; -C(NH)-NH₂, при условии, что по меньшей мере два остатка из R¹-R⁶ обозначают группу -CH₂-CH(OH)-R⁷, -CH(R⁷)-CH₂-OH, -CH₂-CH₂-(C=O)-O-R⁷, -CH₂-CH₂-(C=O)-NH-R⁷ или -CH₂-R⁷, где R⁷ выбран из C₃-C₁₈-алкила или C₃-C₁₈-алкенила, имеющего одну двойную связь C-C.

Предпочтительно R¹-R⁶ независимо друг от друга выбраны из водорода; группы -CH₂-C(OH)H-R⁷ или -CH(R⁷)-CH₂-OH, где R⁷ выбран из C₃-C₁₈-алкила или C₃-C₁₈-алкенила, имеющего одну двойную связь C-C; при условии, что по меньшей мере два остатка из R¹-R⁶ обозначают группу -CH₂-C(OH)H-R⁷ или -CH(R⁷)-CH₂-OH, где R⁷ выбран из C₃-C₁₈-алкила или C₃-C₁₈-алкенила, имеющего одну двойную связь C-C. Более предпочтительно R¹-R⁶ независимо друг от друга выбраны из водорода; группы -CH₂-CH(OH)-R⁷ или -CH(R⁷)-CH₂-OH, где R⁷ выбран из C₃-C₁₆-алкила или C₃-C₁₆-алкенила, имеющего одну двойную связь C-C; при условии, что по меньшей мере два остатка из R¹-R⁶ обозначают группу -CH₂-CH(OH)-R⁷ или -CH(R⁷)-CH₂-OH, где R⁷ выбран из C₃-C₁₈-алкила или C₃-C₁₈-алкенила, имеющего одну двойную связь C-C. Еще более предпочтительным является условие, что R¹ и R⁶ независимо друг от друга выбраны из водорода; и группы -CH₂-CH(OH)-R⁷ или -CH(R⁷)-CH₂-OH, где R⁷ выбран из C₃-C₁₈-алкила или C₃-C₁₈-алкенила, имеющего одну двойную связь C-C; и R²-R⁵ все обозначают группу -CH₂-CH(OH)-R⁷ или -CH(R⁷)-CH₂-OH, где R⁷ выбран из C₃-C₁₈-алкила или C₃-C₁₈-алкенила, имеющего одну двойную связь C-C. Предпочтительно R⁷ выбран из C₈-C₁₆-алкила или C₈-C₁₈-алкенила, имеющего одну двойную связь C-C, и наиболее предпочтительно из C₈-C₁₂-алкила или C₈-C₁₂-алкенила, имеющего одну двойную связь C-C, и наиболее предпочтительно из C₁₀-C₁₂-алкила или C₁₀-C₁₂-алкенила, имеющего одну двойную связь C-C.

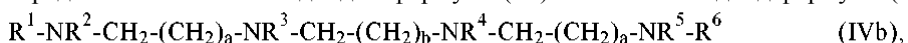
Один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (IV), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионного липидоида формулы (IV).

В соответствии с указанной выше формулой (IV) алкиленаминное звено может повторяться один раз в чередующейся цепи, что может приводить к получению олиго(алкиленаминных) фрагментов типа -S-L-L-S- или -L-S-S-L-, где S обозначает более короткое этиленаминное звено, а L обозначает более длинное алкиленаминное звено. Однако предпочтительный липидоид формулы (IV) представляет собой соединение, в котором отсутствует повторение, т.е. в котором p обозначает 1, в результате чего более короткие или более длинные звенья не образуют пары. Другими словами, липидоид формулы (IV) предпочтительно представляет собой липидоид формулы (IVa)



где a, b, m, n и R¹-R⁶ имеют значения, указанные для формулы (IV), включая предпочтительные варианты, и где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (IVa), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионного липидоида.

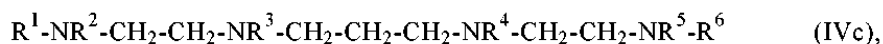
Кроме того, как правило, предпочтительным для липидоида формулы (IV) является вариант, в котором n обозначает 1, и более предпочтительно в котором m обозначает 1 и n обозначает 1. Таким образом, наиболее предпочтительным липидоидом формулы (IV) является липидоид формулы (IVb)



где a, b и R¹-R⁶ имеют значения, указанные для формулы (IV), включая предпочтительные варианты, и где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (IVb), может(гут) быть протониро-

ванным(и) с образованием катионного липидоида.

Касательно длины алкиленаминных звеньев в липидоиде формул (IV), (IVa) и (IVb) должно быть очевидно, что одно из чередующихся звеньев должно представлять собой этиленаминное звено (т.е. либо переменная *a*, либо переменная *b* должна обозначать 1). Другое чередующееся звено может представлять собой пропиленаминное звено, бутиленаминное звено или пентиленаминное звено (т.е. другая одна из переменных *a* или *b* обозначает целое число от 2 до 4). Предпочтительно другая одна из переменных *a* или *b* обозначает 2 или 3 и наиболее предпочтительно *a* обозначает 1 и *b* обозначает 2 или *a* обозначает 2 и *b* обозначает 1. Таким образом, еще более предпочтительным в качестве липидоида формулы (IV) является липидоид формулы (IVc)



где R^1-R^6 имеют значения, указанные для формулы (IV), включая предпочтительные варианты, и где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (IVc), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионного липидоида.

Как указано выше, один или несколько атомов азота, указанный(ые) в формуле (I) и ее предпочтительных вариантах, включая формулы (IIa)-(IIId), (IIIa)-(IIIId) и (IVa)-(IVc), может(гут) быть протонированным(и) с образованием олигомера или полимера или липидоида в катионной форме, как правило, олигокатионной или поликатионной форме. Должно быть очевидно, что первичные и/или вторичные, и/или третичные аминогруппы в группах формулы (I) и ее предпочтительных вариантах формул (IIa)-(IIId), (IIIa)-(IIIId) и (IVa)-(IVc) могут действовать в качестве акцепторов протонов, прежде всего в воде и водных растворах, включая физиологические жидкости. Так, олигомеры, полимеры и липидоиды, предлагаемые в настоящем изобретении, как правило, имеют общий положительный заряд в водном растворе при pH ниже 7,5. Водный раствор, указанный в настоящем описании, представляет собой раствор, который содержит 50 об.% или более, предпочтительно 80 или 90% или более и наиболее предпочтительно 100% воды. Кроме того, композиции, предлагаемые в изобретении, находятся в контакте с физиологической жидкостью, имеющей pH ниже 7,5, включая, например, кровь и легочную жидкость, группы формул (I) и их предпочтительные варианты, включая формулы (IIa)-(IIId), (IIIa)-(IIIId) и (IVa)-(IVc), как правило, содержат одну или несколько протонированных аминогрупп. Величины pK_a этих соединений можно определять путем кислотно-основного титрования, используя автоматический pK_a -титратор. Затем можно рассчитывать чистый заряд при данном значении pH с помощью уравнения Хендерсона-Хассельбаха. Согласно Geall с соавт. (J. Geall и др., Chem Commun, 1998, сс. 1403-1404), важно понимать, что любой заряд распределен по нескольким базисным центрам, и он не может быть приписан одной точке. Например, 1,9-диамино-3,7-дизанонан (пропил/этил/пропил) имеет величины pK_a 9,3, 7,6 и 5,7, что означает, что при физиологическом значении pH основные фракции аминогрупп находятся в протонированном и непротонированном состоянии.

Однако специалисту в данной области должно быть очевидно, что олигомеры, полимеры и липидоиды, предлагаемые в изобретении, а также композиции, предлагаемые в изобретении, можно получать также в форме безводной соли, которая содержит олигомер, полимер или липидоид в катионной форме.

Также должно быть очевидно, что противоионы (анионы), обеспечивающие положительные заряды протонированных аминогрупп в композициях, предлагаемых в изобретении, которые содержат олигомер, полимер или липидоид и одноцепочечную РНК, предпочтительно мРНК, как правило, представляют собой анионные остатки, входящие в РНК. Если положительно заряженные группы присутствуют в избытке относительно анионных остатков в РНК, то положительные заряды можно балансировать другими анионами, такими как Cl^- или HCO_3^- , которые обычно присутствуют в физиологических жидкостях.

Олиго(алкиленамины), которые можно применять в контексте настоящего изобретения, можно покупать у известных поставщиков химических продуктов или можно синтезировать с помощью методов, известных в данной области (например, van Alphen, Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas, 55, 1936, сс. 835-840). Для осуществления любой модификации, которая может требоваться, можно применять стандартные методы химического синтеза.

Структуры олигомеров/полимеров.

Как указано выше, группы формул (I) и их предпочтительных вариантов, включая формулы (IIa)-(IIId) и (IIIa)-(IIIId), могут быть связаны с различными каркасными структурами олигомеров или полимеров или могут представлять собой их.

Как правило, олигомер или полимер, содержащий множество групп формулы (II) или ее предпочтительных вариантов, включая формулы (IIa)-(IIId), можно обозначать также как полимерный каркас, несущий множество групп формулы (II) или ее предпочтительных вариантов, включая формулы (IIa)-(IIId), в качестве боковой цепи и/или концевой группы. Полимерные каркасы, которые могут нести множество групп формулы (II) и ее предпочтительных вариантов, включая группы формул (IIa)-(IIId), в качестве боковой цепи или концевой группы, включают линейные, разветвленные или сетчатые полимеры, а также дендритные полимеры (дендримеры). Полимеры включают синтетические или биополимеры. Предпочтительными являются линейные или разветвленные полимерные каркасные структуры. Это относится также к олигомерам, которые несут группы формулы (II) и ее предпочтительных вариантов, включая

группы формул (IIa)-(IIId), в качестве боковой цепи или концевой группы, отличием является то, что полимерный каркас, как правило, содержит 10 или большее количество повторяющихся звеньев, в то время как олигомерный каркас содержит 2-9, предпочтительно 3-9 повторяющихся звеньев. Как правило, из олигомеров и полимеров, которые содержат множество групп формулы (II) и ее предпочтительных вариантов, включая группы формул (IIa)-(IIId), в качестве боковой цепи или концевой группы, предпочтительными являются полимеры.

Боковые цепи или концевые группы формулы (II) или ее предпочтительных вариантов, включая группы формул (IIa)-(IIId), можно принятым путем прививать к полимерному или олигомерному каркасу, используя известные химические функциональности и реакции, с получением полимеров, предлагаемых в изобретении. Как должно быть очевидно специалисту в данной области, понятие "прививать к полимеру или олигомеру" не исключает вариант, в котором боковые цепи связывают с мономерами перед реакцией полимеризации. Наличие свободной валентности в формуле (II) свидетельствует о том, что боковые цепи или концевые группы присоединяют к полимерному или олигомерному каркасу через ковалентную связь.

Как должно быть очевидно, понятия "полимер" и "олигомер" в контексте настоящего описания включает полимеры и олигомеры, которые можно получать с помощью широкого разнообразия реакций, таких как реакции аддитивной полимеризации и поликонденсации, включая радикальную полимеризацию, анионную или катионную полимеризацию, а также полимеры и олигомеры, которые можно получать с помощью ступенчатых реакций сочетания (например, ступенчатые процессы роста (цепи)).

Таким образом, полимеры или олигомеры, которые можно применять в качестве полимерных или олигомерных каркасов, которые несут множество групп формулы (II) и ее предпочтительных вариантов, включая группы формул (IIa)-(IIId), в качестве боковой цепи или концевой группы, включают полимеры или олигомеры, такие как полиамиды, сложные полиэфиры, полимеры с каркасом из углеродной цепи и полисахариды. Примерами полимерных или олигомерных каркасов являются поли(аминокислоты), содержащие множество звеньев глутаминовой или аспарагиновой кислоты, в целом, такие как поли(глутаминовая кислота) и поли(аспарагинования) кислота, полиакриловая кислота, полиметакриловая кислота, сополимер этилакрилата и акриловой кислоты и сополимер метилметакрилата и метакриловой кислоты. Из них предпочтительными являются поли(аминокислоты), содержащие множество звеньев глутаминовой или аспарагиновой кислоты, такие как поли(глутаминовая кислота) и поли(аспарагиновая кислота), и поли(мет)акриловая кислота. Наиболее предпочтительными для целей настоящего изобретения являются полиакриловая кислота и полиметакриловая кислота.

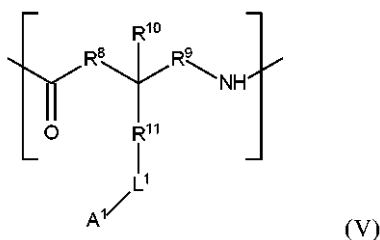
Предпочтительно полимерные каркасы имеют степень полимеризации (в понятиях среднего количества полимеризованных звеньев, определенного, например, с помощью гелепроникающей хроматографии (ГПХ)), составляющую от 10 до 10000, предпочтительно от 50 до 5000.

Полимеры, предлагаемые в изобретении, могут представлять собой гомополимеры или сополимеры. Соплимеры могут содержать полимеризованные звенья с различными структурами, в результате чего полимерный каркас представляет собой сополимер. Альтернативно этому, сополимеры можно получать на основе гомополимера в качестве полимерного каркаса, в котором не все полимеризованные звенья несут группу формулы (II) или ее предпочтительных вариантов, включая формулы (IIa)-(IIId). Как должно быть очевидно, существует также вариант объединения двух указанных альтернатив путем прививки боковых цепей к определенному проценту звеньев в сополимерном каркасе. Соплимеры могут иметь форму статистических, градиентных или блок-сополимеров.

Если полимеры, предлагаемые в изобретении, представляют собой гомополимеры, то все полимеризованные звенья несут группу формулы (II) или ее предпочтительных вариантов, включая формулы (IIa)-(IIId). Если полимеры, предлагаемые в изобретении, представляют собой сополимеры, то предпочтительно 5-100% всех полимеризованных звеньев несут группу формулы (II) или ее предпочтительных вариантов, включая формулы (IIa)-(IIId), более предпочтительно 25-100% и наиболее предпочтительно 50-100%. Проценты даны в виде количества звеньев, которые несут группу формулы (II), относительно всех полимеризованных звеньев.

Указанные сополимеры могут содержать в дополнение к группе формулы (II) или ее предпочтительным вариантам, включая формулы (IIa)-(IIId), также другие содержащие боковые цепи или концевые группы амины. Однако предпочтительно в полимеры, предлагаемые в изобретении, не входят боковые цепи или концевые группы формулы $-NH-(CH_2)_x-(NH(CH_2)_2)_y-NH_2$, в которой x обозначает целое число от 1 до 5 и y обозначает целое число от 1 до 5.

Предпочтительные полиамиды, несущие боковую цепь формулы (II) или ее предпочтительных вариантов, включая формулы (IIa)-(IIId), содержат повторяющиеся звенья формулы (V)



в которой переменные имеют следующие значения:

R^8 и R^9 независимо выбраны из связи и C_1 - C_6 -алкандиила;

R^{10} выбран из H и C_1 - C_6 -алкила;

R^{11} выбран из связи и C_1 - C_6 -алкандиила,

L^1 обозначает двухвалентную связывающую (линкерную) группу и

A^1 обозначает олиго(алкиленаминную) группу формулы (II).

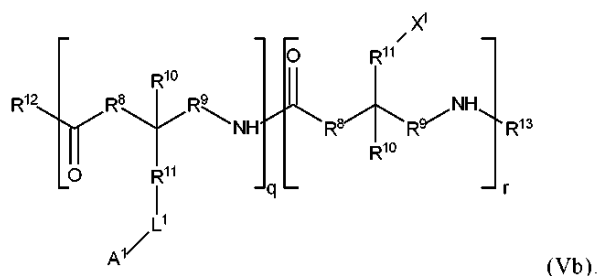
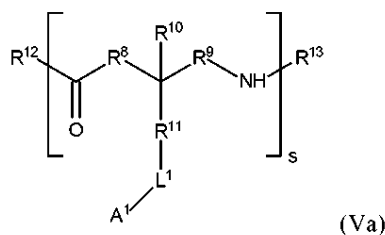
Предпочтительно R^8 и R^9 независимо выбраны из связи и C_1 - C_5 -алкандиила и наиболее предпочтительно они обозначают связь. Предпочтительно R^{10} выбран из H и метила и наиболее предпочтительно H. R^{11} предпочтительно обозначает C_1 - C_6 -алкандиил.

Линкерная группа L имеет в предпочтительном варианте структуру $-\text{Z}^1-\text{R}'-\text{Z}^2-$, в которой Z^1 выбран из связи, $-\text{NH}-(\text{C}=\text{O})-$, $-\text{NH}-\text{C}(\text{S})-\text{NH}-$, $-\text{NH}-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-$, $-\text{NH}-\text{S}(\text{O})_2-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{OH})-$, $-\text{NH}-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$, $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})-$, $-\text{CH}=\text{N}-\text{NH}-(\text{C}=\text{O})-$, $-\text{S}-\text{S}-$, тиоэфирной связи, $-\text{S}-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-$, $-\text{S}-$, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_2-$ и арилтиоэфирной связи; R' выбран из связи, C_1 - C_6 -алкандиила и $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$, где $n = 1-3$; и Z^2 выбирают из связи, $-(\text{C}=\text{O})-$, $-\text{NH}-\text{C}(\text{S})-$, $-\text{NH}-(\text{C}=\text{O})-$, $-\text{S}(\text{O})_2-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-$ и $-\text{C}(\text{NH})-$. Предпочтительно Z^1 выбран из связи, $-\text{NH}-(\text{C}=\text{O})-$, $-\text{NH}-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-$, $-\text{NH}-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$, $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})-$; R' выбран из связи и C_1 - C_6 -алкандиила и Z^2 выбирают из связи, $-(\text{C}=\text{O})-$, $-\text{NH}-(\text{C}=\text{O})-$ и $-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-$; при условии, что один из Z^1 и Z^2 не обозначает боковую связь. Наиболее предпочтительно для L^1 , чтобы Z^1 и R' обозначали связи и Z^2 обозначал $-(\text{C}=\text{O})-$, или чтобы Z^1 обозначал $-\text{NH}-(\text{C}=\text{O})-$, R' обозначал C_1 - C_6 -алкандиил и Z^2 обозначал $-(\text{C}=\text{O})-$.

A^1 предпочтительно является одним из предпочтительных вариантов, указанных в настоящем описании, для олиго(алкиленаминной) группы формулы (II), в частности одной из групп формул (IIa)-(IId).

В предпочтительных полиамидах, содержащих повторяющееся звено формулы (V), предпочтительно, чтобы 5-100% всех полимеризованных звеньев представляли собой звенья формулы (V), более предпочтительно 25-100% и прежде всего 50-100%. Проценты даны в виде количества звеньев, которые несут группу формулы (V), относительно всех полимеризованных звеньев. Касательно значений и предпочтительных значений переменных формулы (V) в предпочтительном полимере, предлагаемом в изобретении, повторяющиеся звенья формулы (V) могут быть одинаковыми или различными.

Наиболее предпочтительными в качестве полиамидных полимеров, предназначенных для применения в настоящем изобретении, являются полимеры формул (Va) и (Vb)

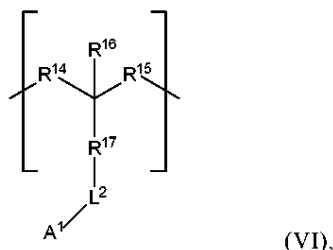


В этих формулах R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} , L^1 и A^1 имеют значения, указанные для формулы (V), включая ее предпочтительные варианты, R^{12} выбирают из OH или C_1 - C_6 -алкоксигруппы, $-\text{NH}_2$, поли(этиленгликольной) цепи или лиганда рецептора, R^{13} обозначает H, защитную группу для аминогруппы, поли(этиленгликольную) цепь или лиганд рецептора, X выбирают из H, $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$ и $-\text{COOR}''$, где R'' обозначает C_1 - C_6 -алкил, поли(этиленгликольную) цепь или лиганд рецептора. В формуле (Va) показатель s (обозначающий среднее количество полимеризованных звеньев, определенное с помощью гель-проницающей хроматографии (ГПХ)) обозначает 10-10000, предпочтительно 50-5000. В формуле (Vb)

звенья в скобках обозначают повторяющиеся звенья, которые могут располагаться в полимере в любом порядке, включая, в частности, произвольное, чередующееся или блоковое расположение. Сумма $q+r$ (обозначает среднее количество полимеризованных звеньев, определенное, например, с помощью гели-проникающей хроматографии (ГПХ)) составляет 10-10000, предпочтительно 50-5000, а соотношение $q/(q+r)$ находится в диапазоне от 0,05 до 1, предпочтительно от 0,25 до 1 и наиболее предпочтительно от 0,5 до 1.

Примерами предпочтительных поли(аминокислот), которые легко модифицировать с помощью боковых цепей формулы (II) или предпочтительных ее вариантов, включая формулы (IIa)-(IId), являются поли(глутаминовая кислота), поли(аспарагиновая кислота) или поли(аминокислоты), содержащие в качестве звеньев глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту. Наиболее предпочтительной является поли(глутаминовая кислота).

Предпочтительные полимеры с каркасом в виде углеродной цепи, несущие боковую цепь формулы (II) или ее предпочтительных ее вариантов, включая формулы (IIa)-(IId), содержат повторяющиеся звенья формулы (VI)



в которой переменные имеют следующие значения:

R^{14} и R^{15} независимо выбраны из связи и C_1 - C_6 -алкандиила;

R^{16} выбран из H и C_1 - C_6 -алкила;

R^{17} выбран из связи и C_1 - C_6 -алкандиила,

L^2 обозначает двухвалентную линкерную группу и

A^1 обозначает олиго(алкиленаминную) группу формулы (II).

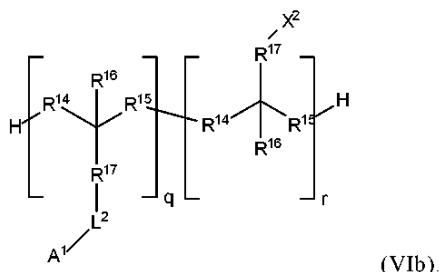
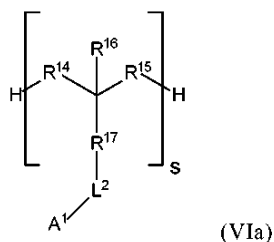
Предпочтительно R^{14} обозначает связь и R^{15} обозначает связь или $-CH_2-$. Более предпочтительно R^{14} обозначает связь и R^{15} обозначает $-CH_2-$. Предпочтительно R^{16} выбран из H и метила. R^{17} предпочтительно обозначает связь или $-CH_2-$.

Линкерная группа L^2 в предпочтительном варианте осуществления изобретения имеет структуру $-Z^3-R'-Z^4-$, в которой Z^3 выбран из связи, $-NH-(C=O)-$, $-NH-C(S)-NH-$, $-NH-(C=O)-NH-$, $-NH-S(O)_2-$, $-NH-CH_2-C(OH)-$, $-NH-(C=O)-O-$, $-NH-C(NH)-$, $-S-S-$, $-CH=N-NH-(C=O)-$, $-$ тиоэфирной связи $-$, $-S-CH_2-(C=O)-$, $-S-$, $-S-CH_2-CH-NH_2-$ и арилтиоэфирной связи $-$; R' выбран из связи, C_1 - C_6 -алкандиила и $-(CH_2-CH_2-O)_n-H$, где $n=1-3$; и Z выбран из связи, $-(C=O)-$, $-NH-C(S)-$, $-NH-(C=O)-$, $-S(O)_2-$, $-O-P(O)_2-$, $-CH(OH)-CH_2-$, $-O-(C=O)-$ и $-C(NH)-$. Предпочтительно Z^3 выбран из связи, $-NH-(C=O)-$, $-NH-(C=O)-NH-$, $-NH-(C=O)-O-$, $-NH-C(NH)-$; R' выбран из связи и C_1 - C_6 -алкандиила и Z^4 выбран из связи, $-(C=O)-$, $-NH-(C=O)-$ и $-O-(C=O)-$; при условии, что один из Z^3 и Z^4 не обозначает связь. Наиболее предпочтительным для L^2 является вариант, когда Z^3 и R' обозначают связь и Z^4 обозначает $-(C=O)-$.

A^1 предпочтительно имеет значение, указанное в одном из предпочтительных вариантов, указанных в настоящем описании для олиго(алкиленаминной) группы формулы (II), прежде всего одной из группы формул (IIa)-(IId).

В предпочтительных полиамидах, содержащих повторяющееся звено формулы (VI), предпочтительно, чтобы 5-100% всех полимеризованных звеньев представляли собой звенья формулы (VI), более предпочтительно 25-100% и, прежде всего, 50-100%. Проценты даны в виде количества звеньев, которые несут группу формулы (VI), относительно всех полимеризованных звеньев. Касательно значений и предпочтительных значений переменных формулы (VI) в предпочтительном полимере, предлагаемом в изобретении, повторяющиеся звенья формулы (VI) могут быть одинаковыми или различными.

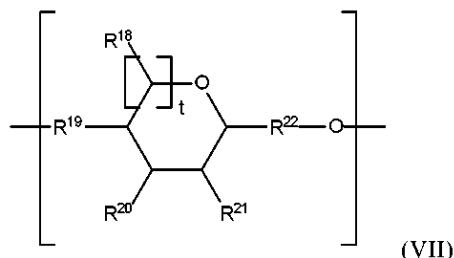
Предпочтительные полимеры с каркасом в виде углеродной цепи, несущие боковую цепь формулы (II) или ее предпочтительных вариантов, включая формулы (IIa)-(IId), представляют собой полимеры формул (VIa) и (VIb).



В этих формулах R^{14} , R^{15} , R^{16} , R^{17} , L^2 и A^1 имеют значения, указанные для формулы (VI), включая ее предпочтительные варианты. X выбирают из $-\text{COOH}$ и $-\text{COOR}''$, где R'' обозначает C_1 - C_6 -алкил, поли(этиленгликольную) цепь или лиганд рецептора. В формуле (VIa) показатель s (обозначающий среднее количество полимеризованных звеньев, определенное с помощью гелепроникающей хроматографии (ГПХ)) обозначает 10-10000, предпочтительно 50-5000. В формуле (VIb) звенья в скобках обозначают повторяющиеся звенья, которые могут располагаться в полимере в любом порядке, включая, в частности, произвольное, чередующееся или блоковое расположение. Сумма q+r (обозначает среднее количество полимеризованных звеньев, определенное, например, с помощью гелепроникающей хроматографии (ГПХ)) составляет 10-10000, предпочтительно 50-5000, а соотношение $q/(q+r)$ находится в диапазоне от 0,05 до 1, предпочтительно от 0,25 до 1 и наиболее предпочтительно от 0,5 до 1.

Примерами предпочтительных полимеров с каркасом из углеродной цепи, которые легко модифицировать с помощью боковых цепей формулы (II) или предпочтительных ее вариантов, включая формулы (IIa)-(IId), являются полиакриловая кислота или полиметакриловая кислота.

Предпочтительные полисахариды, несущие боковую цепь формулы (II) или ее предпочтительных вариантов, включая формулы (IIa)-(IId), содержат повторяющиеся звенья формулы (VII)



в которой переменные имеют следующие значения:

R^{19} и R^{22} независимо выбраны из связи и $-(\text{CH}_2)_2$;

t обозначает 0 или 1;

один из R^{18} , R^{20} и R^{21} обозначает $-\text{L}^3-\text{A}^1$, где L^3 обозначает двухвалентную линкерную группу и A^1 обозначает олиго(алкиленаминную) группу формулы (II), а другой из них независимо выбран из $-\text{H}$, $-\text{OH}$ и $-(\text{CH}_2)_n-\text{OH}$, где n обозначает 1 или 2.

Предпочтительно R^{19} и R^{22} обозначают связь. Предпочтительно один из R^{18} , R^{20} и R^{21} обозначает $-\text{L}^3-\text{A}^1$, где L^3 обозначает двухвалентную линкерную группу и A^1 обозначает олиго(алкиленаминную) группу формулы (II), а другой из них обозначает $-\text{OH}$.

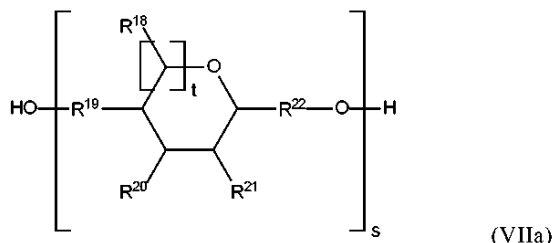
Линкерная группа L^3 в предпочтительном варианте имеет структуру $-\text{Z}^5-\text{R}'-\text{Z}^6-$, в которой Z^5 выбран из связи, $-\text{NH}-(\text{C}=\text{O})-$, $-\text{NH}-\text{C}(\text{S})-\text{NH}-$, $-\text{NH}-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-$, $-\text{NH}-\text{S}(\text{O})_2-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{OH})-$, $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})-$, $-\text{S}-\text{S}-$, $-\text{CH}=\text{N}-\text{NH}-(\text{C}=\text{O})-$, -тиоэфирной связи-, $-\text{S}-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-$, $-\text{S}-$, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_2-$ и арилтиоэфирной связи-; R' выбран из связи, C_1 - C_6 -алкандиола и $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$, где $n=1-3$; и Z^6 выбран из связи, $-(\text{C}=\text{O})-$, $-\text{NH}-\text{C}(\text{S})-$, $-\text{NH}-(\text{C}=\text{O})-$, $-\text{S}(\text{O})_2-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-$ и $-\text{C}(\text{NH})-$; при условии, что один из Z^5 и Z^6 не обозначает связь. Предпочтительно Z^5 выбран из связи, $-\text{NH}-(\text{C}=\text{O})-$, $-\text{NH}-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-$, $-\text{NH}-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$, $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})-$; R' выбран из связи и C_1 - C_6 -алкандиола и Z^6 выбран из связи, $-(\text{C}=\text{O})-$, $-\text{NH}-(\text{C}=\text{O})-$ и $-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-$; при условии, что один из Z^5 и Z^6 не обозначает связь. Наиболее предпочтительным для L^3 является вариант, когда Z^5 и R' обозначают связь и Z^6 обозначает $-(\text{C}=\text{O})-$.

A^1 предпочтительно обозначает один из предпочтительных вариантов, указанных в настоящем опи-

сании для олиго(алкиленаминной) группы формулы (II), прежде всего группы формул (IIa)-(IId).

В предпочтительных полисахаридах, содержащих повторяющееся звено формулы (VII), предпочтительно 5-100% от всех полимеризованных звеньев представляют собой звенья формулы (VII), более предпочтительно 25-100% и наиболее предпочтительно 50-100%. Проценты даны в виде количества звеньев, которые несут группу формулы (VII), относительно всех полимеризованных звеньев. Касательно значений и предпочтительных значений переменных формулы (VII) в предпочтительном полимере, предлагаемом в изобретении, повторяющиеся звенья формулы (VII) могут быть одинаковыми или различными.

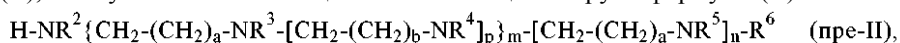
Наиболее предпочтительные полисахариды, несущие боковую цепь формулы (II) или ее предпочтительных ее вариантов, включая формулы (IIa)-(IId), представляют собой полимеры формулы (VIIa)



В этой формуле R^{18} , R^{19} , R^{20} , R^{21} , R^{22} и t имеют значения, указанные для формулы (VII), включая ее предпочтительные варианты. Показатель s (обозначающий среднее количество полимеризованных звеньев, определенное, например, с помощью гелепроникающей хроматографии (ГПХ)) обозначает 10-10000, предпочтительно 50-5000.

Как хорошо известно специалисту в данной области, полимеры или олигомеры, содержащие группу формулы (II) или ее предпочтительных вариантов, включая формулы (IIa)-(IId), в качестве боковой цепи и/или концевой группы, легко можно получать различными путями синтеза посредством сочетания олиго(алкиленаминов) с полимерными каркасами, которые содержат или модифицированы так, что содержат функциональные группы, приемлемые для химического сочетания. Указанные функциональные группы включают $-\text{COOH}$, $-\text{CO}-$, $-\text{CHO}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{PO}_4\text{H}$, $-\text{NH}-$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ или $-\text{SH}$. Как должно быть очевидно, можно также модифицировать группами формулы (II) приемлемые мономеры перед их полимеризацией с получением полимеров или олигомеров, предлагаемых в изобретении, которые содержат боковую цепь и/или концевую группу формулы (II). Однако, как правило, предпочтительной является модификация полимера.

Например, исходные (родительские) полимеры (т.е. полимеры, полимерный каркас которых соответствует каркасу полимеров, предлагаемых в изобретении), содержащие группы карбоновых кислот, пригодны для непосредственного сшивания, при необходимости путем активации, например, с использованием карбодиимида, и последующего образования амидной связи с помощью олиго(алкиленамина) указанной ниже формулы (пре-II), в которой переменные a , b , p , m , n и R^2 - R^6 имеют значения, указанные для формулы (II), с получением боковых цепей и/или концевых групп формулы (II).

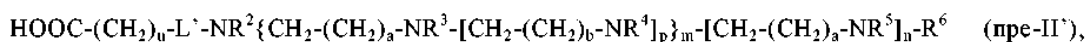


При необходимости соединение формулы (пре-II) можно защищать на одной или на всех его концевых и/или внутренних вторичных аминогруппах с использованием общепринятой защитной группы для аминогруппы, такой как описанная, например, в WO 2006/138380, предпочтительно трет-бутоксикарбонила (Boc), 9-флуоренилметоксикарбонила (Fmoc) или карбобензилоксигруппы (Cbz).

Указанные реакции предпочтительно проводят в присутствии избытка реакционноспособных аминогрупп олиго(алкиленамина) формулы (пре-II) относительно групп карбоновой кислоты родительского полимера, если не требуются реакции перекрестного сшивания. В зависимости от природы родительского полимера реакцию сочетания можно проводить в водных или органических растворителях. Приемлемые условия сочетания хорошо известны в области химии пептидов и биоконъюгатов (Greg T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, 2-е изд., изд-во, Academic Press, 2008). Как отмечалось выше, приемлемые полимерные каркасы включают (но не ограничиваясь только ими) поли(аминокислоты), содержащие множество звеньев глутаминовой или аспарагиновой кислоты, такие как поли(глутаминовая кислота) и поли(аспарагиновая кислота), полиакриловая кислота, полиметакриловая кислота, сополимер этилакрилата и акриловой кислоты и сополимер метилметакрилата и метакриловой кислоты.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения полимер, содержащий боковые цепи и/или концевые группы формулы (II), можно получать с помощью восстановительного аминирования родительского полимера. Углеводы или сахара можно окислять до альдегидов с последующим взаимодействием с олиго(алкиленамином) с получением имина, который можно восстанавливать, например, с помощью цианборгидрида натрия с получением амина.

Согласно следующему варианту осуществления настоящего изобретения олиго(алкиленамин) можно дериватизировать на первой стадии с получением карбоксиконцевого олиго(алкиленамина), например, формулы (пре-II'), который можно сшивать с гидроксильной и аминогруппами в родительском полимере



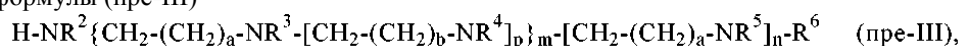
где u обозначает целое число от 1 до 6, L' обозначает связь или $-(\text{CH})_2-$, а другие переменные имеют значения, указанные для формулы (II). При необходимости любую(ые) концевую(ые) и/или внутренних(ие) вторичный(ые) аминогруппу(ы) в соединении формулы (пре-II) или (пре-II') можно защищать с использованием общепринятой защитной группы для аминогруппы, такой как описанная, например, в WO 2006/138380, предпочтительно трет-бутоксикарбонила (Boc), 9-флуоренилметоксикарбонила (Fmoc) или карбобензилоксигруппы (Cbz).

Для этой цели олиго(алкиленамин) можно подвергать взаимодействию с ангидридом дикарбоновой кислоты, дикарбоновой кислотой или альдегидом с получением структуры (пре-II'). Даже хотя структуру (пре-II') можно получать без защиты аминов в олиго(алкиленамине) (пре-II) с помощью ортогональных защитных групп, предпочтительно это следует делать. Структура (пре-II') позволяет модифицировать, например, поли(лизин), поли(орнитин) или поли(виниламин) путем непосредственно сшивания с получением амидой связи. После завершения реакции сочетания любые защитные группы можно удалять с помощью общепринятых методов. Затем образовавшийся полимер можно очищать, например, путем диализа или ионообменной хроматографии или гель-фильтрации или хроматографии с обращенной фазой или хроматографии гидрофобных взаимодействий.

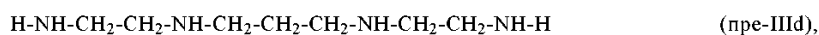
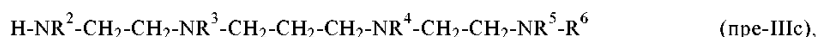
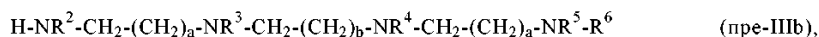
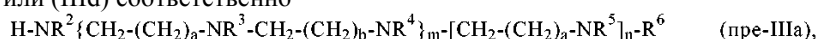
Промежуточные и конечные продукты можно очищать путем осаждения, диализа или гель-фильтрации после удаления защитных групп аминов и до конечной стадии сочетания в случае дендримеров.

Полимеры или олигомеры, содержащие множество повторяющихся звеньев формулы (III) или предпочтительных ее вариантов, включая формулы (IIIa)-(IIId), могут представлять собой линейные, разветвленные или сетчатые полимеры или дендритные полимеры (дендримеры). Предпочтительно полимеры или олигомеры, содержащие множество повторяющихся звеньев формулы (III) или ее предпочтительных вариантов, включая формулы (IIIa)-(IIId), содержат по меньшей мере 25%, более предпочтительно по меньшей мере 40% указанных повторяющихся звеньев, в понятиях количестве звеньев формулы (III) относительно общего количества повторяющихся звеньев в полимере или олигомере. Особенно предпочтительно, чтобы 50% или более от всех повторяющихся звеньев в полимерах или олигомерах, содержащих множество повторяющихся звеньев формулы (III) или ее предпочтительных вариантов, включая формулы (IIIa)-(IIId), представляют собой указанные звенья. Остальные повторяющиеся звенья в молекулах обеспечивают сочетание повторяющихся звеньев формулы (III) или ее предпочтительных вариантов, включая формулы (IIIa)-(IIId), в частности звенья, полученные из двухвалентных, трехвалентных или имеющих большую валентность карбоновых кислот.

Полимеры или олигомеры, содержащие множество повторяющихся звеньев формулы (III) или ее предпочтительных вариантов, включающих формулы (IIIa)-(IIId), можно получать с использованием соединения формулы (пре-III)

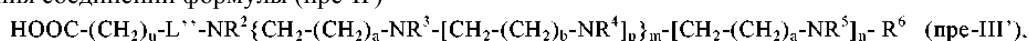


где "пре" означает формулу (пре-III), являющуюся предшественником формулы (III), где переменные a , b , p , m , n и R^2 - R^5 имеют значения, указанные для формулы (III), а R^6 имеет значения, указанные для формулы (II), включая ее предпочтительные варианты, или предпочтительно с использованием соединения формул (пре-IIIa)-(пре-IIId), в которых переменные имеют значения, указанные в формулах (IIIa), (IIIb) (IIIc) или (IIId) соответственно



Хотя можно общепринятым методом осуществлять непосредственное взаимодействие многовалентных карбоновых кислот с диаминами, следует понимать, что указанные линкерные соединения не ограничены полученными из групп карбоновых кислот (или их активированных форм). Например, соединение формулы (VIIIg) можно подвергать взаимодействию с соединением формулы (пре-III) после образования диамидного соединения формулы (пре-III) с помощью дикарбоновой кислоты, такой как янтарная кислота.

Кроме того, олиго(алкиленамин) можно дериватизировать на первой стадии с получением карбоксиконцевого олиго(алкиленамина) формулы (пре-III'), например, согласно методу, описанному выше для получения соединений формулы (пре-II')



в которой u обозначает целое число от 1 до 6, L'' обозначает связь или $-(\text{CH})_2-$, а другие переменные

имеют значения, указанные для формулы (III), и R^6 имеет значения, указанные для формулы (II). При необходимости любую(ые) внутренняя(ие) вторичная(ые) аминогруппа(ы) в соединении формулы (пре-III') можно защищать с использованием общепринятой защитной группы для аминогруппы, такой как описанная, например, в WO 2006/138380, предпочтительно трет-бутоксикарбонила (Boc), 9-флуоренилметоксикарбонила (Fmoc) или карбобензилоксигруппы (Cbz). Если оставшаяся концевая аминогруппа $-NR^5R^6$ присутствует в незащищенной форме/в форме, которая позволяет образовываться амиду с группой карбоновой кислоты, то соединения формулы (пре-III') можно полимеризовывать или олигомеризовывать с получением олигомера или полимера, который содержит множество олиго(алкиленаминных) групп формулы (III) или ее предпочтительных вариантов, включая формулы (IIIa)-(IIIId), в качестве повторяющихся звеньев. Такие полимеры могут быть линейными или разветвленными.

Например, структуру (пре-III') можно применять для создания разветвленных структур либо с помощью произвольной, либо с помощью направленной полимеризации. Сополимеризацию можно активировать *in situ* в смеси олиго(алкиленамина), необязательно с защищенными внутренними аминогруппами и поликарбоновой кислотой (VIIIa-VIIIg) в водной или органическом растворителе путем карбодиимидной активации.

Можно получать также дендримеры, содержащие множество групп формулы (III) или ее предпочтительных вариантов, включая формулы (IIIa)-(IIIId), в качестве повторяющихся звеньев, например, с использованием многовалентных сшивающих молекул. Дендример представляет собой полимерную молекулу, состоящую из нескольких правильно разветвленных мономеров, которые отходят радиально от центрального ядра, напоминая дерево, поэтому дендримеры получили своё название (от греческого дендра (дерево)). Когда ядро дендримера удаляют, сохраняется несколько идентичных фрагментов, называемых дендронами, количество дендронов зависит от мультиплексности центрального ядра (2, 3, 4 или более). Дендрон может разделять на три различные области: ядро, внутренняя (или ветки) и периферическая (или окончание, или концевые группы). Количество точек ветвления, встречающихся, если двигаться от ядра дендрона к его периферии, определяет его генерацию (G-1, G-2, G-3); дендримеры более высоких генераций являются более крупными, более разветвленными и имеют большее количество концевых групп на их периферии, чем дендримеры более низких генераций.

Синтез может быть либо дивергентным, который приводит к росту, напоминающему экспоненциальный, либо конвергентным, в этом случае дендроны растут по отдельности и присоединяются к ядру на конечной стадии. Дендримеры получают ступенчатым путем, аналогичным методам, которые применяют для твердофазного синтеза полипептидов и синтеза олигонуклеотидов, и поэтому продукты теоретически являются монодисперсными по размеру, в отличие от традиционного синтеза полимеров, при котором рост цепи является статистическим и при котором получают полидисперсные продукты. Потребность в монодисперсном продукте является очень высокой не только с позиции воспроизводимости синтеза, но также в позиции снижения экспериментальной и терапевтической вариативности. На практике монодисперсный продукт легко можно получать для дендримеров низкой генерации (вплоть до G-3), но иногда при использовании более высоких генераций оказывается невозможно очищать идеальные дендримеры от дендримеров с небольшими дефектами, которые являются структурно очень сходными, что приводит к отклонению от абсолютной монодисперсности, хотя, как правило, это является незначительным.

Предпочтительные дендримеры в качестве полимеров, предлагаемых в настоящем изобретении, которые содержат множество олиго(алкиленовых групп) формулы (III) или ее предпочтительных вариантов, включающих формулы (IIIa)-(IIIId), имеют количество генераций, составляющее от G1 до G10, более предпочтительно от G2 до G8 и прежде всего от G3 до G6. Молекулярная масса этих дендримеров (которую можно рассчитывать на основе реагентов, участвующих в стадиях реакции) предпочтительно составляет от 1500 до 1000000, более предпочтительно от 3000 до 230000, прежде всего от 6000 до 60000 и наиболее предпочтительно от 15000 до 30000.

Для получения конкретных поли(амидоаминных) дендримеров можно применять (защищенные) структуры (пре-III) и/или (пре-III') для ступенчатого создания ядра с точками ветвления, что уже описано в литературе (например, Lee и др., *Nat Biotechnol* 23, 2005, сс. 1517-1526). В качестве исходной молекулы можно использовать либо олиго(алкиламин) (например, пре-III), активированный дикарбоновой кислотой, ангидридом или акриловой кислотой, либо поликарбоновую кислоту (например, VIIIa-VIIIg). Указанное ядро можно применять для ступенчатого взаимодействия с олиго(алкиламином) структуры (пре-III) с последующей очисткой и активацией концевых аминогрупп, например, с помощью акриловой кислоты. После очистки указанное ядро можно применять для добавления дополнительного слоя олиго(алкиленаминов). Реакционные условия для получения дендримеров подробно описаны в литературе (см., например, Lee и др., *loc. cit.* и процитированные в этой публикации ссылки).

Согласно другим вариантам осуществления изобретения олиго(алкиленамины), которые оканчиваются на обеих сторонах карбоксигруппой, могут быть защищены с одной стороны и/или при необходимости у них могут быть защищены внутренние амины, и они могут быть сополимеризованы с диаминами или исходной дендритной структурой, имеющей аминогруппы на концах, или с самим олиго(алкиленамином).

Промежуточные и конечные продукты можно очищать осаждением, диализом или гелевой фильтрацией после удаления аминозащитных групп и перед конечной стадией сочетания в случае дендримеров.

Согласно следующему варианту осуществления изобретения олиго(алкиленамины), имеющие концевую карбоксигруппу (или ее соответствующим образом защищенную или активированную форму), и концевую аминогруппу (или ее соответствующим образом защищенную форму), например, олиго(алкиленамины) формулы (пре-III'), можно применять для ступенчатого создания полностью определенной пептидной линейной или разветвленной структуры, аналогично методу, описанному в WO 2011/154331 и у Schaffert и др., Angew Chem. Int. Ed. Engl. 50(38), 2011, сс. 8986-8989). Ступенчатую реакцию можно осуществлять согласно принципам химии пептидов и можно проводить с использованием автоматического пептидного синтезатора. Как известно специалисту в области синтеза пептидов, диаминокислоты, такие как лизин или орнитин, можно применять для построения разветвленных структур. Таким образом можно получать широкое разнообразие линейных и разветвленных гомополимеров, но также и гетерополимеров, содержащих различные олиго(алкиленамины) формулы (I) в требуемых положениях полимера. Кроме того, канонические аминокислоты можно включать в такие указанные структуры в любое положение.

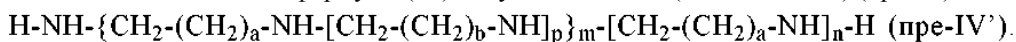
Для получения липидоидов формулы (IV) и ее предпочтительных вариантов, включающих формулы (IVa), (IVb) и (IVc), можно применять методы, аналогичные описанным в US 2010/0331234 A1, US 8450298; у Love и др., PNAS 107, 2010, сс. 1864-1869; WO 2006/138380; Akinc и др., Nat Biotechnol 26, 2008, сс. 561-569.

Например, липидоиды формулы (IV) и ее предпочтительных вариантов, включающих формулы (IVa), (IVb) и (IVc), можно получать путем взаимодействия R^7 -эпоксида или R^7 -O-(C=O)-CH=CH₂, или R₇-NH-(C=O)-CH=CH₂, или R⁷-(C=O)-H с олиго(алкиленамином) формулы (пре-IV)

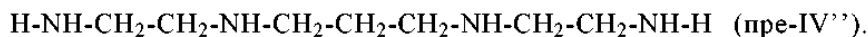


в которой переменные a, b, p, m, n имеют значения, указанные для формулы (IV), и R²-R⁶, каждый независимо друг от друга, обозначает водород или защитную группу для аминогруппы и R⁷ выбран из C₃-C₁₈-алкила или C₃-C₁₈-алкенила, имеющего одну двойную связь C=C. Предпочтительно R⁷ обозначает C₈-C₁₆-алкил или -алкенил, более предпочтительно C₈-C₁₂-алкил или -алкенил и наиболее предпочтительно C₁₀-C₁₂-алкил или -алкенил. Преимуществом является то, что многочисленные алифатические соединения, оканчивающиеся на одном конце эпоксидом, акрилатом, акриламидом или альдегидом, поступают в продажу.

Предпочтительно липидоид формулы (IV) получают из олиго(алкиленамина) (пре-IV)



Более предпочтительно предшественники формулы (пре-IV) имеют 4 или большее количество аминогрупп. Наиболее предпочтительно липидоид формулы (IV) получают из олиго(алкиленамина) (пре-IV'')



Реакцию можно осуществлять в растворителе или без него при повышенной температуре от 50 до 90°C. Приемлемыми растворителями являются, например, CH₂Cl₂, CH₂Cl₃, метанол, этанол, ТГФ, гексаны, толуол, бензол и т.д.

Специалисту в данной области должно быть известно, что азоты в олиго(алкиленамине) формулы (пре-IV)



могут нести ортогональные защитные группы, такие как группы, описанные, например, в WO 2006/138380. В этом контексте защитную группу можно применять для временной блокады одного или нескольких азотов в соединении формулы (пре-IV), при этом реакцию можно осуществлять избирательно, не затрагивая другие незащищенные азоты в этой же молекуле. После проведения реакции защитную группу удаляют с помощью химической реакции, которая не затрагивает другие остатки, связанные с атомами азота в этой же молекуле. Ортогональные защитные группы отличаются от защитных групп, которые можно избирательно удалять с помощью химических реакций, специфически воздействующих на один тип защитной группы в данной молекуле. Например, как описано в разделе "Примеры", первичные концевые аминогруппы в олиго(алкиленамине) формулы (пре-IV) можно избирательно защищать с помощью 9-флуоренилметоксикарбонильной (Fmoc) защитной группы, а внутренние вторичные амины можно защищать с помощью трет-бутоксикарбонильной (Boc) защитной группы. Fmoc-группу можно избирательно удалять с помощью основания, а защитную Boc-группу с помощью кислоты. Защищенные и частично защищенные промежуточные продукты можно разделять с помощью хроматографии. Так, благодаря определенному позиционированию и/или избирательному удалению ортогональных защитных групп можно, например, осуществлять избирательное взаимодействие либо со всеми, либо с частью внутренних вторичных аминогрупп, либо со всеми, либо с частью из двух валентностей концевых первичных аминогрупп олиго(алкиленамина) формулы (пре-IV) с алифатическими цепями, окан-

чивающимися на одном конце эпоксидом, или акрилатом, или акриламидом. Благодаря этому же принципу можно связывать более одного вида R^7 -эпоксида или R^7 -O-(CO)-CH=CH₂, или R^7 -NH-(CO)-CH=CH₂, или R^7 -(CO)-H в данном олиго(алкиленамине) формулы (пре-IV) с "видами", относящимися к различным типам остатков R^7 в понятиях алкила или алкенила и в понятиях длины алифатической цепи и концевой эпоксида, акрилата, акриламида или альдегида. Степень дериватизации олиго(алкиленамина) формулы (пре-IV) в указанных реакциях можно контролировать с помощью стехиометрии реактантов согласно методом, известным из существующего уровня техники. После удаления защитных групп оставшиеся валентности атомов азота можно использовать для присоединения группы гуанидия (-C(NH)-NH₂), поли(этиленгликольной) цепи или лиганда рецептора. Липидоиды формулы (IV) можно очищать осаждением, экстракцией или хроматографией. Основываясь на том факте, что липидоиды формулы (IV) можно получать с помощью контролируемых ступенчатых реакций с использованием защитных групп и что степень дериватизации олиго(алкиленамина) формулы (пре-IV') можно контролировать с помощью стехиометрии реактантов, липидоид, предлагаемый в настоящем изобретении, может содержать первичные, вторичные, третичные и/или четвертичные амины и их соли. Как следствие, величины pK_a липидоидов можно также изменять путем рационального создания степени дериватизации так, чтобы один или несколько атомов азота в формуле (IV) можно было протонировать с получением катионного липидоида формулы (IV), пригодного для связывания с РНК и ее уплотнения и защиты. Кроме того, величины pK_a можно изменять так, чтобы один или несколько атомов азота в формуле (IV) могли обладать забуферивающей способностью при кислотном значении pH и в результате могли обладать действием протонной губки после поглощения в результате эндоцитоза в клетки. Предпочтительно величины pK_a липидоидов формулы (IV) составляют от 3,0 до 9,0, более предпочтительно по меньшей мере одно значение pK_a составляет от 5,0 до 8,0.

Максимальное количество алифатических боковых цепей, которые можно сшивать с олиго(алкиленамином) формулы (пре-IV) для получения липидоида формулы (IV), составляет $(p+1) \times m + n + 3$, минимальное количество равно 1, при этом p , m и n имеют значения, указанные для формулы (IV). Предпочтительно количество алифатических боковых цепей составляет по меньшей мере 2 и максимум $(p+1) \times m + n + 2$, если ни один из остатков R^1 - R^6 не имеет значение, отличное от водорода или -CH₂-CH(OH)-R⁷, -CH(R⁷)-CH₂-OH, -CH₂-CH₂-C(O)-O-R⁷, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-R⁷ или -CH₂-R⁷, и предпочтительно количество алифатических боковых цепей составляет максимум $(p+1) \times m + n + 1$, если один из остатков R^1 - R^6 обозначает защитную группу для аминокислотной группы или -C(NH)-NH₂, или поли(этиленгликольную) цепь, или лиганд рецептора.

Нуклеиновая кислота.

Композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, содержит нуклеиновую кислоту, а именно одноцепочечную РНК, предпочтительно мРНК.

Под понятие "нуклеиновая кислота" подпадают все формы встречающихся в естественных условиях типов нуклеиновых кислот, а также химические и/или ферментативно синтезированных нуклеиновых кислот, аналоги нуклеиновых кислот и производные нуклеиновых кислот, такие, например, как замкнутые нуклеиновые кислоты (ЗНК), пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК), олигонуклеозидтрифосфаты и сложные фосфотриэфиры, морфолиноолигонуклеотиды, катионные олигонуклеотиды (US 6017700 A, WO 2007/069092), замещенные рибоолигонуклеотиды или фосфоротиоаты. Кроме того, понятие "нуклеиновая кислота" относится также к любой молекуле, которая содержит нуклеотиды или нуклеотидные аналоги. Отсутствуют ограничения, касающиеся последовательности и размера нуклеиновой кислоты, входящей в композицию, предлагаемую в настоящем изобретении. Нуклеиновая кислота характеризуется главным образом ее биологическим действием, достигаемым в отношении введения к биологической мишени композиции, предлагаемой в настоящем изобретении. Например, в случае применения в генной терапии или терапии на основе нуклеиновых кислот, нуклеиновая кислота или нуклеотидная последовательность может определяться геном или генным фрагментом, который должен экспрессироваться, или требуемой заменой или репарацией дефектного гена или любой генной последовательности-мишени, или последовательностью-мишенью гена, который требуется ингибировать, "выключить" или подвергнуть понижающей регуляции.

Понятие "нуклеиновая кислота" относится к рибонуклеиновой кислоте (РНК), а именно к одноцепочечной РНК. Понятие "одноцепочечная РНК" означает одну последовательную цепь рибонуклеотидов в противоположность молекулам РНК, в которых две или большее количество отдельных цепей образуют двухцепочечную молекулу в результате гибридизации отдельных цепей. Понятие "одноцепочечная РНК" не исключает того, что одноцепочечная молекула сама образует двухцепочечные структуры, такие как петли, вторичные или третичные структуры.

Понятие "РНК" включает РНК, которая кодирует аминокислотную последовательность, а также РНК, которая не кодирует аминокислотную последовательность. Предполагается, что более 80% генома содержит функциональные ДНК-элементы, которые не кодируют белки. Указанные некодирующие последовательности включают регуляторные ДНК-элементы (сайт связывания для факторов транскрипции, регуляторы и корегуляторы и т.д.) и последовательности, которые кодируют транскрипты, которые ни-

когда не транслируются в белки. Эти транскрипты, которые кодируются геномом и транскрибируются в РНК, но не могут транслироваться в белки, называют некодирующими РНК (ncРНК). Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения РНК представляет собой некодирующую РНК. Предпочтительно некодирующая РНК представляет собой одноцепочечную молекулу. В исследованиях продемонстрировано, что psРНК имеет решающее значение в регуляции генов, поддержании целостности генома, клеточной дифференцировке и развитии, и при различных болезнях человека происходит нарушение их регуляции. Известны различные типы psРНК: короткие (20-50 нуклеотидов (nt)), средние (50-200 nt) и длинные (>200 nt) psРНК. Короткие psРНК включают микроРНК (miРНК), малые интерферирующие РНК (siРНК), РНК, взаимодействующие по *riwi*-типу (riРНК) и иницирующие транскрипцию РНК (tiРНК). Примерами средних psРНК являются малые ядерные РНК (snРНК), малые ядрышковые РНК (snoRNAs), транспортные РНК (tРНК), ассоциированные с сайтом инициации транскрипции РНК (TSSaРНК), ассоциированные с промотором малые РНК (PASR) и транскрипты, присутствующие в обратном направлении относительно сайтов инициации транскрипции (PROMPT). Длинные некодирующие РНК (lncРНК) включают длинные межгенные некодирующие РНК (lincРНК), антисмысловые-lncРНК, интронные lncРНК, транскрибируемые ультраконсервативные РНК (T-UCR) и другие (Bhan A., Mandal S.S., *ChemMedChem.*, 26 марта 2014 г. doi: 10.1002/cmdc.201300534). Из вышеуказанных некодирующих РНК только siРНК является двухцепочечной. Таким образом, поскольку в предпочтительном варианте осуществления изобретения некодирующая РНК является одноцепочечной, то предпочтительно некодирующая РНК не представляет собой siРНК. В другом варианте осуществления изобретения РНК представляет собой кодирующую РНК, т.е. РНК, которая кодирует аминокислотную последовательность. Указанные молекулы обозначают также как мРНК (матричная (информационная) РНК), и они представляют собой одноцепочечные молекулы РНК. Нуклеиновые кислоты можно создавать с помощью химического синтеза и с помощью ферментативной методологии, известных обычному специалисту в данной области, или с помощью метода рекомбинации, или можно выделять из природных источников, или получать с помощью комбинации указанных методов. Олиго- или полинуклеотиды необязательно могут содержать не встречающиеся в естественных условиях нуклеотиды и могут состоять из одной или двух или трех цепей. "Нуклеиновая кислота" обозначает также смысловые и антисмысловые олиго- или полинуклеотиды, т.е. нуклеотидную последовательность, которая является комплементарной конкретной нуклеотидной последовательности в ДНК и/или РНК.

Предпочтительно понятие нуклеиновая кислота относится к мРНК и наиболее предпочтительно к модифицированной мРНК.

Матричные РНК (мРНК) представляют собой полимеры, построенные из нуклеозидфосфатных конструктивных элементов, прежде всего аденозина, цитидина, уридина и гуанозина в качестве нуклеозидов, которые в качестве промежуточных носителей переносят генетическую информацию с ДНК в ядре клетки в цитоплазму, где происходит трансляция в белок. Таким образом, они пригодны в качестве альтернатив для генной экспрессии.

В контексте настоящего изобретения следует понимать, что мРНК обозначает любую полирибонуклеотидную молекулу, которая при попадании в клетку, пригодна для экспрессии белка или его фрагмента или может транслироваться в белок или его фрагмент. Понятие "белок" в контексте настоящего описания включает любой тип аминокислотной последовательности, т.е. цепи, состоящие из двух или большего количества аминокислот, каждая из которых связана через пептидную связь, а также включает пептиды и слитые белки.

мРНК содержит рибонуклеотидную последовательность, которая кодирует белок или его фрагмент, функция которого в клетке или в окружении клетки является необходимой или благоприятной, например белок, отсутствие которого или дефектная форма которого "запускает" заболевание или нарушение, введение которого может изменять или предупреждать заболевание или нарушение, или белок, который ускоряет процесс, который является благоприятным для организма, в клетке или ее окружении. мРНК может содержать последовательность, предназначенную для восполнения белка или его функционального варианта. Кроме того, рибонуклеотидная последовательность может кодировать белок, который действует в качестве фактора, индуктора, регулятора, стимулятора или фермента, или его функциональный фрагмент, где этот белок представляет собой белок, функция которого необходима в качестве лекарства при нарушении, прежде всего метаболическом нарушении, или для инициации процессов *in vivo*, таких как образование новых кровеносных сосудов, тканей и т.д. В контексте настоящего описания под функциональным вариантом понимают фрагмент, который в клетке может принимать функцию белка, функция которого в клетке необходима, или белок, отсутствие которого или дефектная форма которого является патогенной. Кроме того, мРНК может также иметь дополнительные функциональные области и/или 3'- или 5'-некодирующие области. 3'- и/или 5'-некодирующие области могут представлять собой области, которые в естественных условиях фланкируют кодирующую белок последовательность или искусственные последовательности, которые принимают участие в стабилизации РНК. Специалисты в данной области могут определять последовательности, пригодные для этой цели, в каждом случае с помощью общепринятых экспериментов.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения мРНК содержит кэп m7GpppG, внутрен-

ний сайт связывания рибосомы (IRES) и/или полиА-хвост на 3'-конце, прежде всего, для улучшения трансляции. мРНК может содержать также дополнительные области, усиливающие трансляцию.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения мРНК представляет собой мРНК, которая содержит комбинацию модифицированных и немодифицированных нуклеотидов. Предпочтительно она представляет собой мРНК, содержащую комбинацию модифицированных и немодифицированных нуклеотидов, которая описана в WO 2011/012316. Установлено, что указанная в этой заявке мРНК обладает повышенной стабильностью и пониженной иммуногенностью. В предпочтительном варианте осуществления изобретения в указанной модифицированной мРНК модифицировано от 5 до 50% цитидиновых нуклеотидов и от 5 до 50% уридиновых нуклеотидов. Аденозин- и гуанозинсодержащие нуклеотиды могут быть немодифицированы. Аденозиновые и гуанозиновые нуклеотиды могут быть немодифицированными или частично модифицированными, но предпочтительно они присутствуют в немодифицированной форме. Предпочтительно от 10 до 35% цитидиновых и уридиновых нуклеотидов являются модифицированными и наиболее предпочтительно содержание модифицированных цитидиновых нуклеотидов находится в диапазоне от 7,5 до 25% и содержание модифицированных уридиновых нуклеотидов находится в диапазоне от 7,5 до 25%. Было установлено, что фактически относительно низкое содержание, например, только по 10% каждого, модифицированных цитидиновых и уридиновых нуклеотидов может обеспечивать требуемые свойства. Наиболее предпочтительным является, чтобы модифицированные цитидиновые нуклеотиды представляли собой 5-метилцитидиновые остатки и модифицированные уридиновые нуклеотиды представляли собой 2-тиоуридиновые остатки. Наиболее предпочтительно содержание модифицированных цитидиновых нуклеотидов и содержание модифицированных уридиновых нуклеотидов составляло 25% соответственно.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения мРНК можно объединять с сайтами связывания-мишенями, последовательностями, обеспечивающими направленный перенос и/или сайтами связывания микро-РНК для обеспечения активности требуемой мРНК только в соответствующих клетках. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения РНК можно объединять с микро-РНК или shРНК по ходу транскрипции относительно 3'-поли А-хвоста.

Кроме того, понятие "нуклеиновая(ые) кислота(ы)" может относиться к РНК или их гибридам или любой их модификации, известной в данной области (см., например, US 8278036, WO 2013/052523, WO 2011/012316, US 5525711, US 4711955, US 5792608 или EP 302175 (см. примеры модификаций у Lorenz и др., *Bioorg Med Chem Lett*, 14, 2004, сс. 4975-4977; Soutschek и др., *Nature*, 432, 2004, сс. 173-178). Указанная(ые) молекула(ы) нуклеиновой(ых) кислоты(т) является(ются) однодвухцепочечной(ыми), линейной(ыми) или кольцевой(ыми), естественной(ыми) или синтетической(ими) и не имеют никакого ограничения по размеру. Например, молекула(ы) нуклеиновой(ых) кислоты(т) может(гут) представлять собой мРНК, антисмысловую РНК, рибозим или малые интерферирующие РНК (siРНК), микро-РНК, антагомиры или короткие РНК, образующие шпильки (shРНК), tРНК, или химеропласты (Colestraus и др., *Science*, 273, 1996, сс. 1386-1389), или аптамеры, короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами ("CRISPR" для направляемого РНК сайтспецифического расщепления ДНК) (Cong и др., *Science*, 339, 2013, сс. 819-823). Указанная(ые) молекула(ы) нуклеиновой(ых) кислоты(т) может(гут) иметь формулы плазмид, космид, искусственных хромосом, вирусной РНК, кодирующей и некодирующей одноцепочечной (мРНК) и олигонуклеотида(ов), которые включают любые известные в данной области модификации в сахарном каркасе и/или в основаниях, указанные выше, и 3'- или 5'-модификации. В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой мРНК или siРНК.

Нуклеиновая(ые) кислота(ы) может(гут) содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, который должен экспрессироваться в клетке-мишени. Можно применять методы, хорошо известные специалистам в данной области, для конструирования рекомбинатных молекул нуклеиновых кислот; см., например, методики, описанные у Sambrook и др., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 2001 и Ausubel и др., *Current Protocols in Molecular Biology*, изд-во Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанная нуклеиновая кислота представляет собой терапевтически или фармацевтически активную нуклеиновую кислоту, включая все типы нуклеиновых кислот и модификаций, описанные выше и известные специалисту в данной области, которые могут оказывать терапевтическое или профилактическое действие. В целом, терапевтические или профилактические действия можно достигать путем взаимодействия нуклеиновой кислоты с клеточными молекулами или органеллами. Одно такое взаимодействие может, например, активировать врожденную иммунную систему, что имеет место в случае некоторых CpG-олигонуклеотидов и последовательной, сконструированных для специфического взаимодействия с толл-подобными и другими вне- или внутриклеточными рецепторами. Кроме того, поглощение или интродукция нуклеиновых кислот в клетки может предназначаться для экспрессии нуклеотидных последовательностей, таких как гены, входящие в нуклеиновую кислоту, может предназначаться для понижающей регуляции, молчания или выключения экспрессии эндогенного гена в результате присутствия внутри клетки интродуцированной экзогенной нуклеиновой кислоты или может предназначаться для модификации эндогенных нуклеотидных последо-

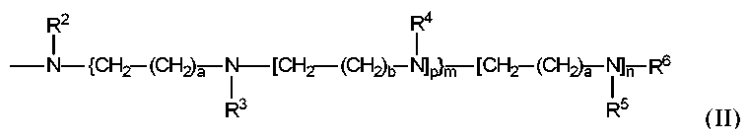
вательностей, такой как репарация, эксцизия, инсерция или обмен выбранных оснований или полных сегментов эндогенных нуклеотидных последовательностей, или может предназначаться для интерференции фактически с любым клеточным процессом в результате присутствия внутри клетки интродуцированной экзогенной нуклеиновой кислоты. Сверхэкспрессия интродуцированных экзогенных нуклеиновых кислот может предназначаться для компенсации или комплементации экспрессии эндогенного гена, прежде всего в случае, когда эндогенный ген является дефектным или молчащим, что приводит к отсутствию продукта генной экспрессии, получению его в недостаточном количестве или получению дефектного продукта или продукта с нарушенной функцией, что имеет место в случае многих метаболических и наследственных болезней, в том числе типа муковисцидоза, гемофилии или мышечной дистрофии. Сверхэкспрессия интродуцированных экзогенных нуклеиновых кислот может предназначаться также для получения продукта экспрессии, который взаимодействует с любым эндогенным клеточным процессом, таким как регуляция генной экспрессии, трансдукция сигнала и другие клеточные процессы, или препятствует ему. Сверхэкспрессия интродуцированных экзогенных нуклеиновых кислот может предназначаться также для повышения иммунного ответа у организма, в котором присутствуют или должны присутствовать трансфектированные или трансдуцированные клетки. Примерами являются генетическая модификация антигенпрезентирующих клеток, таких как дендритные клетки, для того, чтобы они могли презентовать антиген с целью вакцинации. Другими примерами являются сверхэкспрессия цитокинов в опухолях для того, чтобы вызвать опухольспецифический иммунный ответ. Кроме того, сверхэкспрессия интродуцированных экзогенных нуклеиновых кислот может предназначаться для создания *in vivo* или *ex vivo* временно генетически модифицированных клеток для клеточных терапий, таких как модифицированные Т-клетки, или клетки-предшественники, или стволовые, или другие клетки для регенеративной медицины.

Для достижения понижающей регуляции, молчания или выключения генной экспрессии в терапевтических целях можно применять, например, РНК-интерференцию (РНКi), с использованием рибозимов, антисмысловых олигонуклеотидов, tРНК, длинных двухцепочечных РНК, причем указанная понижающая регуляция может быть специфической или неспецифической для последовательности и может приводить также к клеточной гибели, как в случае, когда в клетки интродуцируют длинные двухцепочечные РНК. Понижающая регуляция, молчание или выключение эндогенной или ранее существующей генной экспрессии могут быть ценными при лечении приобретенных, наследственных или спонтанно возникающих болезней, включая вирусные инфекции и рак. Можно предполагать также, что интродукцию нуклеиновых кислот в клетки на практике можно применять в качестве профилактической меры для профилактики, например, вирусной инфекции или неоплазии. Понижающую регуляцию, молчание или выключение эндогенной генной экспрессии можно осуществлять на транскрипционном уровне или на трансляционном уровне. Специалисту в данной области известно множество механизмов, и они включают, например, эпигенные модификации, изменения в структуре хроматина, избирательное связывание факторов транскрипции с помощью интродуцированной нуклеиновой кислоты, гибридизацию интродуцированной нуклеиновой кислоты с комплементарными последовательностями, мРНК или других видах РНК путем спаривания оснований, включая неканонические механизмы спаривания оснований, такие как образование тройной спирали. Аналогично этому, можно осуществлять репарацию гена, изменения оснований или последовательностей на геномном уровне и на уровне мРНК, включая пропуск экзонов. Изменения оснований или последовательностей можно осуществлять, например, применяя направляемое РНК сайт-специфическое расщепление ДНК путем механизмов разрезания и склеивания, в которых используется транс-сплайсинг, транс-сплайсинг с помощью рибозимов, химерапласты, транс-сплайсинг РНК, опосредуемый сплайсисомой, или применяя интроны группы II, или перенаправленные интроны, или применяя инсерционный мутагенез, опосредуемый вирусами, или применяя направленную геномную инсерцию с использованием систем прокариотических, эукариотических или вирусных интеграз. Поскольку нуклеиновые кислоты являются носителями конструктивных элементов живых систем и поскольку они принимают участие во многих клеточных процессах прямым или косвенным образом, теоретически на любой клеточный процесс можно влиять путем интродукции извне нуклеиновых кислот в клетку. Важно отметить, что указанную интродукцию можно осуществлять непосредственно *in vivo* и *ex vivo* в культуры клетки или органа с последующей трансплантацией указанных модифицированных органов или клеток реципиенту. Комплексы, предлагаемые в настоящем изобретении, включающие нуклеиновые кислоты в качестве действующих веществ, можно применять для всех описанных выше целей.

Композиция.

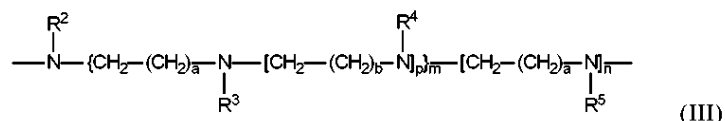
Как указано выше, композиция, предлагаемая в изобретении, содержит одноцепочечную РНК и компонент, который содержит олиго(алкиленамин), где компонент выбран из

а) олигомера или полимера, содержащего множество групп формулы (II) в качестве боковой цепи и/или в качестве концевой группы



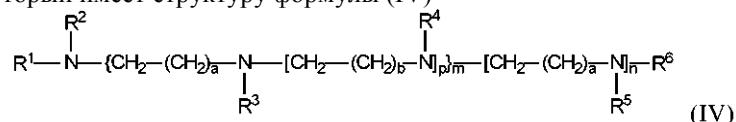
где переменные a, b, p, m, n и R²-R⁶ имеют указанные выше значения, включая предпочтительные варианты и прежде всего предпочтительные группы формул (IIa)-(IId); и где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (II), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионной группы формулы (II);

б) олигомера или полимера, содержащего множество групп формулы (III) в качестве повторяющихся звеньев



где переменные a, b, p, m, n и R²-R⁵ имеют указанные выше значения, включая предпочтительные варианты и прежде всего предпочтительные группы формул (IIIa)-(IIId); и где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (III), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионной группы формулы (III); или

в) липидоид, который имеет структуру формулы (IV)



где переменные a, b, p, m, n и R¹-R⁶ имеют указанные выше значения, включая предпочтительные варианты и прежде всего предпочтительные структуры формул (IVa)-(IVc); и где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (IV), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионной группы формулы (IV).

Изобретение относится также к композиции, которая состоит из мРНК и компонента, содержащего олиго(алкиленамин), выбранный из компонентов, указанных в подпунктах а)-в), включая их предпочтительные варианты. Однако композиция может содержать также дополнительные компоненты, например компоненты для липидной препаративной формы и/или компоненты, обладающие эффекторной функцией в процессе введения одноцепочечной РНК, предпочтительно мРНК к клетке или в клетке.

Как должно быть, очевидно, композиции, предлагаемые в изобретении, как правило, обеспечивают ассоциацию одноцепочечной РНК, предпочтительно мРНК, с олигомером, полимером или липидоидом и необязательными другими компонентами, которые ассоциированы в конечной субстанции, которая является достаточно стабильной для того, чтобы поддерживать ассоциацию требуемых соотношений указанных компонентов вплоть до достижения биологической мишени или окружения биологической мишени в процессе обработки, например в процессе введения требуемым путем одноцепочечной РНК, предпочтительно мРНК.

Из-за присутствия аминогрупп, которые могут протонироваться, в олигомерах, полимерах или липидоидах, предлагаемых в изобретении, указанные олигомеры, полимеры или липидоиды могут содержать катионные заряды групп формулы (II) или (III) или в структуре формулы (IV), в результате чего олигомеры, полимеры или липидоиды образуют катионы, как правило, олиго- или поликатионы, содержащие множество катионных групп в присутствии протонов, например, в воде или водных растворах, или в присутствии отдающей протон кислоты. Так, предпочтительно композиция, предлагаемая в изобретении, содержит или состоит из комплекса одноцепочечной РНК, предпочтительно мРНК, и катионного олигомера, полимера или липидоида, предлагаемого в изобретении. Как должно быть очевидно, катионный олигомер, полимер или липидоид и анионная нуклеиновая кислота, как правило, ассоциируются путем электростатического взаимодействия с образованием такого комплекса. Однако в зависимости от специфической структуры олигомера, полимера или липидоида и одноцепочечной РНК, предпочтительно, другие основанные на силе притяжения взаимодействия, включая водородные связи и ковалентные связи, могут также принимать участие в стабилизации комплекса.

В композициях, предлагаемых в настоящем изобретении, олигомер, полимер или липидоид и одноцепочечная РНК предпочтительно могут содержаться, например, при таком соотношении массы олигомера, полимера или липидоида/массы нуклеиновой кислоты (мас./мас), как 0,25/1-50/1, предпочтительно 0,5/1-30/1, более предпочтительно 1/1-20/1.

Более предпочтительно в случаях, когда композиция содержит комплекс одноцепочечной РНК, предпочтительно, и катионного олигомера, полимера или липидоида, предлагаемый в изобретении, относительные соотношения олигомера, полимера или липидоида и одноцепочечной РНК, предпочтительно в композициях, предлагаемых в изобретении, можно выбирать, учитывая степень нейтрализации общего заряда. В одноцепочечной РНК предпочтительно, которую вводят в виде комплексов одноцепочечной РНК,

ченной РНК, предпочтительно с катионным олигомером, полимером или липидоидом, как правило, катионный олигомер, полимер или липидоид смешивают с данным количеством одноцепочечной РНК, предпочтительно в таком количестве, которое обеспечивает, по меньшей мере, нейтрализацию отрицательных зарядов одноцепочечной РНК, предпочтительно сверхкомпенсацию отрицательных зарядов одноцепочечной РНК.

Приемлемые соотношения между катионным олигомером, полимером или липидоидом и одноцепочечной РНК легко можно определять с помощью анализов задерживания в геле, методов гашения флуоресценции, таких как анализ вытеснения/гашения бромида этидия, путем измерения размеров частиц и зета-потенциала. Приемлемые соотношения между олигомером, полимером или липидоидом и одноцепочечной РНК как правило характеризуются, по меньшей мере частичным, предпочтительно полным задерживанием одноцепочечной РНК, входящей в комплекс с катионным олигомером, полимером или липидоидом, при осуществлении электрофореза в агарозном геле, высокой степенью флуоресцентного гашения красителей, таких как бромид этидия, RiboGreen или YOYO, встроенных в одноцепочечную РНК, или образованием (нано)частиц после смешения олигомера, полимера или липидоида и одноцепочечной РНК. Для химически хорошо охарактеризованных катионов рассчитанное соотношение N/P является приемлемым фактором для выбора и определения относительных соотношений олигомера, полимера или липидоида и одноцепочечной РНК. Соотношение N/P обозначает молярное соотношение способных протонироваться атомов азота в группах формулы (II) (или ее предпочтительных вариантах), в группах формулы (III) (или ее предпочтительных вариантах) или в структурах формулы (IV) (или ее предпочтительных вариантах) олигомера, полимера или липидоида, предлагаемого в настоящем изобретении, и фосфатных групп одноцепочечной РНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении. Соотношение N/P является принятым параметром для характеристики указанных комплексов одноцепочечной РНК с катионными носителями, и специалисту, изучающему настоящую заявку, должно быть очевидно, что, например, атомы азота в амидных связях не рассматриваются в качестве способных к протонированию атомов азота. В случае катионного олигомера или полимера соотношение N/P удобно рассчитывать, например, с использованием формулы

$$\frac{N}{P} = \frac{w_p \times n}{M_{wp}} \div \frac{w_{na}}{M_{base}}$$

в которой w_p обозначает массу олигомера или полимера, n обозначает количество обладающих способностью к протонированию аминогрупп на повторяющее звено, M_{wp} обозначает молекулярную массу повторяющего звена (включая противоионы), w_{na} обозначает массу одноцепочечной РНК и M_{base} обозначает среднюю молекулярную массу нуклеотидов в РНК, которая составляет 346 в случае одноцепочечной РНК. В бинарных комплексах поликатион/РНК, предназначенных для введения одноцепочечной РНК, предлагаемых в изобретении, предпочтительно следует использовать относительные количества олигомера, полимера или липидоида и одноцепочечной РНК, которые обеспечивают соотношение N/P, при котором конечная бинарная композиция имеет положительный зета-потенциал. Для композиции, содержащей липидоид формулы (IV) и РНК, соотношение N/P удобно рассчитывать, учитывая количество обладающих способностью к протонированию атомов азота в липидоиде или количество молей липидоида, применяемых в композиции. В контексте настоящего изобретения в бинарных композициях, предлагаемых в настоящем изобретении, предпочтительными являются соотношения N/P от 1 до 100, более предпочтительными являются соотношения N/P от 3 до 60 и наиболее предпочтительными являются соотношения N/P от 4 до 44.

Композиция, предлагаемая в изобретении, необязательно содержит дополнительные компоненты для липидной препаративной формы. Например, композиция, содержащая липидоид формулы (IV) или ее предпочтительные варианты, включающие формулы (IVa)-(IVc), содержит также липиды, такие как холестерин, DOPE (диолеилфосфатидилэтаноламин), DOPC (диолеилфосфатидилхолин) или DSPC (дистеароилфосфатидилхолин), которые в научной литературе называют хелперными липидами, и/или ПЭГилированные липиды любого другого липида, применяемого для получения липopleксов. Предпочтительными хелперными липидами в контексте настоящего изобретения являются холестерин, DOPE, DOPC и DSPC. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция, содержащая липидоид, включает липидоид в количестве примерно 40-60%, холестерин в количестве примерно 40-60% и ПЭГилированный липид в количестве примерно 5-20% (в мас.% в пересчете на массу всей композиции). В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция, содержащая липидоид, включает липидоид в количестве примерно 50-60%, холестерин в количестве примерно 40-50% и ПЭГилированный липид в количестве примерно 5-10%. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция, содержащая липидоид, включает липидоид в количестве примерно 50-70%, холестерин в количестве примерно 20-40% и ПЭГилированный липид в количестве примерно 1-10%. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция, содержащая липидоид, включает липидоид в количестве примерно 60-70%, холестерин в количестве примерно 25-35% и ПЭГилированный липид в количестве примерно 5-10%. Композицию можно приготавливать с помощью любого из методов, известных в данной области (например, описанных у Akinc и др., Nat. Biotech, 26, 2007, сс. 561-569; Akinc и др., Mol. Ther., 17, 2009, сс.

872-9; Love и др., PNAS, 107, 2010, сс. 1864-1869; US 8450298, WO 2006/138380). Комплексы одноцепочечная РНК/липидоид могут образовывать частицы, которые можно применять для введения одноцепочечной РНК, предпочтительно мРНК, в клетки. Многочисленные липидоидные молекулы могут ассоциироваться с одноцепочечной РНК предпочтительно. Например, комплекс может включать 1-100 липидоидных молекул, 1-1000 липидоидных молекул, 10-1000 липидоидных молекул или 100-10000 липидоидных молекул. Комплекс (м)РНК и липидоида может образовывать частицу. Диаметр частиц может находиться в диапазоне, например, от 10 до 1200 нм, более предпочтительно диаметр частиц находится в диапазоне от 10 до 500 нм и наиболее предпочтительно от 20 до 150 нм. Композиция, предлагаемая в изобретении, необязательно содержит компоненты, которые обладают эффекторной функцией в процессе введения одноцепочечной РНК, предпочтительно мРНК, в клетку или в клетке. Указанные компоненты могут представлять собой (но не ограничиваясь только ими) полианионы, липиды, описанные выше, поликатионы, отличные от присутствующих олигомеров, полимеров или дендримеров, включая катионные пептиды, защищающие олигомеры или полимеры, поллоксамеры (которые называют также плуроники), поллоксамыны, нацеливающие лиганды, эндосомолитические агенты, проникающие в клетку и сигнальные пептиды, магнитные и немагнитные наночастицы, ингибиторы РНКазы, флуоресцентные красители, радиоизотопы или контрастирующие агенты для медицинской визуализации. Под понятие "эффекторная функция" подпадает любая функция, которая поддерживает достижение требуемого биологического действия одноцепочечной РНК, предпочтительно мРНК, входящей в композицию, на биологической мишени, в биологической мишени или в окружении биологической мишени. Например, композиции для введения нуклеиновых кислот приготавливают таким образом, чтобы они содержали некодирующие нуклеиновые кислоты или полианионы, не относящиеся к нуклеиновым кислотам, в качестве материалов-наполнителей (Kichler и др., J. Gene Med., 7, 2005, сс. 1459-1467). Указанные материалы-наполнители можно применять для снижения дозы нуклеиновой кислоты, обладающей требуемым биологическим действием, поддерживая при этом уровень или степень действия, получаемого при применении нуклеиновой кислоты в более высокой дозе, при отсутствии указанного материала-наполнителя. Полианионы, не относящиеся к нуклеиновым кислотам, применяли также для достижения пролонгированной генной экспрессии *in vivo* с пониженной токсичностью (Uchida и др., J. Control. Release, 155, 2011, сс. 296-302). Композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, могут содержать также катионные, анионные или нейтральные липиды, например, в случае липополиплексов (Li и Huang в: "Nonviral Vectors for Gene Therapy", изд-во Academic Press, гл. 13, 1999, сс. 295-303). Липополиплексы целесообразно получать из предлагаемых в настоящем изобретении полимеров, соответствующих формулам (II) и (III), с предлагаемыми в настоящем изобретении липидоидами, соответствующими формуле (IV). Кроме того, композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, могут содержать олиго- или поликатионы, отличные от содержащих олиго(аминоалкилены) катионных олигомеров, полимеров или липидоидов, предлагаемых в настоящем изобретении. Такие дополнительные поликатионы можно применять для достижения требуемой степени уплотнения нуклеиновой кислоты или в случае поликатионных пептидов они могут обладать описанной ранее сигнальной функцией ядерной локализации (Ritter и др., J. Mol. Med., 81, 2003, сс. 708-717). Защитные полимеры, такие как поли(этиленгликоль) (ПЭГ), могут также входить в состав композиций, предлагаемых в настоящем изобретении, и их часто применяют для стабилизации полиплексов и липоплексов с целью защиты от агрегации и/или нежелательных взаимодействий в биологическом окружении (опсонизация), например взаимодействий с компонентами сыворотки, клетками крови или внеклеточным матриксом. Защиту можно применять также для снижения токсичности композиций, содержащих нуклеиновые кислоты (Finsinger и др., Gene Ther., 7, 2000, сс. 1183-1192). Защитные полимеры, такие как ПЭГ, можно ковалентно связывать непосредственно с полимерами или липидоидами, предлагаемыми в настоящем изобретении. Связывание можно осуществлять в полимерном каркасе, предпочтительно, если это возможно, с концевыми группами полимерного каркаса или дендримера. Однако связывание можно осуществлять также, если это возможно, с аминоклуппами формул (II), (III) и (IV).

Установлено, что поливинилные производные, такие как ПВП (поливинилпирролидон) и поллоксамеры, можно применять для усиления трансфекции после внутримышечной инъекции (Mumprer и др., Pharm Res, 13, 1996, сс. 701-709, Lemieux и др., Gene Ther, 7, 2000, сс. 986-991) и поэтому их можно применять для включения в композиции, предлагаемые в настоящем изобретении.

Нацеливающие лиганды, включая антитела, входящие в композиции для введения нуклеиновых кислот, можно применять для предпочтительной и улучшенной трансфекции клеток-мишеней (Philipp и Wagner в "Gene and Cell Therapy - Therapeutic Mechanisms and Strategy", 3-е изд., гл. 15, изд-во CRC Press, Taylor & Francis Group LLC, Boca Raton, 2009). Нацеливающий лиганд может представлять собой любое соединение, которое придает композициям, предлагаемым в настоящем изобретении, функцию распознавания и/или связывания мишени прямым или косвенным образом. В наиболее общих понятиях мишень представляет собой определенную биологическую структуру, с которой нацеливающий лиганд может специфически связываться путем молекулярного взаимодействия, и при этом указанное связывание должно, в конце концов, приводить к предпочтительному накоплению нуклеиновой кислоты, входящей в композицию, в ткани-мишени и/или на или в клетке-мишени. Аналогично подходу, описанному

для цепей ПЭГ, нацеливающие лиганды можно связывать с концевыми группами полимерного каркаса или дендримера. Однако связывание можно осуществлять также с группами формул (II), (III) и (IV).

Кроме того, ценными компонентами композиций, предлагаемых в настоящем изобретении, являются эндосомолитические агенты, такие как эндосомолитические пептиды (Plank и др., *Adv Drug Deliv Rev*, 34, 1998, сс. 21-35), или любое другое соединение, которое можно применять для высвобождения из эндосом включенной в результате эндоцитоза нуклеиновой кислоты. Аналогично этому проникающие в клетки пептиды (в другом контексте известные также как домены белковой трансдукции) (Lindgren и др., *Trends Pharmacol Sci*, 21, 2000, сс. 99-103) могут представлять собой ценные компоненты композиций, предлагаемых в настоящем изобретении, для опосредования внутриклеточного введения нуклеиновой кислоты. Так называемый TAT-пептид относится к этому классу, и он также обладает функцией ядерной локализации (Rudolph и др., *J. Biol. Chem.*, 278, 2003, сс. 11411-11418).

Магнитные наночастицы, которые можно включать в композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять для физического направленного введения под действием магнитной силы и для резкого повышения эффективности переноса нуклеиновых кислот, механизма, известного также как магнитофекция (EP 1297169; Plank и др., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 63, 2011, сс. 1300-1331). Аналогично этому композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может также представлять собой немагнитные или магнитные микропузырьки, применяемые для физического усиления и направленного введения нуклеиновых кислот посредством применения ультразвука и необязательно магнитного поля (Holzbach и др., *J. Cell. Mol. Med.*, 14, 2010, сс. 587-599, Vlaskou и др., *Adv. Funct. Mater.*, 20, 2010, сс. 3881-3894). Квантовые точки (Zintchenko и др., *Mol. Ther.*, 17, 2009, сс. 1849-1856), радиоактивные трейсеры и контрастирующие агенты для медицинской визуализации целесообразно использовать для отслеживания введения нуклеиновой кислоты и для определения биораспределения композиций, предназначенных для введения нуклеиновых кислот. Обобщая вышесказанное, описаны многочисленные эффекторы для введения нуклеиновых кислот, и они могут представлять собой ценные компоненты в композициях, содержащих нуклеиновую кислоту и олигомер, или полимер, или дендример, предлагаемый в изобретении.

Специалистам в данной области хорошо известно, что существует высокая степень гибкости в отношении количества каждого компонента, входящего в композицию, предлагаемую в настоящем изобретении. Таким образом, частицы, предлагаемые в настоящем изобретении, могут представлять собой (нано)частицы, содержащие несколько молекул одноцепочечной РНК предпочтительно, а также могут представлять собой макроскопическое вещество, такое как осадок или сухой порошок, содержащий очень большое количество молекул одноцепочечной РНК предпочтительно. Обобщая вышесказанное, композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, отличаются исходными соотношениями их компонентов перед самосборкой. Как правило, исходные соотношения (мас./мас.) индивидуальных компонентов относительно компонента, представляющего собой одноцепочечную РНК, предпочтительно мРНК, составляет от 1 до 50. Соотношение N/P является приемлемым критерием исходного соотношения для бинарных полимерных/дендримерных или липидоидных композиций, когда олигомер или полимер/дендример или липидоид является хорошо определенным химически. Если композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, содержит дополнительные компоненты, то назначенное соотношение N/P может оказаться сомнительным. В этом случае приемлемые исходные соотношения определяют с помощью эксперимента, включающего (но не ограничиваясь только ими) анализы задерживания в геле, анализы гашения флуоресценции, такие как анализ вытеснения/гашения бромида этидия, измерение размеров частиц и зета-потенциала, а также функциональных анализов, таких как анализы трансфекции, представленные в настоящем описании. В третичных комплексах, содержащих дополнительный полианион или защитные полимеры, соотношение чистых зарядов (положительный относительно отрицательного) может составлять менее 1, а зета-потенциал может быть нейтральным или отрицательным.

Композицию, предлагаемую в изобретении, можно получать согласно описанному ниже методу. После процесса самосборки композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, можно отделять от не включенных в нее компонентов и на этой стадии суспензионную среду можно заменять центрифугированием, или ультрафильтрацией, или гель-фильтрацией, или диализом, или аналогичными методами. Стехиометрию компонентов композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, очищенной или неочищенной, можно определять различными аналитическими методами, включая спектроскопические методы, такие как УФ/VIS-спектрометрия или флуоресцентная корреляционная спектроскопия (DeRouchey и др., *J. Phys. Chem. B*, 110(10), 2006, сс. 4548-4554), с помощью ортогональной флуоресценции или радиоизотопного мечения индивидуальных компонентов, с помощью ЯМР- или ИФ-спектроскопии или хроматографического анализа и количественной оценки композиции после расчленения композиции. Для расчленения можно, например, добавлять избыток полианиона, такого как гепарин, как указано в настоящем описании, или хондроитинсульфат или добавлять додецилсульфат натрия.

Композиции, предлагаемые в изобретении, можно получить различными способами. Олигомеры, полимеры или липидоиды, предлагаемые в настоящем изобретении, можно получать и очищать согласно настоящему описанию. Олигомеры, полимеры или липидоиды можно хранить в водном растворе или в виде сухого порошка, в этом случае его повторно растворяют в водной среде предпочтительно воде, перед получением композиции. Значение pH раствора при необходимости доводят до нейтрального

или слегка кислого (снижая до pH 4,5) с помощью кислоты, предпочтительно соляной или лимонной кислоты. В случае, когда нуклеиновой кислотой, входящей в композицию, является одноцепочечная РНК предпочтительно, то предпочтительно значение pH доводят примерно до 4,5-5,5, предпочтительно до примерно 4,9-5,1, более предпочтительно до примерно 5,0. Нуклеиновые кислоты получают и очищают с помощью методов, хорошо известных специалисту в данной области. Нуклеиновую кислоту применяют в растворе в водной среде, предпочтительно воде. Необязательно либо олигомер, полимер или липидоид, либо нуклеиновую кислоту или их обоих химически связывают с эффекторными молекулами, такими как нацеливающие лиганды, сигнальные пептиды, проникающие в клетку пептиды, эндосомолитические субстанции или защитные полимеры. Однако в зависимости от химической природы эффекторных молекул они могут не нуждаться в присоединении с помощью химической связи, а скорее их можно включать в композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, посредством самосборки, основанной на нековалентном связывании, т.е. путем электростатического, гидрофобного или Ван-дер-ваальсового взаимодействия с другими компонентами композиции. Для этой цели целесообразно регулировать ионную силу, тип противоиона, pH или содержание органического растворителя в растворах индивидуальных компонентов.

Органические растворители можно использовать для приготовления маточных растворов липидоидов формулы (IV), и они могут требоваться для совместной сборки дополнительных слабо растворимых в воде или не растворимых в воде компонентов, таких как липиды или гидрофобные олигомеры или полимеры. Приемлемыми органическими растворителями являются, например, смешивающиеся с водой растворители, такие как этанол и другие спирты, диметилсульфоксид, диметилформамид, N-метилпирролидон или гликофуrol и другие растворители, описанные в WO 2013/045455. В одном из вариантов осуществления изобретения содержащие липидоид композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, приготавливают из липидоидов и дополнительных компонентов, таких как хелперные липиды, растворенные в любом из этих растворителей, предпочтительно этаноле, и одноцепочечной РНК, предпочтительно мРНК, растворенной в водной среде, предпочтительно забуференной до кислого значения pH. На первой стадии компоненты, растворенные в органической фазе, смешивают в требуемом стехиометрическом соотношении и разводят до требуемого конечного объема с помощью выбранного органического растворителя. Количество одноцепочечной РНК, предпочтительно мРНК, соответствующее требуемому конечному соотношению относительно липидоида, разводят в водной среде. Предпочтительно объем водной среды, по меньшей мере, равен объему объединенных растворов компонентов в органическом растворителе. Предпочтительно объем водной фазы, содержащей одноцепочечную РНК, предпочтительно мРНК, превышает объем объединенных растворов компонентов в органическом растворителе, наиболее предпочтительно объемное соотношение водной и органической фазы составляет 4:1. На второй стадии содержащую липидоид органическую смесь быстро инъецируют в водный раствор одноцепочечной РНК, предпочтительно мРНК, предпочтительно при интенсивном перемешивании. Необязательно растворы одноцепочечной РНК, предпочтительно мРНК, и липидоидные компоненты нагревают до или после этой стадии вплоть до 70°C. При необходимости или, если это является желательным, органический растворитель на этой стадии можно удалять выпариванием, диализом, ультрафильтрацией, диафильтрацией или гель-фильтрацией, причем на этой же стадии дисперсионную среду можно обменивать на конечный требуемый буфер для композиции, такой как ЗФР. Необязательно композицию можно экструдировать через мембранные фильтры с требуемым размером пор для стерилизации и/или для получения монодисперсной препаративной формы.

В качестве альтернативы процедуре смешения, описанной выше, одноцепочечную РНК, предпочтительно мРНК, и липидоидный компонент можно смешивать с помощью автоматического устройства для микросмешения, например, описанного у Hirota с соавт. (Hirota и др., *Biotechniques*, 27, 1999, сс. 286-290) или у Kasper с соавт. (Kasper и др., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 77, 2011, сс.182-185), или путем микрофлюидного фокусирования, сведения о котором обобщены у Xuan с соавт. (Xuan и др., *Microfluidics and Nanofluidics*, 9, 2010, сс. 1-16).

Альтернативным путем получения содержащих липидоиды композиций, предлагаемых в настоящем изобретении, является получение с использованием липосом или мицелл в качестве промежуточного продукта. Липоплексы часто получают из поступающих в продажу трансфектирующих реагентов, которые представляют собой мицеллы или липосомы в водной суспензии. Липидоиды, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять для получения мицелл или липосом. В данной области известно много технологий получения мицелл и липосом, и любой метод можно применять с использованием предлагаемых в изобретении липидоидов для получения мицелл и липосом. Кроме того, в мицеллу или липосому можно включать любой агент, в том числе одноцепочечную РНК, предпочтительно мРНК, малые молекулы, белки, пептиды, металлы, металлоорганические соединения и т.д. В некоторых вариантах осуществления изобретения липосомы (липидные или липидоидные пузырьки) образуются путем спонтанной сборки. В других вариантах осуществления изобретения липосомы образуются, когда тонкие липидные пленки или липидные осадки гидратируют и объединенные липидные кристаллические бислои становятся текучими и набухшими. Гидратированные липидные пласты отделяются во время перемешивания и сами закрываются с образованием крупных многослойных пузырьков (LMV). Это препятствует

взаимодействию воды с углеродным ядром бислоев на краях. После образования указанных липосом снижение размера частиц можно модифицировать с помощью звуковой энергии (обработка ультразвуком) или механической энергии (экструзия) (Szoka и др., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 9, 1980, сс. 467-508). Получение липосом включает получения липидоидов, предназначенных для гидратации, гидратацию липидоидов путем перемешивания и разделение по размерам для достижения гомогенного распределения липосом. Для этой цели липидные компоненты, которые должны входить в композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, растворяют в виде маточных растворов в органическом растворителе, таком как хлороформ. Затем компоненты смешивают в требуемом стехиометрическом соотношении и органический растворитель удаляют с помощью роторного испарителя в приемлемом сосуде, таком как круглодонная колба, с получением тонкой липидной пленки на стенке сосуда. Предпочтительно пленку сушат в глубоком вакууме. Гидратацию липидоидных пленки/осадка осуществляют, добавляя водную среду в контейнер с сухим липидоидом и перемешивая смесь. Разрушение суспензий LMV с помощью звуковой энергии, как правило, приводит к получению мелких однослойных пузырьков (SUV) с диаметром в диапазоне 15-50 нм. Экструзия липидов представляет собой технологию, при которой липидную суспензию пропускают под действием силы через поликарбонатный фильтр с определенным размером пор с получением частиц, имеющих диаметр, близкий к размеру пор применяемого фильтра. Экструзия через фильтры с размером пор 100 нм, как правило, приводит к получению крупных однослойных пузырьков (LUV), средний диаметр которых составляет 120-140 нм. Некоторые липидоиды обладают способностью к спонтанной самосборке вокруг определенных молекул, таких как нуклеиновые кислоты (например, мРНК), с образованием липосом. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения применение предусматривает введение одноцепочечной РНК, предпочтительно мРНК. Применение указанных липидоидов позволяет упростить сборку липосом без необходимости в дополнительных стадиях или устройствах, таких как экструдер.

Композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, которая содержит одноцепочечной РНК, предпочтительно мРНК, затем можно получать путем самосборки после смешения растворов компонентов. Самосборку можно осуществлять путем перемешивания вручную с использованием пипетирования и встряхивания/интенсивного перемешивания или с использованием автоматического устройства для микросмешения, описанного у Hirota с соавт. (Hirota и др., *Biotechniques*, 27, 1999, сс. 286-290) или у Kasper с соавт. (Kasper и др., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 77, 2011, сс. 182-185), или путем микрофлюидного фокусирования, сведения о котором обобщены у Xuan с соавт. (Xuan и др., *Microfluidics and Nanofluidics*, 9, 2010, сс. 1-16). Если композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, содержит дополнительные компоненты помимо одноцепочечной РНК, предпочтительно мРНК, и олигомера, полимера или липидоид, предлагаемого в настоящем изобретении, может требоваться последовательное смешение. В этом случае любой дополнительный компонент можно добавлять после самосборки олигомера, полимера или липидоид и одноцепочечной РНК, предпочтительно мРНК, или его можно добавлять к любому из них перед смешением. Наиболее приемлемая последовательность стадий смешения должна зависеть от химической природы дополнительных компонентов. Например, если дополнительный компонент является отрицательно заряженным, то его наиболее предпочтительно можно добавлять к компоненту, представляющему собой одноцепочечную РНК, предпочтительно мРНК, перед смешением с олигомером, полимером или липидоидом или к предварительно сформированному комплексу олигомера, полимера или липидоид и одноцепочечной РНК, предпочтительно мРНК, в котором олигомер, полимер или липидоид присутствует в избыточном количестве с точки зрения соотношения положительных зарядов и суммы отрицательных зарядов (м)РНК и дополнительного анионного компонента. И, наоборот, если дополнительный компонент является катионным, то его наиболее предпочтительно можно добавлять к олигомеру, полимеру или липидоиду перед смешением с (м)РНК. Или его можно применять в стехиометрическом количестве для частичной нейтрализации отрицательных зарядов (м)РНК с последующим смешением с раствором олигомера, полимера или липидоид, предлагаемого в настоящем изобретении. В случае содержащих (м)РНК комплексов, предназначенных для магнитофекции, было установлено, что индуцированная солью коллоидная агрегация является приемлемым путем получения композиций, которые содержат (м)РНК, поликатион или катионный липид и магнитные частицы (EP 1297169). В конкретном случае, когда компонент, представляющий собой (м)РНК, является катионным олигонуклеотидом, то можно применять полианион для самосборки олигомера, полимера или липидоид, предлагаемого в настоящем изобретении, с (м)РНК. В этом случае олигомер, полимер или липидоид, предлагаемый в настоящем изобретении, смешивают с катионным олигонуклеотидом, после чего смешивают с полианионом. Специалисту в данной области хорошо известны многочисленные варианты препаративных форм, которые можно применять для получения композиции, предлагаемой в настоящем изобретении. Концентрации индивидуальных компонентов выбирают в зависимости от предполагаемого применения композиции, предлагаемой в настоящем изобретении. Соответствующими параметрами являются конечная концентрация компонента, представляющего собой (м)РНК, и соотношение описанных выше компонентов. Для введения (мРНК) в клеточную культуру, как правило, предпочтительными являются конечные концентрации (м)РНК, составляющие от 1 до 100 мкг/мл. Для введения *in vivo* применяемые конечные концентрации (м)РНК могут составлять вплоть до 5 мг/мл.

Композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, можно хранить в водной суспензии или в сухом виде. Так, в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, хранят в высушенной форме, необязательно высушенной вымораживанием (лиофилизированной) форме. В более предпочтительном варианте осуществления изобретения высушенный или лиофилизированный комплекс или композиция содержит также лиопротектор. Лиопротекторы представляют собой молекулы, которые защищают высушенный вымораживанием (сухой) материал. Такие молекулы, как правило, представляют собой полигидроксильные соединения, такие как сахара (моно-, ди- и полисахариды), многоатомные спирты и их производные. Трегалоза и сахароза представляют собой известные встречающиеся в естественных условиях защитные агенты для процессов сушки. Трегалоза вырабатывается различными растениями, грибами и беспозвоночными животными, которые сохраняются в состоянии приостановки жизнедеятельности в периоды засухи (которые называют также ангидробиозом). Согласно настоящему изобретению наиболее приемлемыми криопротекторами являются сахара, такие как трегалоза, лактоза, раффиноза, сахароза, манноза, сорбит, маннит, ксилит, полиэтиленгликоль, декстрины, мочевины, мальтодекстрины, фруктаны, мальтоолигосахариды, манноолигосахариды, циклоинулогексаоза, гидроксизилкрахмал, декстраны, инулин, поливинилпирролидон или аминокислоты, такие как триптофан, глицин и фенилаланин. В этом контексте наиболее предпочтительной является трегалоза.

Фармацевтические аспекты.

Следующим объектом настоящего изобретения является применение композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, или олигомера, полимера или липидоида, предлагаемого в настоящем изобретении, для введения одноцепочечной РНК, предпочтительно мРНК, в ткань- или клетку-мишень. Понятие "введение одноцепочечной РНК, предпочтительно мРНК, в клетку" предпочтительно означает перенос одноцепочечной РНК, предпочтительно мРНК, в клетку. Указанное применение можно осуществлять *in vivo* или *in vitro*.

Настоящее изобретение относится также к способу введения одноцепочечной РНК, предпочтительно мРНК, в клетку- или ткань-мишень, заключающемуся в том, что осуществляют стадию, на которой приводят композицию, предлагаемую в изобретении, в контакт с клеткой- или тканью-мишенью. Указанный способ можно осуществлять *in vitro* или *in vivo*. Приведение в контакт можно осуществлять путями и методами, известными специалистам в данной области. Например, если способ осуществляют *in vitro*, то для приведения в контакт можно культивировать клетки в присутствии композиции в культуральной среде или путем добавления композиции к клеткам. Если способ осуществляют *in vivo*, то для приведения в контакт с клетками или тканями можно, например, вводить композицию индивидууму путями введения, которые известны специалисту в данной области, прежде всего любым из путей введения, которые, как правило, применяют в области генной терапии. Возможные пути приготовления препаративных форм композиции и введения ее индивидууму дополнительно описаны также ниже.

Понятие "*in vivo*" относится к любому применению, которое воздействует на живой организм, где организм предпочтительно представляет собой многоклеточный организм, более предпочтительно млекопитающее и наиболее предпочтительно человека. Понятие "*in vitro*" относится к любому применению, которое воздействует на части живого организма, выделенные и находящиеся вне указанного организма, например клетки, ткани и органы, где организм предпочтительно представляет собой многоклеточный организм, более предпочтительно млекопитающее и наиболее предпочтительно человека.

Настоящее изобретение относится также к фармацевтической композиции, содержащей композицию или олигомер, полимер или липидоид, предлагаемую/предлагаемый в изобретении, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель и/или разбавитель. Понятие "фармацевтическая композиция" относится к фармацевтически приемлемой форме композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, которую можно вводить индивидууму.

Понятие "фармацевтически приемлемая форма" означает, что композиция приготовлена в виде фармацевтической композиции, при этом фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель и/или разбавитель. Примеры приемлемых фармацевтических носителей хорошо известны в данной области и включают забуференные фосфатом физиологические растворы, воду, эмульсии, такие как эмульсии типа масло/вода, различные типы смачивающих агентов, стерильные растворы и т.д. Композиции, содержащие указанные носители, можно готовить хорошо известными общепринятыми методами. Указанные фармацевтические композиции можно вводить индивидууму в приемлемой дозе. Режим дозирования должен определять лечащий врач, и он зависит от клинических факторов. Как хорошо известно в области медицины, дозы для любого индивидуума зависят от многих факторов, включая размер индивидуума, площадь поверхности тела, возраст, конкретное вводимое соединение, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие лекарственные средства, которые применяют одновременно. Типичная доза действующих веществ может, например, находиться в диапазоне от 1 нг до нескольких граммов. Применяемая в случае использования (м)РНК терапия, доза (м)РНК для экспрессии или для ингибирования экспрессии должна соответствовать указанному диапазону; однако возможно применение доз, более низких или более высоких, чем указанные в приведенном в качестве примера диапазоне, прежде всего с учетом вышеизложенных факторов. Как пра-

вило, режим для регулярного введения фармацевтической композиции должен находиться в диапазоне от 0,1 мкг до 10 мг единиц на 1 кг веса тела в день. Если режим представляет собой непрерывную инфузию, то он должен также находиться в диапазоне от 1 мкг до 10 мг единиц на 1 кг веса тела соответственно. Мониторинг прогресса можно осуществлять путем периодической оценки. Дозы могут варьироваться, но предпочтительная доза для внутривенного введения (м)РНК в качестве компонентов композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, составляет от примерно 10 до 10 копий молекулы (м)РНК.

Понятие "введение" относится к любому методу, пригодному для интродукции композиции в организм индивидуума. Введение приемлемых композиций можно осуществлять различными путями, например путем внутривенного, внутриаортального, внутрибрюшинного, подкожного, чрескожного, внутритрахеального, внутримышечного введения, местного применения, внутрикожного, внутриносового, легочного введения, введения путем ингаляции или путем интробронхиального, или орального, или ректального введения. Композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, можно, в частности, вводить в виде активируемого геном матрикса согласно методу, описанному у Shea с соавт. (Shea и др., Nat. Biotechnol., 17, 1999, сс. 551-554) в EP 1198489.

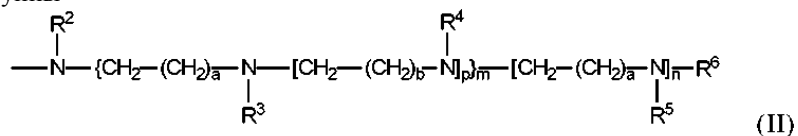
В принципе, фармацевтические композиции, предлагаемые в изобретении, можно применять местно или системно. Введение предпочтительно должно быть парентеральным, например внутривенным, хотя под объем изобретения подпадают другие пути введения. Приемлемым также является введение непосредственно в область-мишень, например, с помощью катетера в область в кровеносном сосуде. Введение можно, например, осуществлять также путем прямой инъекции в область-мишень, такую как опухоль. Под объем изобретения подпадает также введение путем аэрозолизации или распыления или оральное введение. Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, фторуглероды, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая соляной раствор и забуференные среды. Наполнители для парентерального введения включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактированный раствор Рингера или нелетучие масла. Наполнители для внутривенного введения включают наполнители жидкости и питательных веществ, наполнители электролитов (такие как основанные на декстрозе Рингера) и т.п. Могут присутствовать также консерванты и другие добавки, такие, например, как противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие агенты и инертные газы и т.п. Кроме того, фармацевтическая композиция может содержать также другие агенты, такие как интерлейкины или интерфероны, в зависимости от предполагаемого применения фармацевтической композиции.

Путем введения фармацевтической композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, заболевания можно лечить или предупреждать. Понятие "заболевание" относится к любому возможному патологическому состоянию, которое можно лечить, предупреждать или вакцинировать путем применения варианта осуществления настоящего изобретения. В предпочтительном варианте указанное заболевание может быть врожденным, приобретенным, инфекционным или неинфекционным, связанным с возрастом, сердечно-сосудистым, метаболическим, кишечным, неопластическим (в частности, рак) или генетическим. Основой заболевания могут быть, например, нарушение регуляции физиологических процессов, молекулярных процессов, биохимических реакций внутри организма, основой которых, в свою очередь, могут являться, например, генетический аппарат организма, поведенческие, социальные или связанные с окружающей средой факторы, такие как воздействие химических веществ или радиации. В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, применяют для вариантов лечения, которые описаны в патентной публикации WO 2010EP04681.

Для дополнительной иллюстрации предпочтительные объекты изобретения обобщены в приведенных ниже пунктах, которые образуют раздел приведенного выше подробного описания, а также предпочтительных вариантов осуществления изобретения.

1. Композиция для введения РНК в клетку, указанная композиция содержит одноцепочечную РНК и компонент, содержащий олиго(алкиленамин), где компонент выбран из

а) олигомера или полимера, содержащего множество групп формулы (II) в качестве боковой цепи и/или концевой группы



где переменные a, b, p, m, n и R²-R⁶ имеют указанные ниже значения независимо в каждой группе формулы (II) во множестве указанных групп:

a обозначает 1 и b обозначает целое число от 2 до 4; или a обозначает целое число от 2 до 4 и b обозначает 1,

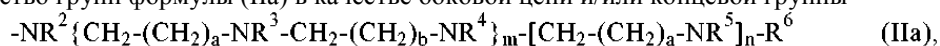
р обозначает 1 или 2,
 m обозначает 1 или 2;
 n обозначает 0 или 1 и
 $m+n \geq 2$;

R^2-R^5 , каждый независимо друг от друга, выбран из водорода; группы $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-R^7$, $-\text{CH}(R^7)-\text{CH}_2-\text{OH}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-R^7$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-R^7$ или $-\text{CH}_2-R^7$, где R^7 выбран из C_3-C_{18} -алкила или C_3-C_{18} -алкенила, имеющего одну двойную связь $\text{C}-\text{C}$;

R^6 выбран из водорода; группы $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-R^7$, $-\text{CH}(R^7)-\text{CH}_2-\text{OH}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-R^7$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-R^7$ или $-\text{CH}_2-R^7$, где R^7 выбран из C_3-C_{18} -алкила или C_3-C_{18} -алкенила, имеющего одну двойную связь $\text{C}-\text{C}$; и $-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2$;

где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (II), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионной группы формулы (II) и где полимерный или олигомерный каркас полимера или олигомера содержит множество групп формулы (II), в качестве боковой цепи и/или концевой группы, обеспечены полимерным или олигомерным каркасом, выбранным из поли(аминокислот), содержащих множество звеньев глутаминовой или аспарагиновой кислоты, полиакриловой кислоты, полиметакриловой кислоты, сополимера этилакрилата и акриловой кислоты и сополимера метилметакрилата и метакриловой кислоты.

2. Композиция по п.1, содержащая одноцепочечную РНК и компонент, который содержит олиго(алкиленамин), выбранный из компонента, представляющего собой олигомер или полимер, содержащий множество групп формулы (IIa) в качестве боковой цепи и/или концевой группы



где a, b, m, n и R^2-R^6 имеют значения, указанные в п.1, и где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (IIa), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионной олигомерной или полимерной структуры.

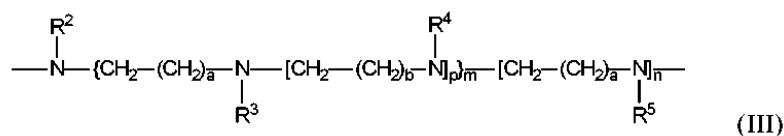
3. Композиция по п.1 или 2, в которой в формуле (II) или (IIa) n обозначает 1.

4. Композиция по одному из пп.1-3, в которой в формуле (II) или (IIa) m обозначает 1 и n обозначает 1.

5. Композиция по одному из пп.1-4, в которой в формуле (II) или (IIa) a обозначает 1 и b обозначает 2 или a обозначает 2 и b обозначает 1.

6. Композиция для введения РНК в клетку, указанная композиция содержит одноцепочечную РНК и компонент, содержащий олиго(алкиленамин), где компонент выбран из

б) олигомера или полимера, содержащего множество групп формулы (III) в виде повторяющихся звеньев



где переменные a, b, p, m, n и R^2-R^5 независимо друг от друга имеют указанные ниже значения для каждой группы формулы (III) во множестве указанных групп:

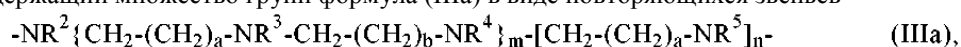
a обозначает 1 и b обозначает целое число от 2 до 4; или a обозначает целое число от 2 до 4 и b обозначает 1,

р обозначает 1 или 2,
 m обозначает 1 или 2;
 n обозначает 0 или 1 и
 $m+n \geq 2$;

R^2-R^5 , каждый независимо друг от друга, выбран из водорода; группы $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-R^7$, $-\text{CH}(R^7)-\text{CH}_2-\text{OH}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-R^7$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-R^7$ или $-\text{CH}_2-R^7$, где R^7 выбран из C_3-C_{18} -алкила или C_3-C_{18} -алкенила, имеющего одну двойную связь $\text{C}-\text{C}$; и $-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2$;

и где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (III), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионной группы формулы (III).

7. Композиция по п.6, содержащая одноцепочечную РНК и компонент, который содержит олиго(алкиленамин), выбранный из компонента б), где компонент б) представляет собой олигомер или полимер, содержащий множество групп формула (IIIa) в виде повторяющихся звеньев



где a, b, m, n и R^2-R^5 имеют значения, указанные в п.1, и где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (IIIa), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионной олигомерной или полимерной структуры.

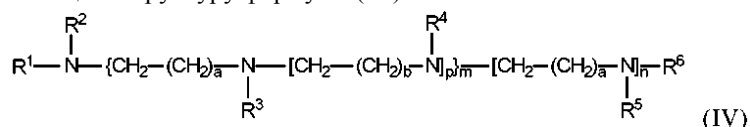
8. Композиция по п.6 или 7, в которой в формуле (III) или (IIIa) n обозначает 1.

9. Композиция по одному из пп.6-8, в которой в формуле (III) или (IIIa) m обозначает 1 и n обозначает 1.

10. Композиция по одному из пп.6-9, в которой в формуле (III) или (IIIa) а обозначает 1 и b обозначает 2 или а обозначает 2 и b обозначает 1.

11. Композиция для введения РНК в клетку, указанная композиция содержит одноцепочечную РНК и компонент, содержащий олиго(алкиленамин), где компонент выбран из

в) липидоида, имеющего структуру формулы (IV)



в которой переменные a, b, p, m, n и R¹-R⁶ имеют указанные ниже значения:

а обозначает 1 и b обозначает целое число от 2 до 4; или а обозначает целое число от 2 до 4 и b обозначает 1,

р обозначает 1 или 2,

m обозначает 1 или 2;

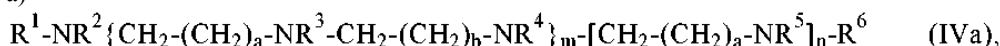
n обозначает 0 или 1 и

m+n ≥ 2;

R¹-R⁶, каждый независимо друг от друга, выбран из водорода; группы -CH₂-CH(OH)-R⁷, -CH(R⁷)-CH₂-OH, -CH₂-CH₂-(C=O)-O-R⁷, -CH₂-CH₂-(C=O)-NH-R⁷ или -CH₂-R⁷, где R⁷ выбран из C₃-C₁₈-алкила или C₃-C₁₈-алкенила, имеющего одну двойную связь C-C; и -C(NH)-NH₂; при условии, что по меньшей мере два остатка из R¹-R⁶ обозначают группу -CH₂-CH(OH)-R⁷, -CH(R⁷)-CH₂-OH, -CH₂-CH₂-(C=O)-O-R⁷, -CH₂-CH₂-(C=O)-NH-R⁷ или -CH₂-R⁷, где R⁷ выбран из C₃-C₁₈-алкила или C₃-C₁₈-алкенила, имеющего одну двойную связь C-C;

и где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (IV), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионного липидоида формулы (IV).

12. Композиция по п.11, содержащая одноцепочечную РНК и липидоид, имеющий структуру формулы (IVa)



где a, b, m, n и R¹-R⁶ имеют значения, указанные в п.1, и где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (IVa), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионного липидоида.

13. Композиция по п.11 или 12, в которой в формуле (IV) или (IVa) n обозначает 1.

14. Композиция по одному из пп.11-13, в которой в формуле (IV) или (IVa) m обозначает 1 и n обозначает 1.

15. Композиция по одному из пп.11-14, в которой в формуле (IV) или (IVa) а обозначает 1 и b обозначает 2 или а обозначает 2 и b обозначает 1.

16. Композиция по одному из пп.11-15, в которой липидоид представляет собой катионный липидоид и в которой катионный липидоид образует комплекс с одноцепочечной РНК.

17. Композиция, содержащая мРНК и олигомер или полимер по одному из пп.1-10.

18. Композиция по п.17, в которой олигомер или полимер представляет собой катионный олигомер или полимер.

19. Композиция по п.17, содержащая комплекс мРНК и катионного олигомера или полимера.

20. Композиция, содержащая мРНК и липидоид по одному из пп.11-16.

21. Композиция по п.20, в которой липидоид представляет собой катионный липидоид.

22. Композиция по п.21, содержащая комплекс мРНК и катионного липидоида.

23. Композиция по одному из пп.17-22, находящаяся в лиофилизированной форме.

24. Композиция по п.23, которая дополнительно содержит лиопротектор.

25. Композиция по п.24, в которой лиопротектор представляет собой трегалозу.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию по одному из пп.17-25.

27. Применение композиции по одному из пп.17-25 для введения мРНК в клетку.

28. Способ введения мРНК в клетку- или ткань-мишень, заключающийся в том, что осуществляют стадию, на которой приводят в контакт композицию по одному из пп.17-25 с клеткой- или тканью-мишенью.

Описание чертежей

На чертежах показано

на фиг. 1 - влияние типа олиго(алкиленаминной) модификации боковой цепи поли(акриловой кислоты) на эффективность трансфекции мРНК различных типов клеток. Полиплексы получали, используя поли(акриловую кислоту) (ММ: 8000 Да) с модификациями боковой цепи (2-3-2) и (3-2-3) или контрольные группы (3-3-3), (2-2-2), (2-2) или (3-4-3) и мРНК, кодирующую люциферазу светляка, при соотношениях N/P от 4 до 44, и применяли для трансфекции клеток указанных типов. Через 24 ч клетки, трансфected РНК в различных количествах (500, 250, 125 или 62,5 нг), лизировали и анализировали люциферазную активность;

на фиг. 2 - анализ миграции в геле, проведенный для определения способности модифицированной (2-3-2) и (3-2-3) PAA8k (поли(акриловая кислота)) образовывать комплекс. Полиплексы получали согласно описанному выше с указанными соотношениями N/P. Взаимодействие полимера и мРНК анализировали по миграции в агарозном геле. Чем выше взаимодействие, тем меньшее количество полимера необходимо для полного сдерживания миграции мРНК;

на фиг. 3 - анализ с использованием RiboGreen, проведенный для определения способности модифицированной (2-3-2) и (3-2-3) PAA8k образовывать комплекс. Полиплексы получали согласно описанному выше с указанными соотношениями N/P. Взаимодействие полимера и мРНК анализировали, добавляя RiboGreen. Указанная молекула взаимодействует с нуклеиновыми кислотами, что приводит к увеличенному флуоресцентному сигналу при высоких количествах мРНК. Чем сильнее взаимодействие нуклеиновой кислоты с полимером, тем ниже обнаруживаемый флуоресцентный сигнал. Сигналы представлены в виде относительной флуоресценции по сравнению с контролем, содержащим такое же количество свободной мРНК;

на фиг. 4 - трансфектирующая эффективность различных модифицированных N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамином (2-3-2) полимеров. Полиплексы получали, используя указанные модифицированные N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамином полимеры (PAA8k: поли(акриловая кислота), ММ 8000 Да; Glu9.8k: поли(глутаминовая кислота), ММ 9800 Да; PMA9.5k: поли(метакрилат), ММ 9500 Да; Glu64k: поли(глутаминовая кислота), ММ 64000 Да; GluLys: сополимер поли(глутаминовой кислоты)-поли(лизина)) (2000-50000 Да), и мРНК, кодирующую люциферазу светляка, при соотношениях N/P от 4 до 20. Через 24 ч клетки, трансфектированные РНК в различных количествах (500, 250, 125 или 62,5 нг), лизировали и анализировали люциферазную активность;

на фиг. 5 - трансфектирующая эффективность модифицированной N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамином (2-3-2) поли(акриловой кислоты) с различными молекулярными массами. Полиплексы получали с использованием имеющей указанные молекулярным массы поли(акриловой кислоты), модифицированной N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамином (2-3-2), и мРНК, кодирующей люциферазу светляка, при соотношениях N/P от 4 до 20. Через 24 ч клетки, трансфектированные РНК в различных количествах (500, 250, 125 или 62,5 нг), лизировали и анализировали люциферазную активность;

на фиг. 6 - цитотоксичность полимерных препаративных форм, содержащих мРНК. Комплексы, содержащие поли(акриловую кислоту) (ММ 8000 Да, 20000 Да и 70000 Да), модифицированную различными указанными олиго(алкиленаминами), и мРНК, кодирующую люциферазу светляка, при соотношениях N/P от 4 и 44 и включающие мРНК в различных количествах, использовали для трансфекции. Через 24 ч определяли жизнеспособность клеток согласно описанному методу. Данные представлены в виде % выживаемости по сравнению с нетрансфектированными клетками;

на фиг. 7 - уровни экспрессии репортерного белка в легких мышей. Полиплексы, состоящие из PAA20k-(2-3-2) и мРНК, кодирующей люциферазу светляка, смешивали при указанных соотношениях N/P и обрабатывали мышей с помощью аэрозоля;

на фиг. 8 - физико-химические свойства модифицированной N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамином (2-3-2) поли(акриловой кислоты). Полиплексы получали в условиях *in vivo* при соотношении N/P, равном 10. Применяемый полимер: поли(акриловая кислота), ММ 20000 Да;

на фиг. 9 - полученное с помощью просвечивающего электронного микроскопа изображение PAA20k-(2-3-2) и мРНК. Полиплексы смешивали при N/P, равном 10, и анализировали с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Масштаб, обозначенный прямоугольником: 100 нм. Применяемый полимер: поли(акриловая кислота), ММ 20000 Да;

на фиг. 10 - экспрессия люциферазы светляка в ткани легких свиней после аэрозольного внесения препаративных форм полиплексов. На левых изображениях: bgPEI, N/P 10. На правых изображениях: PAA20k-(2-3-2), N/P 10. Применяемый полимер: поли(акриловая кислота), ММ 20000 Да;

на фиг. 11 - воздействие трегалозы на способность к лиофилизации содержащих PAA20k-(2-3-2) комплексов. Комплексы получали согласно описанному выше и лиофилизировали в присутствии 1% трегалозы. Как продемонстрировано, трегалоза обладала способностью сохранять эффективность этих комплексов в отношении трансфекции мРНК после лиофилизации и регидратации;

на фиг. 12 - влияние модифицированных (2-3-2) и (3-2-3) полимеров на эффективность трансфекции ДНК. Полиплексы получали с использованием поли(акриловой кислоты) (ММ: 8000 Да) с указанными модификациями боковой цепи и пДНК (плазмидная ДНК), кодирующей люциферазу светляка (pCMVLuc), при соотношениях N/P от 4 до 20. Через 24 ч клетки, трансфектированные ДНК в различных количествах (500, 250, 125 или 62,5 нг), лизировали и анализировали люциферазную активность. В контроле в качестве трансфектирующего реагента применяли разветвленный PEI (bgPEI), 25 кДа;

на фиг. 13 - РНКi, индуцированная молчанием генов, полученная с использованием комплексов GL3-Luc-siРНК и N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамином (2-3-2) модифицированной поли(акриловой кислоты). Клетки HeLa, стабильно экспрессирующие люциферазу светляка, трансфектировали с использованием комплексов, которые содержали siРНК против siРНК люциферазы светляка (si-Luc) или контрольную siРНК (siGFP) и PAA20k-(2-3-2), при указанных соотношениях N/P и включающих siРНК в различных количествах. Экспрессию люциферазы анализировали через 24 ч и выражали в

виде относительных уровней экспрессии по сравнению с необработанными клетками;

на фиг. 14 - люциферазная активность после трансфекции NIH3T3-клеток различными комплексами липидоид/мРНК. Получали комплексы, содержащие мРНК и липидоиды на основе (2-3-2) или контрольных олиго(алкиленаминов) (2-2-2) и (3-3-3) при мас./мас. соотношении (масса липидоида/масса мРНК), составляющем 16;

на фиг. 15 - влияние олиго(алкиленаминной) модификации боковой цепи поли(акриловой кислоты) на эффективность в отношении трансфекции ДНК. Полиплексы получали, используя поли(акриловую кислоту) (ММ: 8000 Да) с указанными модификациями боковой цепи и пДНК, кодирующую люциферазу светляка (pCMVLuc), при указанных соотношениях N/P. Через 24 ч клетки, трансфектированные ДНК в различных количествах (500, 250, 125 или 62,5 нг), лизировали и анализировали люциферазную активность. В отличие от трансфекции мРНК (см. фиг. 1), олиго(алкиленаминная) модификация боковой цепи не оказывала существенного влияния на эффективность трансфекции;

на фиг. 16 - экспрессия люциферазы светляка в печени и селезенке мышей после внутривенной инъекции препаративных форм липидоидов. Слева: мРНК, кодирующая люциферазу светляка, включенная в форму с липидоидом C12-(2-3-2) (C12-(2-3-2):DOPE:холестерин:DSPE-PEG2k; массовое соотношение 3,6:0,18:0,76:1) в ЗФР для инъекций; справа: мРНК, кодирующая люциферазу светляка, включенная в форму с липидоидом C12-(2-3-2) (C12-(2-3-2):DOPE:холестерин:DSPE-PEG2k; массовое соотношение 3,6:0,18:0,76:1) в воде для инъекций. Только препаративные формы в ЗФР приводили к экспрессии в печени и селезенке (ЗФР: $1,6404 \times 10^5$ фотонов/с; вода: не поддается выявлению);

на фиг. 17 - экспрессия люциферазы светляка в печени и селезенке мышей после внутривенной инъекции препаративных форм липидоидов. А. Биолюминисцентное изображение *in vivo*: слева: мРНК, кодирующая люциферазу светляка, включенная в форму с липидоидом C14-(2-3-2) (C14-(2-3-2):DOPE:холестерин:DSPE-PEG2k; 8:6:5:1) в ЗФР для инъекций; в середине: мРНК, кодирующая люциферазу светляка, включенная в форму с липидоидом C16-(2-3-2) (C16-(2-3-2):DOPE:холестерин:DSPE-PEG2k; 8:6:5:1) в ЗФР для инъекций; справа: мРНК, кодирующая люциферазу светляка, включенная в форму с липидоидом C12-(2-3-2) (C12-(2-3-2):DOPE:холестерин:DSPE-PEG2k; 8:6:5:1) в ЗФР для инъекций. Б. Количественная оценка *in vivo* биолюминисцентного сигнала. Уровни экспрессии снижались с увеличением длины алкильной цепи с C12 до C16;

на фиг. 18 - экспрессия люциферазы светляка в печени и селезенке мышей после внутривенной инъекции препаративных форм липидоидов. Из мышей, сведения об обработке которых представлены на фиг. 17, изымали печень, селезенку, почку, желудок, сердце, легкие и головной мозг и визуализировали в отношении экспрессии люциферазы. А. Биолюминисцентное изображение: слева: мРНК, кодирующая люциферазу светляка, включенная в форму с липидоидом C12-(2-3-2) (C12-(2-3-2):DOPE:холестерин:DSPE-PEG2k; 8:6:5:1) в ЗФР для инъекций; в середине: мРНК, кодирующая люциферазу светляка, включенная в форму с липидоидом C14-(2-3-2) (C14-(2-3-2):DOPE:холестерин:DSPE-PEG2k; 8:6:5:1) в ЗФР для инъекций; справа: мРНК, кодирующая люциферазу светляка, включенная в форму с липидоидом C16-(2-3-3) (C16-(2-3-2):DOPE:холестерин:DSPE-PEG2k; 8:6:5:1) в ЗФР для инъекций. Уровни экспрессии люциферазы в печени снижались с увеличением длины алкановой цепи липидоидов (C16 < C14 < C12) и оказались наиболее трудными для C16. Экспрессия люциферазы в селезенке оказалась наиболее высокой для C14. Некоторый уровень экспрессии люциферазы обнаружен в легких, но не обнаружен в сердце, почке, желудке или головном мозге. Б. Количественная оценка биолюминисцентного сигнала, указанного в А;

на фиг. 19 - сравнение эффективности различных трансфектирующих реагентов в отношении их способности обеспечивать введение пДНК и мРНК. Полиплексы получали с использованием указанных трансфектирующих реагентов (структуры согласно номенклатуре, соответствующей описанной в заявке на патент WO 2011/154331: № 46 C-Stp3-C-K-OleA2; № 454: C-Y3-Stp2-K(K-OleA2)-Stp2-Y3-C; № 512: C-Sph3-K(Sph3-C)2). В качестве нуклеиновой кислоты, представляющей собой "полезный груз", применяли либо мРНК, либо пДНК (pCMVLuc), кодирующую люциферазу светляка, при указанных соотношениях N/P. Через 24 ч NIH3T3-клетки, трансфектированные мРНК в различных количествах (500, 250, 125 или 63 нг), лизировали и анализировали люциферазную активность;

на фиг. 20 - сравнение трансфектирующей эффективности PAA8k, модифицированной N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамином (2-3-2) или N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-бутандиамином (2-4-2). Полиплексы получали с использованием PAA8k, модифицированной либо N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамином (2-3-2), либо N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-бутандиамином (2-4-2), и мРНК, кодирующей люциферазу светляка, при указанных соотношениях N/P. Через 24 ч NIH3T3-клетки, трансфектированные мРНК в различных количествах (500, 250, 125 или 63 нг), лизировали и анализировали люциферазную активность;

на фиг. 21 - изображения липоплексов, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Комплексы липидоид/мРНК получали согласно описанному выше методу и анализировали с помощью просвечивающего электронного микроскопа. Верхний ряд: C10-(2-3-2)/DOPE/Chol/DPG-PEG, нижний ряд: C10-(2-3-2)/DPPC/Chol/DPG-PEG; левые изображения - общий вид, масштаб 100 нм; правые изображения: детализированный увеличенный масштаб 20 нм;

на фиг. 22 - трансфектирующая эффективность C10-(2-3-2), синтезированного из 1-бромдекана. C10-(2-3-2) синтезировали согласно примеру получения VII, используя 1-бромдекан. Трансфектирующую эффективность оценивали на NIH3T3-клетках, используя дозы 500, 250 и 125 нг на лунку;

на фиг. 23 - трансфектирующая эффективность C12-(2-3-2), синтезированного из N-додецилакриламида. C12(2-3-2) синтезировали согласно примеру получения VIII, используя N-додецилакриламид. Трансфектирующую эффективность оценивали на NIH3T3-клетках, используя дозы 500, 250 и 125 нг на лунку;

на фиг. 24 - трансфектирующая эффективность C12-(2-3-2), синтезированного из додецилаакрилата. C12-(2-3-2) синтезировали согласно примеру получения IX, используя додецилаакрилат. Трансфектирующую эффективность оценивали на NIH3T3-клетках, используя дозы 500, 250 и 125 нг на лунку;

на фиг. 25 - трансфектирующая эффективность липидоидной препаративной формы на основе C12-(2-3-2). Липидоидные препаративные формы создавали, используя C12-(2-3-2) и DMG-PEG2k в комбинации с DOPE или DSPC и с мРНК, кодирующей люциферазу светляка, при соотношениях N/P 17 или 8;

на фиг. 26 - сравнение трансфектирующей эффективности *in vivo* C12, модифицированного олиго(алкиламином) (2-3-2), (3-3-3) и (2-2-2);

на фиг. 27 - сравнение трансфектирующей эффективности версии C12-(2-3-2) с измененными насыщением и положением C12-алкильной цепи. А: химическая структура различных версий C12-(2-3-2); Б: уровень экспрессии репортерного белка (люцифераза светляка) после трансфекции NIH3T3-клеток препаративными формами, содержащими различные липиды;

на фиг. 28 - стабильность липоплексов при лиофилизации. Липидоидные препаративные формы получали согласно описанному выше методу, подвергали диализу в противотоке воды и смешивали с различными концентрациями липопротекторов (трегалоза (А, Г), сахароза (Б, Д) и лактоза (В, Е)). После замораживания лиофилизации и ресуспандирования оценивали трансфектирующую эффективность на NIH3T3-клетках (А-В), измеряли гидродинамический диаметр (Г-Е) и сравнивали со свежеприготовленными липоплексами в таких же условиях;

на фиг. 29 - экспрессия мРНК в образцах *ex vivo* после трансфекции содержащими C12-(2-3-2) липидоидными препаративными формами. А: мышцы свиней, все образцы обработанные; Б: жировая ткань свиней, все образцы обработанные; В: артерия овец; Г: мышца овец, верхний образец: обработанный, нижний образец: необработанный; Д: легкое овец, верхний образец: обработанный, нижний образец: необработанный;

на фиг. 30 - анализ методом Вестерн-блоттинга клеточных лизатов на белке ACE-2. Левые полосы: лизат клеток, обработанных мРНК, кодирующей ACE-2; правые полосы: лизат клеток, обработанных липидоидными препаративными формами без мРНК (пустые). Верхний ряд: окрашивание ACE-2; нижний ряд GAPDH, контроль загрузки;

на фиг. 31 - экспрессия мышинового эритропоэтина в мышцах. Образцы крови анализировали в отношении mEPO через 6 ч после внутривенного введения препаративной формы C12-(2-3-2), содержащей мРНК mEPO. Анализировали три различные дозы РНК (20, 10 или 5 мкг) и контрольную группу (ЗФР);

на фиг. 32 - сравнение трансфектирующей эффективности модифицированного различным образом поли(аллиламина) (PALAM). NIH3T3-клетки трансфектировали с использованием полиплексов, содержащих мРНК, которая кодирует люциферазу, входящую в комплекс с PALAM-(2-3-2), PALAM-(2-2-2) или PALAM-(3-3-3);

на фиг. 33 - сравнение трансфектирующей эффективности по-разному модифицированных полипропилениминов (PPI). NIH3T3-клетки трансфектировали с использованием полиплексов, содержащих мРНК, которая кодирует люциферазу, входящую в комплекс с PPI-(2-3-2), PPI-(2-2-2) или PPI-(3-3-3);

на фиг. 34 - экспрессия люциферазы после подкожной инъекции препаративной формы C12-(2-3-2). Применяли C12-(2-3-2)/DOPE/холестерин/DMG-PEG2k, содержащий мРНК, которая кодирует люциферазу светляка.

Приведенные ниже примеры служат для иллюстрации изобретения.

Пример получения I. Синтез модифицированной N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамином поли(акриловой кислоты), MM 8000 Да, PAA8k-(2-3-2).

10 мг натриевой соли поли(акриловой кислоты) (MM: 8000 Да, фирма Sigma Aldrich) разводили в 2 мл реакционного буфера, содержащего 50 mM MES, pH 6,0. 1,69 г N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина (100 экв./карбокигруппу, фирма Sigma Aldrich) разводили в 2 мл такого же буфера. Поскольку олиго(алкиленамин) покупали в виде свободного основания, pH повторно доводили до pH 6,0, добавляя по каплям 32% HCl. Поли(акриловую кислоту) и раствор олиго(алкиленамина) смешивали. Для инициации реакции добавляли 10-кратный молярный избыток 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC, фирма Sigma Aldrich, разведенного в 2 мл реакционного буфера) относительно карбоксильной группы. Конечный объем доводили до 10 мл. Смесь инкубировали в течение 3 ч при КТ на переворотном шейкере. Продукт очищали диализом. Для этой цели реакционную смесь помещали в кассету для диализа Slide-a-lyzer™ (3-12 мл, MWCO: 3500 Да, фирма Thermo Fisher) и осуществляли диализ в противотоке воды в течение 72 ч. Обмен воды осуществляли дважды в день. После диализа очищенный полимер лиофилизировали.

В таких же условиях синтезировали и тестировали полимеры, представленные ниже в табл. 1.

Таблица 1

Перечень синтезированных модифицированных олиго(алкиленамином) полимеров

Полимерный каркас		Олиго(алкиленамином)		Полученный полимер	Пример
Название	Производитель/номер продукта	Название	Производитель/номер продукта		
натриевая соль поли(акриловой кислоты), 8000 кДа	Sigma Aldrich, 416029	N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина	Sigma Aldrich, 333131	PAA8k-(2-3-2)	1, 2, 3, 4, 8, 9
натриевая соль поли(акриловой кислоты), 8000 кДа	Sigma Aldrich, 416030	1,2-бис(3-аминопропиламино)этан	Sigma Aldrich, 23939-9	PAA8k-(3-2-3)	1, 2, 4, 8
натриевая соль поли(акриловой кислоты), 8000 кДа	Sigma Aldrich, 416031	N,N'-бис(2-аминопропил)-1,3-пропандиамина	Sigma Aldrich, 404810	PAA8k-(3-3-3)	1, 4
натриевая соль поли(акриловой кислоты), 8000 кДа	Sigma Aldrich, 416032	триэтилтетрамин	Sigma Aldrich, 132098	PAA8k-(2-2-2)	1, 4
натриевая соль поли(акриловой кислоты), 8000 кДа	Sigma Aldrich, 416034	диэтилентриамин	Sigma Aldrich, D93856	PAA8k-(2-2)	1
натриевая соль поли(акриловой кислоты), 8000 кДа	Sigma Aldrich, 416035	спермин	Sigma Aldrich, 85590	PAA8k-(3-4-3)	1, 4
натриевая соль поли(глутаминовой кислоты), 3000-12000 кДа	Sigma Aldrich, P4636	N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина	Sigma Aldrich, 333131	Glu9,8k-(2-3-2)	3
натриевая соль поли(метакриловой кислоты), 9500 кДа	Sigma Aldrich, 434507	N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина	Sigma Aldrich, 333131	PMA9,5k-(2-3-2)	3
натриевая соль поли(глутаминовой кислоты), 50000-100000 кДа	Sigma Aldrich, P4886	N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина	Sigma Aldrich, 333132	Glu64k-(2-3-2)	3
поли(D-Gly, D-Lys), 20000-50000 кДа	Sigma Aldrich, P7658	N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина	Sigma Aldrich, 333133	GluLys-(2-3-2)	3
натриевая соль поли(акриловой кислоты), 1200 кДа	Sigma Aldrich, 416010	N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина	Sigma Aldrich, 333134	PAA12k-(2-3-2)	3
натриевая соль поли(акриловой кислоты), 20000 кДа	Polyscience Inc., 18747	N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина	Sigma Aldrich, 333135	PAA20k-(2-3-2)	3, 4, 5, 6, 7
натриевая соль поли(акриловой кислоты), 35000 кДа	Polyscience Inc., 18748	N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина	Sigma Aldrich, 333136	PAA35k-(2-3-2)	3
натриевая соль поли(акриловой кислоты), 70000 кДа	Polyscience Inc., 18749	N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина	Sigma Aldrich, 333137	PAA70k-(2-3-2)	3, 4
натриевая соль поли(акриловой кислоты), 240000 кДа	Sigma Aldrich, 192058	N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина	Sigma Aldrich, 333138	PAA240k-(2-3-2)	3
натриевая соль поли(акриловой кислоты), 8000 кДа	Sigma Aldrich, 416031	N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-бутандиамина	Santa Labs, ADH 2970	Paa8k-(2-4-2)	14

Пример получения II. Синтез олиго(алкиленаминового) конструктивного блока для создания кистеобразных полимеров с помощью пептидного синтеза на твердой фазе.

I. Синтез три(Вос)-защищенного N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина (EPE(Вос)₃).

5 г N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина (31,2 ммоль) солюбилизировали в 100 мл дихлорметана (ДХМ) и охлаждали до 0°C. 4,43 г этилтрифторацетата (31,2 ммоль, 1 экв./молекулу) разводили в 100 мл ДХМ и добавляли по каплям при перемешивании к раствору в течение 4 ч. После окончания добавления раствор перемешивали при КТ в течение ночи. На следующий день к реакционной смеси добавляли 19,46 мл триэтиламина (14,2 г, 0,1404 моль, 1,5 экв./свободный амин). 30,64 г ди-трет-бутилдикарбонат (0,1404 моль, 1,5 экв./амин) солюбилизировали в 100 мл ДХМ, добавляя по каплям при перемешивании к раствору, и инкубировали при КТ в течение 24 ч при постоянном перемешивании. После завершения реакции органическую фазу концентрировали примерно до 100 мл и промывали 3 раза 5% NaHCO₃ и 3 раза водой. Органическую фазу сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и растворитель выпаривали. Продукт разводили в 100 мл метанола и 200 мл 3М NaOH (20 экв./молекулу) и перемешивали в течение ночи при КТ. Метанол выпаривали и водный раствор промывали 3 раза ДХМ. Органическую фазу собирали, сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и упаривали. Образовавшуюся молекулу (EPE(Вос)₃) анализировали с помощью ¹H-ЯМР.

II. Синтез Fmoc-глутаминовой кислоты, модифицированной с помощью защищенного с помощью Вос (Вос-илированного) N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина (Fmoc-Glu(EPE(Вос)₃-ОН).

3,5 г N-(9-флуоренилметоксикарбонил)-L-глутаминовой кислоты (Fmoc-Glu-ОН, 9,47 ммоль) смешивали с 100 мл уксусного ангидрида, нагревали до 100°C в масляной бане при температуре дефлегмации и постоянном перемешивании пока раствор не становился прозрачным. Раствор охлаждали на льду и растворители удаляли путем вакуумного выпаривания при 60°C. Продукт солюбилизировали в 100 мл тетрагидрофурана. 5,24 г EPE(Вос)₃ (11,37 ммоль, 1,2 экв./молекулу) разводили в 100 мл тетрагидрофурана, смешивали с 3,3 мл N,N-диизопропилэтиламина (18,94 ммоль, 2 экв./молекулу) и добавляли к содержащему глутаминовую кислоту раствору. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при КТ. После концентрирования раствора выпариванием его разводили в ДХМ и промывали 3 раза тринатрийцитратным буфером (0,1М, pH 5,5). После сушки органической фазы на безводным Na₂SO₄ образец очищали с помощью экспресс-хроматографии на сухой колонке, применяя силикагелевую колонку и ступенчатый градиент гептана/этилацетата (от 50/50 до 0/100) и этилацетата/метанола (от 100/0 до 80/20). Фракции, дающие УФ-сигнал при осуществлении ТСХ на силикагеле, объединяли, растворитель выпаривали и продукт анализировали с помощью ¹H-ЯМР.

Пример получения III. Синтез олиго(алкиленаминового) конструктивного блока для создания линейных и разветвленных полимеров с помощью пептидного синтеза на твердой фазе.

I. Синтез ди(Вос)-защищенного N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина (EPE(Вос)₂).

5 г N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина (31,2 ммоль) солюбилизировали в 100 мл дихлорметана (ДХМ) и охлаждали до 0°C. 8,86 г этилтрифторацетата (62,4 ммоль, 2 экв./молекулу) разводили в 100 мл ДХМ и добавляли по каплям при перемешивании к раствору в течение 4 ч. После завершения добав-

ления раствор перемешивали при КТ в течение ночи. На следующий день к реакционной смеси добавляли 13 мл триэтиламина (9,47 г, 0,0936 моль, 1,5 экв./свободный амин). 20,43 г ди-трет-бутилдикарбоната (0,0936 моль, 1,5 экв./амин) солибилизировали в 100 мл ДХМ, добавляли по каплям при перемешивании к раствору и инкубировали при КТ в течение 24 ч при постоянном перемешивании. После завершения реакции органическую фазу концентрировали до примерно 100 мл и промывали 3 раза 5% NaHCO_3 и 3 раза водой. Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и растворитель выпаривали. Продукт разводили в 100 мл метанола и 200 мл 3М NaOH (20 экв./молекулу) и перемешивали в течение ночи при КТ. Метанол выпаривали и водный раствор промывали 3 раза ДХМ. Органическую фазу собирали, сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и упаривали. Образовавшуюся молекулу $(\text{EPE}(\text{Voc})_2)$ анализировали с помощью ^1H -ЯМР.

II. Синтез сукцинированного, защищенного с помощью *fmos*, Вос-илированного $\text{N,N'$ -бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина (*Fmos-EPE(Voc)*₂-OH).

3,0 г $(\text{EPE}(\text{Voc})_2)$ (8,3 ммоль) повторно растворяли в 50 мл тетрагидрофурана и охлаждали до 0°C. 0,996 г янтарного ангидрида (10 ммоль, 1,2 экв./молекулу) растворяли в 200 мл тетрагидрофурана и добавляли по каплям при перемешивании к раствору. После завершения добавления реакционную смесь перемешивали в течение еще 1 ч при КТ. Добавляли 4,34 мл N,N -диизопропилэтиламина (33,2 ммоль, 4 экв./молекулу). Затем к реакционной смеси добавляли по каплям 4,2 г *Fmos-N*-гидроксисукцимидного сложного эфира (12,45 ммоль, 1,5 экв./молекулу), растворенного в ацетонитриле/тетрагидрофуране. Раствор перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали до примерно 100 мл, смешивали с 100 мл дихлорметана и промывали 5 раз 0,1М натрий-цитратным буфером (pH 5,2). Органическую фазу сушили, концентрировали и образовавшийся продукт очищали с помощью экспресс-хроматографии на сухой колонке, применяя силикагелевую колонку и ступенчатый градиент от *n*-гептана до этилацетата (от 100/0 до 0/100) и дополнительно до этилацетата в метаноле (от 100/0 до 80/20). Фракции, дающие УФ-сигнал при осуществлении ТСХ на силикагеле, объединяли, растворитель выпаривали и продукт анализировали с помощью ^1H -ЯМР.

Пример получения IV. Синтез липидоидов, основой которых является $\text{N,N'$ -бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамин.

100 мг $\text{N,N'$ -бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина (0,623 ммоль) смешивали с 575,07 мг 1,2-эпоксидодекана (3,12 ммоль, (N-1) экв., где N обозначает 2-кратное количество первичного амина плюс 1-кратное количество вторичного амина на олиго(алкиленамин)) и смешивали в течение 96 ч при 80°C при постоянном встряхивании. Образовавшийся в результате реакции липидоид разводили в 25 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 5) до концентрации 100 мкг/мл и применяли для трансфекции.

В таких же условиях синтезировали липидоиды, представленные ниже в табл. 2.

Таблица 2

Список синтезированных липидоидов

Олиго(алкиламин)	Производитель/номер продукта	Липид	Производитель/номер продукта	Полученный липидоид	Пример
$\text{N,N'$ -бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамин	Sigma Aldrich, 333131	1,2-эпоксидодекан	Sigma Aldrich, 260207	C12-(2-3-2)	10, 12
$\text{N,N'$ -бис(2-аминопропил)-1,3-пропандиамин	Sigma Aldrich, 404810	1,2-эпоксидодекан	Sigma Aldrich, 260207	C12-(3-3-3)	10
триэтилентетрамин	Sigma Aldrich, 132098	1,2-эпоксидодекан	Sigma Aldrich, 260207	C12-(2-2-2)	10
$\text{N,N'$ -бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамин	Sigma Aldrich, 333131	1,2-эпокситетрадекан	Sigma Aldrich, 260266	C14-(2-3-2)	10, 12
$\text{N,N'$ -бис(2-аминопропил)-1,3-пропандиамин	Sigma Aldrich, 404810	1,2-эпокситетрадекан	Sigma Aldrich, 260268	C14-(3-3-3)	10
триэтилентетрамин	Sigma Aldrich, 132098	1,2-эпокситетрадекан	Sigma Aldrich, 260269	C14-(2-2-2)	10
$\text{N,N'$ -бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамин	Sigma Aldrich, 333131	1,2-эпокситетрадекан	Sigma Aldrich, 260215	C16-(2-3-2)	12

Пример получения V. Синтез модифицированного $\text{N,N'$ -бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамином поли(аллиламина); (PALAM-(2-3-2)).

500 мг раствора поли(аллиламина) (фирма Sigma-Aldrich, 20 мас.%, молекулярная масса: 17000 Да) разводили в 2 мл реакционного буфера, содержащего 50 мМ MES, pH 6,0. 10,33 г янтарной кислоты (50 экв. на амин, фирма Sigma-Aldrich) разводили в 5 мл такого же реакционного буфера. Растворы объединяли и pH повторно доводили до 6,0. Для инициации реакции добавляли 3,36 г 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC, 10 экв. на амин, фирма Sigma Aldrich), разведенного в 5 мл реакционного буфера. Смесь инкубировали в течение 3 ч при КТ на переворотном шейкере. Продукт очищали диализом. Для этой цели реакционную смесь помещали в кассету для диализа Slide-a-lyzer™ (3-12 мл, MWCO: 3500 Да, фирма Thermo Fisher) и осуществляли диализ в противотоке воды в течение 72 ч. Обмен воды осуществляли дважды в день. После диализа очищенный полимер лиофилизировали.

5 мг лиофилизированного модифицированного янтарной кислотой поли(аллиламина) разводили в 2 мл реакционного буфера, содержащего 50 мМ MES, pH 6,0. 510,38 мг $\text{N,N'$ -бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина (100 экв./карбоксылную группу, фирма Sigma Aldrich) разводили в 2 мл такого же буфера. Поскольку олиго(алкиленамин) покупали в виде свободного основания, pH повторно доводили до pH 6,0, добавляя по каплям 32% HCl . Раствор поли(аллиламина) и олиго(алкиленамина) смешивали. Для инициации реакции добавляли 10-кратный мольный избыток 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC, фирма Sigma Aldrich, разведенный в 4 мл реакционного буфера) на карбок-

сильную группу. Конечный объем доводили до 10 мл. Смесь инкубировали в течение 3 ч при КТ на переворотном шейкере. Продукт очищали диализом. Для этой цели реакционную смесь помещали в кассету для диализа Slide-a-lyzer™ (3-12 мл, MWCO: 3500 Да, фирма Thermo Fisher) и осуществляли диализ в противотоке воды в течение 72 ч. Обмен воды осуществляли дважды в день. После диализа очищенный полимер лиофилизировали.

В таких же условиях синтезировали и тестировали полимеры, представленные ниже в табл. 3:

Таблица 3

Список синтезированных модифицированных олиго(алкиленамином) полимеров
на основе поли(аллиламина)

Полимерный каркас		Олиго(алкиленамин)		Полученный полимер	Пример
Название	Производитель/номер продукта	Название	Производитель/номер продукта		
поли(аллиламин), 17000 кДа	Sigma Aldrich, 479136	N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамин	EvoBlock, KEMAM-003	PALAM-(2-3-2)	26
поли(аллиламин), 17000 кДа	Sigma Aldrich, 479136	триэтилететрамин	Sigma Aldrich,	PALAM-(2-2-2)	26
поли(аллиламин), 17000 кДа	Sigma Aldrich, 479136	N,N'-бис(2-аминопропил)-1,3-пропандиамин	Sigma Aldrich,	PALAM-(3-3-3)	26

Пример получения VI. Синтез модифицированного N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамином полипропиленimina (PPI-(2-3-2)).

100 мг дендримера полипропиленимин-гексадекамина (PPI, генерация 3.0, фирма Sigma Aldrich) растворяли в 1,5 мл реакционного буфера, содержащего 50 mM MES, pH 6,0. 11,2 г янтарной кислоты (100 экв. на первичный амин, фирма Sigma-Aldrich) растворяли в 30 мл этого же реакционного буфера. Растворы объединяли и pH повторно доводили до 6,0. Для инициации реакции добавляли 1,81 г 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC, 10 экв. на первичный амин, фирма Sigma Aldrich), разведенного в 2 мл реакционного буфера. Смесь инкубировали в течение ночи при КТ на переворотном шейкере. Продукт очищали диализом. Для этой цели реакционную смесь помещали в кассету для диализа Slide-a-lyzer™ (3-12 мл, MWCO: 3500 Да, фирма Thermo Fisher) и осуществляли диализ в противотоке воды в течение 72 ч. Обмен воды осуществляли дважды в день. После диализа очищенный полимер лиофилизировали.

10 мг лиофилизированного модифицированного янтарной кислотой PPI разводили в 2 мл реакционного буфера, содержащего 50 mM MES, pH 6,0. 0,776 г N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина (100 экв./карбоксильную группу, фирма Sigma Aldrich) разводили в 2 мл такого же буфера. Поскольку олиго(алкиленамин) покупали в виде свободного основания, pH повторно доводили до pH 6,0, добавляя по каплям 32% HCl. Полипропиленимин и раствор олиго(алкиленамина) смешивали. Для инициации реакции добавляли 10-кратный мольный избыток 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC, фирма Sigma Aldrich, разведенный в 4 мл реакционного буфера) на карбоксильную группу. Конечный объем доводили до 10 мл. Смесь инкубировали в течение 5 ч при КТ на переворотном шейкере. Продукт очищали диализом. Для этой цели реакционную смесь помещали в кассету для диализа Slide-a-lyzer™ (3-12 мл, MWCO: 3500 Да, фирма Thermo Fisher) и осуществляли диализ в противотоке воды в течение 72 ч. Обмен воды осуществляли дважды в день. После диализа очищенный полимер лиофилизировали.

В таких же условиях синтезировали и тестировали полимеры, представленные ниже в табл. 4.

Таблица 4

Список синтезированных модифицированных олиго(алкиленамином) полимеров
на основе поли(аллиламина)

Полимерный каркас		Олиго(алкиленамин)		Полученный полимер	Пример
Название	Производитель/номер продукта	Название	Производитель/номер продукта		
полипропиленимингекса-декааминный дендример, поколение 3.0	Sigma Aldrich, 469076	N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамин	EvoBlock, KEMAM-003	PPI-(2-3-2)	27
полипропиленимингекса-декааминный дендример, поколение 3.0	Sigma Aldrich, 469076	триэтилететрамин	Sigma Aldrich, 132098	PPI-(2-2-2)	27
полипропиленимингекса-декааминный дендример, поколение 3.0	Sigma Aldrich, 469076	N,N'-бис(2-аминопропил)-1,3-пропандиамин	Sigma Aldrich, 404810	PPI-(3-3-3)	27

Пример получения VII. Синтез липидоидов на основе N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина и 1-бромдекана.

100 мг N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина (0,623 мкмоль) смешивали с 10 мл тетрагидрофурана (ТГФ). 815,2 мкл N,N-диизопропилэтиламина (DIPEA) и 690,1 мг 1-бромдекана (3,12 мкмоль, (N-1) экв., где N обозначает 2-кратное количество первичных аминов плюс 1-кратное количество вторичных аминов на олиго(алкиленамин)) и смешивали в течение 22 ч при комнатной температуре при постоянном встряхивании. Продукт осаждали дважды в холодном n-гексане и растворяли в ДХМ. Растворители удаляли выпариванием при 60°C. Образовавшийся липидоид разводили в этаноле до концентрации 50 мг/мл и хранили при 4°C.

Пример получения VIII. Синтез липидоидов на основе N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина и N-додецилакриламида.

100 мг N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина (0,623 мкмоль) смешивали с 746,9 мг N-додецилакриламида (3,12 мкмоль, (N-1) экв., где N обозначает 2-кратное количество первичных аминов плюс 1-кратное количество вторичных аминов на олиго(алкиленамин)) и смешивали в течение 192 ч при 90°C при постоянном встряхивании. Образовавшийся липидоид разводили в этаноле до концентрации 50 мг/мл и хранили при 4°C.

Пример получения IX. Синтез липидоидов на основе N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина и додецилакрилата.

100 мг N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина (0,623 мкмоль) смешивали с 750 мг додецилакрилата (3,12 мкмоль, (N-1) экв., где N обозначает 2-кратное количество первичных аминов плюс 1-кратное количество вторичных аминов на олиго(алкиленамин)) и смешивали в течение 22 ч при 90°C при постоянном встряхивании. Образовавшийся липидоид разводили в этаноле до концентрации 50 мг/мл и хранили при 4°C.

Пример получения X. Синтез липидоидов на основе N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина и 1,2-эпоксидодекана.

100 мг N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамина (0,623 ммоль) смешивали с 575,07 мг 1,2-эпоксидодекана (3,12 ммоль, (N-1) экв., где N обозначает 2-кратное количество первичных аминов плюс 1-кратное количество вторичных аминов на олиго(алкиленамин)) и смешивали в течение 96 ч при 80°C при постоянном встряхивании. Образовавшийся липидоид разводили в этаноле до концентрации 50 мг/мл и хранили при 4°C.

Пример 1. Тестирование способности катионных полимеров транспортировать мРНК в различные клеточные линии.

Материалы и методы.

Получение полиплекса.

Для трансфекции *in vitro* получали полиплексы в объеме 44 мкл. 22 мкл воды для инъекций, содержащей 1100 нг мРНК (химически модифицированная мРНК, содержащая 25% 5-метилцитидина и 2-тиоуридина соответственно), которая кодирует люциферазу светляка, смешивали с 22 мкл воды для инъекций, содержащей полимер в требуемом количестве. Соотношение полимера и РНК определяли в виде количества атомов азота полимера на фосфатную группу нуклеиновой кислоты (N/P) и тестировали с использованием постоянных количеств нуклеиновой кислоты. После смешения нуклеиновой кислоты с полимером образцы инкубировали в течение 30 мин при КТ и применяли для трансфекции.

Трансфегирующая активность полиплексов *in vitro*.

Полимеры тестировали в отношении трансфегирующей эффективности с использованием 2 различных клеточных линий (NIN3T3 и A549). За 24 ч до обработки 5000 клеток (NIN3T3) или 7000 клеток (A549) в 100 мкл среды высевали в лунку 96-луночного планшета. В день трансфекции получали полиплексы согласно описанному выше методу. Для тестирования мРНК в различных количествах получали серийные разведения, смешивая 50% раствора полиплекса с таким же количеством среды (без FCS), применяя указанный раствор для следующей аналогичной дополнительной стадии разведения и т.д., до достижения конечной концентраций 62,5 нг/20 мкл. По 20 мкл раствора, полученного на каждой стадии разведения, добавляли к клеткам без обмена среды. Через 24 ч после трансфекции среду удаляли. Клетки лизировали, добавляя 100 мкл буфера для лизиса (25 мМ Трис-HCl, 0,1% ТритонХ 100, pH 7,8) и инкубировали в течение 20 мин при КТ. 80 мкл лизата вносили в лунку белого 96-луночного планшета и использовали для измерения люциферазной активности в устройстве Wallac Victor2 (фирма Perkin Elmer). Для этой цели добавляли 100 мкл реагента для анализа люциферазы (0,5мМ D-люциферин, 0,3 мМ коэнзим А, 33 мМ ДТТ, 0,5 мМ АТФ, 1 мМ карбонат магния, 2,7 мМ сульфат магния, 0,1 мМ ЭДТК, 20 мМ трицин) и определяли хемилюминисценцию. Эксперименты проводили в трех повторностях.

Результаты.

Как продемонстрировано на фиг. 1, уровни экспрессии люциферазы очень существенно варьировали при использовании различных модифицированных полимеров. Наиболее эффективные уровни трансфекции всех типов клеток достигались при использовании PAA8k-(2-3-2) или PAA8k-(3-2-3) в отличие от модифицированных полимеров, содержащих олиго(алкиленаминные) боковые цепи, в которых одна из алкильных цепей была заменена ((2-2-2) и (3-3-3)) или удалена (2-2), эффективность которых резко снижалась в 10-1000 раз. Удлинение всех алкильных цепей в олиго(алкиленамине) (3-4-3) также снижало эффективность в 100 раз.

Пример 2. Образование комплекса и способность мРНК связываться с модифицированной (2-3-2) и (3-2-3) PAA8k.

Материалы и методы.

Анализ миграции в геле.

Получали полиплексы согласно методу, описанному в примере 1, с соотношением N/P, составляющим 1, 2, 4, 8 и 12. После инкубации 5 мкл образца смешивали с 5 мкл 2-кратного красителя, позволяющего оценивать загрузку РНК (фирма Fermentas), инкубировали в течение 10 мин при 70°C и вносили в

1% агарозный гель, содержащий бромид этидия. Миграцию в геле оценивали в TBE-буфере при 150 В в течение 30 мин. Мигрирующие нуклеиновые кислоты визуализировали с помощью УФ-абсорбции при 260 нм.

RiboGreen-анализ.

Получали полиплексы согласно методу, описанному в примере 1, с соотношением N/P, составляющим 1, 2, 4, 8 и 12. После инкубации 2 мкл образца смешивали с 148 мкл воды и 50 мкл раствора RiboGreen (1:200, набор для анализа pHK QuantiT Ribogreen, фирма Invitrogen) в белом 96-луночном планшете. Образцы инкубировали в течение 5 мин при КТ с выключенным светом и измеряли флуоресценцию с помощью устройства Wallac Victor2 (фирма Perkin Elmer, 1 с, длина волны возбуждения: 485 нм, длины волны испускания: 535 нм).

Результаты.

Способность полимеров взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами с образованием стабильных комплексов имеет решающее значение для эффективности транспортирующей системы. Взаимодействие модифицированных полимеров с мРНК анализировали с помощью миграции в геле (фиг. 2) и RiboGreen-анализа (фиг. 3). Когда полимер обладал способностью взаимодействовать с нуклеиновой кислотой с образованием стабильных комплексов, то это приводило к получению наночастиц и инверсии заряда. Оба действия приводили к затрудненной способности к миграции при осуществлении электрофореза в агарозном геле. Как продемонстрировано на фиг. 2, при применении PAA8k, модифицированной (2-3-2) или (3-2-3), обнаружено отсутствие/значительное уменьшение свободной мРНК по сравнению с контролем без полимера (N/P 0), это свидетельствует о сильном взаимодействии. Указанное связывание оказалось столь же эффективным, что и при использовании "золотого стандарта", т.е. разветвленного PEI (brPEI).

Указанные данные удалось подтвердить с использованием RiboGreen-анализа. В указанном анализе установлено, что повышенная эффективность связывания приводила к снижению флуоресцентного сигнала. Как продемонстрировано на фиг. 3, снижение флуоресцентного сигнала при применении PAA8k-(2-3-2) и -(3-2-3) было более сильным, чем в случае brPEI. Таким образом, были получены комплексы со сходной стабильностью.

Пример 3. Трансфецирующая эффективность не зависит от полимерного каркаса.

Материалы и методы.

Получали полиплексы согласно методу, описанному в примере 1.

Трансфецирующая активность полиплексов *in vitro*.

Для тестирования *in vitro* трансфецирующей активности и эффективности полиплексов применяли NIH3T3-клетки. За 24 ч до обработки 5000 клеток в 100 мкл среды, содержащей 10% FCS, высевали в лунку 96-луночного планшета. В день трансфекции среду обменивали на 100 мкл среды без FCS. Полиплексы получали согласно описанному выше методу. Для тестирования в различных количествах в среду добавляли 20 мкл (500 нг), 10 мкл (250 нг), 5 мкл (125 нг) и 2,5 мкл (62,5 нг) мРНК. После инкубации в течение 4 ч при 37°C и в атмосфере, содержащей 5% CO₂, среду заменяли свежей средой, содержащей 10% FCS. Через 24 ч после трансфекции среду удаляли. Клетки лизировали и анализировали согласно методу, описанному в примере 1.

Результаты.

Для подтверждения того, что способность транспортировать нуклеиновые кислоты в клетки не зависела от структуры каркаса при использовании модифицированных (2-3-2) полимеров, различные типы полимеров (помимо поли(акриловой кислоты), 8000 Да, пример 1) модифицировали с использованием (2-3-2) (табл. 1) в описанных выше условиях. Результаты продемонстрировали, что различные типа каркасов полимеров (фиг. 4), а также различные длины цепи (фиг. 5) приводили к выраженной экспрессии репортерного гена, когда для модификации применяли олиго(алкиленамин) (2-3-2).

Пример 4. Валидация клеточной токсичности полимеров, модифицированных различными типами олиго(алкиленаминов).

Материалы и методы.

Трансфекции осуществляли согласно методу, описанному в примере 3. Определение живых клеток осуществляли с помощью анализа клеточной пролиферации TACS MTT (фирма Trevigen). Через 24 ч после трансфекции среду обменивали на 100 мкл свежей среды. После добавления 10 мкл MTT-реактанта клетки инкубировали в течение 4 ч при 37°C и 5% CO₂. Добавляли 100 мкл детергента, после чего осуществляли стадию инкубации при КТ в течение ночи. Считывание осуществляли путем измерения абсорбции при 570 нм, используя устройство Wallac Victor2 (фирма Perkin Elmer). Результаты выражали в виде % живых клеток по сравнению с необработанным контролем.

Результаты.

Как продемонстрировано на фиг. 6, различные модифицированные полимеры отличались по токсичности в отношении клеток. В то время как выживаемость клеток, обработанных комплексами, которые содержали модифицированную (2-3-2) и (3-2-3) поли(акриловую кислоту), составляла около 100% (PAA8k-(2-3-2), PAA8k-(3-2-3), PAA20k-(2-3-2), PAA70k-(2-3-2)), другие варианты типа боковой цепи приводили к сильной токсичности (PAA8k-(3-4-3), PAA8k-(3-3-3)) по сравнению с токсичностью стан-

дарта (brPEI).

Пример 5. Эффективность в отношении транспорта матричной РНК у мышей.

Материалы и методы.

Животные.

Самок мышей линии BALB/c возрастом 6-8 недель получали от фирмы Janvier, Route Des Chênes SecsBP5, F-53940, Ли Джнист-Саайнт-Айсл, Франция и содержали в условиях без специфических патогенов. Мышам давали акклиматизироваться к окружающей среде вивария в течение по меньшей мере 7 дней до начала экспериментов. Все процедуры на животных были одобрены и контролировались местным комитетом по этике и их осуществляли в соответствии с правилами немецких законов о защите жизни животных.

Получение полиплексов.

Полиплексы приготавливали следующим образом: мРНК и РAA20k-(2-3-2) разводили в 4,0 мл дважды дистиллированной воды с получением концентраций 500 мкг/мл мРНК и РAA20k-(2-3-2), в концентрациях, соответствующих N/P 10, 20, 30 или 40. Раствор мРНК добавляли с помощью пипетки к раствору полимера, перемешивали путем пипетирования вверх-вниз с получением мРНК в конечной концентрации 250 мкг/мл. Комплексы инкубировали в течение 20 мин при температуре окружающей среды перед применением.

Создание приспособления для аэрозольной обработки.

Для процедуры обработки распылением с использованием приспособления для обработки всего тела мышей помещали в пластиковый бокс размером 9,8×13,2×21,5 см, который можно закрывать крышкой. На одной узкой стороне бокса располагали четыре небольших отверстия для выпуска аэрозоля. На всей противоположной узкой стороне бокс присоединяли через соединительный элемент диаметром 2,1 см к пластиковому цилиндру шириной 15,4 см × длиной 41,5 см. Дно цилиндра равномерно покрывали 150 г силикагеля (1-3 мм, № 85330; фирма Fluka, Швейцария) для осушения аэрозоля, который создавали с помощью струйного распылителя (PARI BOY® LC plus, фирма PARI GmbH), соединенного с другим концом цилиндра (подробное описание см. у Rudolph и др., J. Gene. Med., 7, 2005, сс. 59-66).

Измерение Лус-активности в легких мышей с помощью биolumинисцентной визуализации *in vivo*.

Через 24 ч после обработки мышей умерщвляли путем смещения шейных позвонков. После вскрытия брюшного отдела с помощью срединных разрезов легкие изымали из животных и осуществляли их перфузию с использованием ЗФР. Легкие быстро замораживали в жидком азоте и гомогенизировали в замороженном состоянии. После добавления 400 мкл буфера для лизиса (250 мМ Трис, pH 7,8, 0,1% Три-тон X-100, таблетки коктейля ингибиторов протеаз Complete™ фирмы Roche) и инкубации в течение 20 мин на льду люциферазную активность в супернатанте измеряли с помощью люцинометра для пробирок типа Lumat LB9507 (фирма EG&G Berthold, Мюнхен, Германия).

Результаты.

Эксперимент продемонстрировал, что мРНК эффективно экспрессировалась в клетках легких мышей после легочного аэрозольного введения в сочетании с РAA20k-(2-3-2), это свидетельствует о том, что полимер обладает способностью эффективно транспортировать мРНК в клетки легких *in vivo* (ср. фиг. 7).

Пример 6. Эффективность транспорта матричной РНК в свиней.

Материалы и методы.

Получение полиплексов.

Для трансфекции *in vivo* приготавливали полиплексы объемом 28 мл. Приготавливали 14 мл воды для инъекций, содержащей 5,83 мг мРНК, которая кодирует люциферазу светляка, и 1,17 мг мРНК, которая кодирует Р-галактозидазу, и 14 мл воды для инъекций, содержащей в требуемом количестве полимер, и смешивали с помощью двухканального шприцевого насоса (KDS-210-CE; фирма KD Scientific). Заполняли два 20-миллилитровых шприца, используя функцию втягивания устройства. Смешивание осуществляли, соединяя шприцы через Т-элемент (Discofix C 3SC, фирма B.Braun) и используя инфузионную функцию смесителя. Соотношение полимера и мРНК определяли как количество атомов азота полимера на фосфатную группу нуклеиновой кислоты (N/P) и тестировали при N/P 10. После смешения нуклеиновой кислоты с полимером образцы инкубировали в течение 30 мин при 37 °C и 24 мл применяли для распыления. Оставшийся объем применяли для физико-химического анализа. Размер частиц и зета-потенциал чистого образца определяли с использованием устройства Zetasizer Nano ZS (фирма Malvern Instruments).

Экспериментальная процедура для аэрозольной обработки свиней.

Седатацию свиньи инициировали путем предварительной обработки азапероном 2 мг/кг веса тела, кетамин 15 мг/кг веса тела, атропином 0,1 мг/кг веса тела и с последующим введением внутривенных препаратов в боковую ушную вену. При необходимости свинью анестезировали путем внутривенной инъекции пропофола 3-5 мг/кг веса тела. При необходимости анестезию поддерживали путем постоянной внутривенной инфузии 1% пропофола. Параметры газообмена соотносили с уровнем диоксида углерода в конце выдоха и при необходимости регулировали. Осуществляли непрерывный мониторинг ане-

стезии, дыхания и сердечно-сосудистых параметров с использованием пульс-оксиметрии, капнографии, ректальной температуры и состояния рефлексов. Свиньи получали инфузию сбалансированного раствора электролитов из расчета 10 мл/кг/ч. Продолжительность анестезии составляла примерно 80-120 мин. После завершения аэрозольной обработки (распылитель Aeroneb mesh) свинью умерщвляли путем болюсной инъекции пентобарбитала из расчета 100 мг/кг веса тела через латеральную ушную вену после седации. Легкие вырезали и изготавливали срезы толщиной примерно 1 см из различных областей легкого с последующей инкубацией в среде для клеточной культуры в течение 24 ч при 37°C и 5% CO₂ в инкубаторе. Для измерения активности люциферазы образцы ткани инкубировали в бане со средой, содержащей в качестве субстрата D-люциферин в 3ФР (100 мкг/мл), при 37°C в течение 30 мин и подвергали *ex vivo* биолуминисцентной визуализации люциферазы (IVIS 100, фирма Xenogen, Аламеда, США).

Просвечивающая электронная микроскопия полиплексов.

Для просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) использовали одну каплю смеси, применяемой для аэрозольной обработки. Каплю помещали на решетку (Piano GmbH, Вецлар). После инкубации в течение 5 мин каплю удаляли с помощью фильтровальной бумаги. Образец окрашивали раствором уранилацетата и анализировали с помощью просвечивающего электронного микроскопа (Jem 1011, фирма Jeol).

Результаты.

Как продемонстрировано на фиг. 8, PAA20k-(2-3-2) и мРНК при использовании в соотношении N/P, составляющем 10, позволяли получать комплексы с гидродинамическим диаметром комплекса ниже 100 нм и поверхностным зарядом (зета-потенциал) 40 мВ. Диапазон обоих параметров соответствовал комплексам на основе brPEI, для которых уже установлена способность эффективно транспортировать нуклеиновые кислоты в клетки *in vivo*. Частицы имели округлую форму и однородный размер по данным анализов с помощью ПЭМ (фиг. 9). Как продемонстрировано на фиг. 10, эти частицы эффективно вводили мРНК (кодирующую люциферазу светляка) в ткань легкого после аэрозольной обработки, что приводило к экспрессии белка-мишени. Уровни экспрессии оказались сопоставимыми с полученными при распадении полиплексов, созданных с использованием "золотого стандарта", т.е. brPEI.

Пример 7. Стабильность комплексов при лиофилизации.

Материалы и методы.

Приготовление образцов.

Комплексы PAA20k-(2-3-2)/мРНК (которая кодирует люциферазу планктонного рачка *Metridia*) получали согласно методу, описанному в примере 1, в 4 различных флаконах при N/P, составляющем 20, в объеме 1 мл. Один флакон применяли без дополнительной обработки для трансфекции, во второй флакон добавляли 100 мкл 11%-го раствора трегалозы с получением в конечном объеме 1% трегалозы. Содержимое третьего флакона лиофилизировали и регидратировали в 1 мл воды. Содержимое четвертого флакона обрабатывали 100 мкл 11%-го раствора трегалозы перед лиофилизацией и также регидратировали в 1 мл воды.

Трансфекция.

За 24 ч до трансфекции 5000 NIH3T3-клеток в 100 мкл среды высевали в 96-луночный планшет и инкубировали при 37°C и 5% CO₂. В день трансфекции среду заменяли на 100 мкл свежей среды без FCS. 20, 10, 5 и 2,5 мкл каждого раствора комплекса добавляли к клеткам в трех повторностях, в результате чего трансфекцию осуществляли с использованием 500, 250, 125 и 62,5 нг. Через 24 ч после трансфекции среду удаляли, собирали и заменяли на свежую среду. Указанную процедуру повторяли через 48 и 72 ч. Собранную среду анализировали в отношении люциферазной активности *Metridia*. Для этой цели 50 мкл среды помещали в белый 96-луночный планшет, смешивали с 20 мкл раствора коелентеразина (50 мкМ коелентеразин в 50 мМ натрий-фосфатном буфере) и хемилюминисцентный сигнал измеряли с использованием устройства Wallac Victor2 (фирма Perkin Elmer).

Результаты.

Как продемонстрировано на фиг. 11, свежеприготовленные комплексы обеспечивали экспрессию люциферазы *Metridia* через 24 ч. Экспрессия оставалась стабильной в течение еще 24 ч, а затем медленно снижалась. Добавление трегалозы не оказывало отрицательного воздействия на это явление, а приводило к небольшому повышению уровней экспрессии. После лиофилизации необработанные комплексы не обладали способностью трансфектировать клетки, что приводило к отсутствию экспрессии репортерного белка. В противоположность этому добавление трегалозы сохраняло комплекс и приводило к проявлению трансфетирующей эффективности.

Пример 8. Применение PAA8k-(2-3-2) и PAA8k-(3-2-3) в качестве транспортирующей системы для плазмидной ДНК.

Материалы и методы.

Получение полиплексов.

Полиплексы получали согласно методу, описанному в примере 1, используя вместо мРНК плазмидную ДНК (pCMVLuc, фирма Plasmid Factory), кодирующую люциферазу светляка.

In vitro трансфекция с использованием полиплексов.

Эксперименты по трансфекции осуществляли согласно методу, описанному в примере 3.

Результаты.

В этом эксперименте анализировали эффективность модифицированных N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамином (2-3-2) полимеров (поли(акриловая кислота) в отношении транспорта ДНК и экспрессии образовавшегося белка в сравнении с применяемым в качестве "золотого стандарта" разветвленным PEI (brPEI, фиг. 12). Результаты четко продемонстрировали, что трансфекция NIH3T3-клеток комплексами, состоящими из пДНК и модифицированных олиго(алкиленамином) (2-3-2) и (3-2-3) полимеров, приводила к существенному повышению экспрессии репортерного белка. Уровень экспрессии даже превышал уровень, полученный при использовании "золотого стандарта".

Пример 9. Применение PAA20k-(2-3-2) в качестве транспортирующей системы для siРНК для индукции РНК-интерференции.

Материалы и методы.

Комплексы получали согласно методу, описанному в примере 1, используя siРНК GL3-Luc (фирма Qiagen). Для титрования количества siРНК комплексы серийно разводили после 30 мин инкубации при КТ. Для этой цели 22 мкл раствора комплекса смешивали с 22 мкл среды без FCS. 22 мкл указанного разведения вновь смешивали с 22 мкл среды без FCS. Указанные серийные разведения повторяли до достижения концентрации siРНК 7,8 нг на 20 мкл. По 20 мкл раствора, полученного на каждой стадии разведения, применяли для трансфекции согласно методу, описанному в примере 1, используя клетки HeLa, стабильно экспрессирующие люцифразу светляка (HeLa-Luc). В качестве контроля специфичности РНК-интерференции, основанной на понижающей регуляции экспрессии люциферазы, применяли контрольную siРНК, которая не оказывала влияние на клеточную экспрессию (GFP22-siРНК; фирма Qiagen), для трансфекции в таких же условиях. Результаты выражали в виде относительного уровня экспрессии люциферазы по сравнению с необработанными контрольными клетками.

Результаты.

Как продемонстрировано на фиг. 13, комплекс, включающий GL3-Luc-siРНК (siLuc) и PAA20k-(2-3-2), обеспечивал понижающую регуляцию, экспрессии люциферазы. Указанное явление зависело от дозы (снижалось при уменьшении количеств siРНК) и специфичности (отсутствие воздействия неспецифической siРНК (siGFP)). При повышении соотношений N/P удалось обнаружить дополнительное неспецифическое действие, о чем свидетельствовал пониженный сигнал в обработанных siGFP клетках.

Пример 10. Благоприятное действие липидоидных структур на основе олиго(алкиленамина) (2-3-2) на эффективность транспортирования мРНК.

Материал и методы.

Получение комплексов липидоид/мРНК.

Липидоиды синтезировали и разводили согласно примеру получения IV. Для трансфекции 250 нг мРНК, кодирующей люцифразу светляка, в 50 мкл воды смешивали в оптимизированных условиях с 4000 нг липидоида в 50 мкл воды в массовом соотношении (масса липидоида/масса мРНК), составляющем 16. После инкубации в течение 30 мин при КТ образцы применяли для трансфекции.

In vitro трансфекция с использованием комплексов липидоид/мРНК.

За 24 ч до обработки высевали по 5000 NIH3T3-клеток в 100 мкл среды в лунку 96-луночного планшета. В день трансфекции приготавливали полиплексы согласно описанному выше методу. Для титрования мРНК в различных количествах осуществляли серийные разведения, смешивая 50% раствора комплекса с таким же количеством среды (без FCS), используя указанный раствор для осуществления такой же дополнительной стадии разведения и т.д., вплоть до достижения конечной концентрации 15,6 нг/50 мкл. Перед трансфекцией среду удаляли из клеток и заменяли 100 мкл среды без FCS. 50 мкл раствора, полученного на каждой стадии разведения, добавляли к клеткам и инкубировали в течение 4 ч при 37°C и 5% CO₂. После этого среду вновь заменяли свежей средой, содержащей 10% FCS. Через 24 ч после трансфекции среду удаляли. Клетки лизировали и лизаты анализировали в отношении активности репортерного белка согласно методу, описанному в примере 1.

Результаты.

Как продемонстрировано на фиг. 14, липидоиды на основе структуры (2-3-2) обеспечивали более высокий уровень экспрессии люциферазы светляка, чем аналогичные структуры на основе (2-2-2) или (3-3-3). Указанное явление удалось обнаружить независимо от присоединенной алкильной цепи (C12 или C14). Поскольку активность люциферазы светляка коррелирует с уровнем ее экспрессии в клетке, что зависит от эффективности транспортирования мРНК в клетку, указанные результаты свидетельствуют о том, что липидоиды на основе (2-3-2) более эффективно транспортировали мРНК в клетки in vitro.

Пример 11. Эффективность транспортирования матричной РНК липидоидными препаративными формами после внутривенного введения мышам.

Материалы и методы.

Животные.

Самок мышей линии BALB/c возрастом 6-8 недель получали от фирмы Janvier, Route Des Chenes SecsBP5, F-53940, Ли Джнист-Саайнт-Айсл, Франция и содержали в условиях без специфических патогенов. Мышам давали акклиматизироваться к окружающей среде вивария в течение по меньшей мере 7 дней до начала экспериментов. Все процедуры на животных были одобрены и контролировались мест-

ным комитетом по этике и их осуществляли в соответствии с правилами немецких законов о защите жизни животных.

Липидоидные препаративные формы.

Липидоиды приготавливали с мРНК следующим образом: C12-(2-3-2), DOPE, Chol и DSPE-PEG2k (массовое соотношение 3,6:0,18:0,76:1) растворяли в этаноле и быстро инъецировали в забуференный цитратом раствор (10 мМ лимонная кислота, 150 мМ NaCl, pH 4,5), содержащий химически модифицированную мРНК, которая кодирует люциферазу светляка, при массовом соотношении липид/мРНК, составляющем 10,5, с получением конечной концентрации этанола 20%, и диализировали в противотоке воды. Образовавшиеся комплексы липидоид/мРНК представляли собой положительно заряженные наночастицы ($92,6 \pm 0,7$ нм; $21,0 \pm 0,2$ мВ) и их инъецировали внутривенно в хвостовую вену обездвиженных мышей. Во втором эксперименте комплексы липидоид/мРНК комплексы приготавливали в ЗФР перед внутривенной инъекцией, что приводило к образованию практически незаряженных частиц ($91,5 \pm 0,6$ нм; $-0,7 \pm 0,2$ мВ).

Измерение Лус-активности в мышах с использованием биолюминисцентной визуализации *in vivo*.

Через 24 ч после обработки мышей анестезировали внутрибрюшинной инъекцией медетомидина (11,5 мкг/кг BW), мидазолама (115 мкг/кг BW) и фентанила (1,15 мкг/кг BW). D-люциферин в качестве субстрата (3 мг/100 мкл ЗФР на мышь) вводили с помощью внутрибрюшинной инъекции. Биолюминисценцию измеряли через 10 мин, используя систему визуализации IVIS 100 (фирма Xenogen, Аламеда, США) и следующие установки камеры: Bin(HS), поле зрения 10, f1 f-стоп, биннинг с высоким разрешением и продолжительность экспозиции 5 мин. Сигнал оцифровывали и анализировали с помощью программы Living Image, версия 2.50 (фирма Xenogen, Аламеда, США).

Результаты.

Эксперимент продемонстрировал, что мРНК эффективно экспрессировалась в брюшной области мышей только, когда комплексы липидоид/мРНК приготавливали в ЗФР, несущем практически нейтральный заряд, но не когда их приготавливали в воде (ср. фиг. 16).

Пример 12. Эффективность транспортирования мРНК в различные органы мышей после внутривенного введения липидоидных препаративных форм.

Материалы и методы.

Животные.

Самки мышей линии BALB/c возрастом 6-8 недель получали от фирмы Janvier, Route Des Chênes SecsBP5, F-53940, Ли Джнист-Саайнт-Айсл, Франция и содержали в условиях без специфических патогенов. Мышам давали акклиматизироваться к окружающей среде вивария в течение по меньшей мере 7 дней до начала экспериментов. Все процедуры на животных были одобрены и контролировались местным комитетом по этике и их осуществляли в соответствии с правилами немецких законов о защите жизни животных.

Липидоидные препаративные формы.

Липидоиды приготавливали с мРНК следующим образом: липидоид, DOPE, Chol и DMPE-PEG2k (мольное соотношение 8:6:5:1) растворяли в этаноле и быстро инъецировали в забуференный цитратом раствор (10 мМ лимонная кислота, 150 мМ NaCl, pH 4,5), содержащий химически модифицированную мРНК, которая кодирует люциферазу светляка, при соотношении N/P, составляющем 15, с получением конечной концентрации этанола 20% и диализировали в противотоке воды. Образовавшиеся комплексы липидоид/мРНК представляли собой положительно заряженные наночастицы. Комплексы липидоид/мРНК вносили в ЗФР перед внутривенной инъекцией, что позволяло получать практически незаряженные наночастицы (см. табл. 5).

Таблица 5

	C12-(2-3-2)		C14-(2-3-2)		C16-(2-3-2)	
	Вода	ЗФР	Вода	ЗФР	вода	ЗФР
Размер (нм)	$84,3 \pm 0,7$	$84,9 \pm 0,7$	$85,3 \pm 0,6$	$86,6 \pm 0,5$	$125,7 \pm 0,2$	$120,6 \pm 1,2$
Зета (мВ)	$11,1 \pm 0,1$	$-0,9 \pm 0,3$	$9,2 \pm 0,2$	$-0,7 \pm 0,2$	$8,6 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$

Измерение Лус-активности в мышах с использованием биолюминисцентной визуализации *in vivo*.

Через 24 ч после обработки мышей анестезировали внутрибрюшинной инъекцией медетомидина (11,5 мкг/кг BW), мидазолама (115 мкг/кг BW) и фентанила (1,15 мкг/кг BW). D-люциферин в качестве субстрата (3 мг/100 мкл ЗФР на мышь) вводили с помощью внутрибрюшинной инъекции.

Биолюминисценцию измеряли через 10 мин, используя систему визуализации IVIS 100 (фирма Xenogen, Аламеда, США) и следующие установки камеры: Bin(HS), поле зрения 10, f1 f-стоп, биннинг с высоким разрешением и продолжительность экспозиции 5 мин. Сигнал оцифровывали и анализировали с помощью программы Living Image, версия 2.50 (фирма Xenogen, Аламеда, США).

Результаты.

Эксперимент продемонстрировал, что мРНК эффективно экспрессировалась в брюшной области мышей и уровень экспрессии повышался с уменьшением длины алкановой цепи (ср. фиг. 17А, Б). Кроме того, эксперимент продемонстрировал, что введение мРНК в печень снижалось с увеличением длины

алкановой цепи липидоидов (C16<C14<C12), и трудно поддавалось обнаружению для C16. Экспрессия люциферазы в селезенке оказалась самой высокой для C14. Некоторый уровень экспрессии люциферазы обнаружен в легких, но не обнаружен в сердце, почке, желудке или головном мозге (ср. фиг. 18А, Б).

Пример 13. Сравнение эффективности различных трансфектирующих реагентов в отношении их способности обеспечивать введение пДНК и мРНК.

Материалы и методы.

Получение полиплексов.

Полиплексы получали согласно методу, описанному в примере 1, используя плазмидную ДНК (pCMVLuc, фирма Plasmid Factory), кодирующую люциферазу светляка, или мРНК, кодирующую люциферазу светляка.

Трансфекция *in vitro* с использованием полиплексов.

Эксперименты по трансфекции осуществляли согласно методу, описанному в примере 3.

Результаты.

Эксперимент осуществляли для решения вопроса о том, зависит ли трансфектирующая эффективность исключительно от трансфектирующей системы (полимер/липидоид) или также от типа нуклеиновой кислоты. Результаты (фиг. 19) четко продемонстрировали, что трансфектирующие реагенты, которые эффективно транспортируют пДНК, необязательно являются эффективными носителями для транспорта мРНК. Таким образом, система носителя, обладающая высокой трансфектирующей эффективностью в отношении пДНК, не позволяет предсказывать ее эффективность для мРНК.

Пример 14. Сравнение трансфектирующей эффективности РАА8k, модифицированной N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамином (2-3-2) или N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-бутандиамином (2-4-2).

Материалы и методы.

Получение полиплексов.

Полиплексы получали согласно методу, описанному в примере 1.

Трансфекция *in vitro* с использованием полиплексов.

Эксперименты по трансфекции осуществляли согласно методу, описанному в примере 3.

Результаты.

Для дополнительного изучения, является ли эффективность полимеров, модифицированных (2-3-2), сильно связанной со структурой (2-3-2), или эффективность является сходной для любой другой структуры 2-X-2, в которой X>2, РАА8k модифицировали N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-бутандиамином (2-4-2). Сравнение РАА8k-(2-3-2) и РАА8k-(2-4-2) (фиг. 20) продемонстрировало, что оба полимера обеспечивали практически идентичный высокий уровень экспрессии люциферазы после трансфекции мРНК, кодирующей люциферазу светляка. Это свидетельствует о том, что полимер, модифицированный структурой (2-X-2), в которой X>2, как правило, позволяет создавать трансфектирующий реагент с улучшенной эффективностью транспортирования мРНК по сравнению с модификацией другими олиго(алкиламинами).

Пример 15. Просвечивающая электронная микроскопия липидоидных препаративных форм.

Материалы и методы.

Получение липидоидов.

Липидоиды приготавливали с мРНК следующим образом: C10-(2-3-2), 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфотаноламин (DOPE) или 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC), холестерин и 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфотаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (DSPE-PEG2k) или 1,2-дипальмитоил-sn-глицерол, метоксиполиэтиленгликоль (DPG-PEG2k) (мольное соотношение 9:6:5:1) растворяли в этаноле и быстро инъецировали в забуференный цитратом раствор (10 мМ лимонная кислота, 150 мМ NaCl, pH 4,5), содержащий химически модифицированную мРНК, которая кодирует люциферазу светляка, при мольном соотношении азот липида/фосфат мРНК, составляющем 17, с получением конечной концентрации этанола 20% и подвергали диализу в противотоке воды в течение 24 ч.

Просвечивающая электронная микроскопия.

Для анализа размеров применяли ПЭМ (просвечивающая электронная микроскопия) с увеличением в 10000 и 60000. В качестве первой стадии пластины на основе меди (Piano GmbH; S162-3) подвергали плазменной очистке. После указанной обработки 8 мкл липидоидной препаративной формы приводили в контакт с медной пластиной в течение 3 мин. После удаления капли липидоидной препаративной формы образец окрашивали, приводя в контакт покрытую липидоидом медную пластину с одной каплей объемом 8 мкл раствора уранилацетата дважды в течение 30 с. После каждой стадии жидкости удаляли с помощью промокательной бумаги. И, наконец, несущие пластины сушили при комнатной температуре в течение еще 30 мин и анализировали с помощью устройства Jem1011 (фирма Jeol).

Результаты.

Полученные с помощью ПЭМ изображения (фиг. 21) продемонстрировали, что полученные липидоидные препаративные формы представляли собой сферические частицы с гомогенным распределением размеров (общая картина). На увеличенном изображении можно установить, что размер частиц составлял 60-80 нм.

Пример 16. Эффективность в отношении транспортирования мРНК C10-(2-3-2), синтезированного с помощью алкилгалида.

Материалы и методы.

Синтез.

Синтез C10-(2-3-2) осуществляли согласно методу, описанному в примере получения VII.

Получение липидоидов.

Комплексы липидоид/мРНК получали согласно методу, описанному в примере 15, используя C10-(2-3-2), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), холестерин, 1,2-дипальмитоил-sn-глицерол-метоксиполиэтиленгликоль (DPG-PEG2k) в мольном соотношении 9:6:5:1 и мРНК, кодирующую люциферазу светляка, при N/P 17.

In vitro трансфекция.

За 24 ч до обработки по 5000 NIH3T3-клеток в 100 мкл среды высевали в лунку 96-луночного планшета. В день трансфекции липидоидные препаративные формы получали согласно описанному методу и приготавливали в 1×ЗФР с использованием 10× раствора ЗФР. Липидоидные препаративные формы разводили с получением 500, 250 или 125 нг в 50 мкл, добавляли к клеткам и инкубировали в течение 24 ч при 37°C и 5% CO₂. Через 24 ч после трансфекции среду удаляли. Клетки лизировали и лизаты анализировали в отношении активности репортерного белка согласно методу, описанному в примере 1.

Результаты.

Как продемонстрировано на фиг. 22, C10-(2-3-2), который синтезировали с использованием алкилгалида, обладал способностью транспортировать мРНК в клетки, что приводило к экспрессии репортерного белка люциферазы.

Пример 17. Эффективность в отношении транспортирования мРНК C12-(2-3-2), синтезированного с помощью N-додецилакриламида.

Материалы и методы.

Синтез.

Синтез C12-(2-3-2) осуществляли согласно методу, описанному в примере получения VIII.

Липидоидная препаративная форма.

Комплексы липидоид/мРНК получали согласно методу, описанному в примере 15, используя C12-(2-3-2), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), холестерин, 1,2-дипальмитоил-sn-глицерол-метоксиполиэтиленгликоль (DPG-PEG2k) в мольном соотношении 9:6:5:1 и мРНК, которая кодирует люциферазу светляка, при N/P 17.

In vitro трансфекция.

Эксперименты по трансфекции осуществляли согласно методу, описанному в примере 16, используя мРНК в дозе 500, 250 или 125 нг на лунку.

Результаты.

Как продемонстрировано на фиг. 23, C12-(2-3-2), который синтезировали с использованием N-додецилакриламида, обладал способностью транспортировать мРНК в клетки, что приводило к экспрессии репортерного гена люциферазы.

Пример 18. Эффективность в отношении транспортирования мРНК C12-(2-3-2), синтезированного с помощью додецилакрилата.

Материалы и методы.

Синтез.

Синтез C12-(2-3-2) осуществляли согласно методу, описанному в примере получения IX.

Липидоидная препаративная форма.

Комплексы липидоид/мРНК получали согласно методу, описанному в примере 15, используя C12-(2-3-2), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), холестерин, 1,2-дипальмитоил-sn-глицерол-метоксиполиэтиленгликоль (DPG-PEG2k) в мольном соотношении 9:6:5:1 и мРНК, которая кодирует люциферазу светляка, при N/P 17.

In vitro трансфекция.

Эксперименты по трансфекции осуществляли согласно методу, описанному в примере 16, используя мРНК в дозе 500, 250 или 125 нг на лунку.

Результаты.

Как продемонстрировано на фиг. 24, C12-(2-3-2), который синтезировали с использованием додецилакрилата, обладал способностью транспортировать мРНК в клетки, что приводило к экспрессии репортерного белка люциферазы.

Пример 19. Эффективность в отношении транспортирования мРНК C12-(2-3-2), приготовленного с использованием различных хелперных липидов и различных соотношений липидоидов и РНК (N/P).

Материалы и методы.

Липидоидная препаративная форма.

Комплексы липидоид/мРНК получали согласно методу, описанному в примере 15, используя C12-(2-3-2) в комбинации с 1,2-димиристоил-sn-глицерол-метоксиполиэтиленгликолем (DMG-PEG2k) в качестве ПЭГ-липидов, DOPE или DSPC в качестве хелперных липидов, и при соотношении N/P 17 или 8.

In vitro трансфекция.

Эксперименты по трансфекции осуществляли согласно методу, описанному в примере 16, используя мРНК в дозе 250 нг на лунку.

Результаты.

Как продемонстрировано на фиг. 25, C12-(2-3-2) в комбинации с различными хелперными липидами (DOPE, DSPC) и при различных соотношениях N/P (17 или 8) обладал способностью транспортировать мРНК в клетки, что приводило к экспрессии репортерного белка люциферазы. Таким образом, C12-(2-3-2) обладает способностью эффективно транспортировать РНК в клетки независимо от хелперного липида и соотношения N/P.

Пример 20. Повышенная эффективность в отношении транспортирования мРНК после внутривенного введения мышам липидоидной препаративной формы, содержащей C12-(2-3-2), по сравнению с C12-(2-2-2) и C12-(3-3-3).

Материалы и методы.

Животные.

Соответствуют описанным в примере 11.

Липидоидные препаративные формы.

Получали согласно методу, описанному в примере 15, используя C12-(2-3-2), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE), холестерин, 1,2-димиристоил-sn-глицерол-метоксиполиэтиленгликоль (DMG-PEG2k) и мРНК, которая кодирует люциферазу светляка, при N/P 17.

Измерение Luc-активности в мышах с использованием биолюминисцентной визуализации *in vivo*.

Осуществляли согласно методу, описанному в примере 11, анестезируя животных через 6 ч после введения.

Результаты.

Как продемонстрировано на фиг. 26, липидоидная препаративная форма, включающая C12-(2-3-2), приводила к существенно более высокому уровню экспрессии в мышах репортерного гена по сравнению с формой, включающей C12-(3-3-3) и C12-(2-2-2). Это демонстрирует обладающую преимуществом способность C12-(2-3-2) обеспечивать транспорт мРНК.

Пример 21. Сравнение эффективности в отношении транспортирования мРНК олиго(алкиленамина) (2-3-2), насыщенного различными количествами алкильной C12-цепи.

Материалы и методы.

Липидоидная препаративная форма.

Получали согласно методу, описанному в примере 15, но без диализа, используя олиго(алкиламин) (2-3-2) с различной степенью модификации и позиционирования (см. фиг. 27 A, SynCom).

In vitro трансфекция.

Эксперименты по трансфекции осуществляли согласно методу, описанному в примере 16, используя мРНК в дозе 250 нг на лунку.

Результаты.

Как продемонстрировано на фиг. 27 A, синтезировали три различные версии C12-(2-3-2) для оценки влияния количества и положения алкильных цепей в олиго(алкиленамине) на способность транспортировать мРНК. Установлено, что трансфетирующая эффективность (фиг. 27B) не изменяла уровень экспрессии репортерного белка, что свидетельствует об отсутствии различий в эффективности в отношении транспортирования мРНК. Таким образом, различные типы C12-(2-3-2) в липидоидных препаративных формах обеспечивали одинаковую эффективность в отношении транспортирования мРНК.

Пример 22. Лиофилизация липидоидных препаративных форм.

Материалы и методы.

Липидоидная препаративная форма.

Соответствует указанной в примере 15.

Процесс лиофилизации.

Растворы применяемых в качестве защитных агентов трегалозы, сахарозы и лактозы приготавливали в воде (конц. 20% (мас./об.)). Приготавливали серийные разведения с фактором 2, что позволяло получать растворы защитных агентов с концентраций от 20 до 0,625% (мас./об.). К этим растворам добавляли такой же объем липидоидной препаративной формы и смешивали пипетированием. Растворы замораживали в жидком азоте и лиофилизировали с использованием устройства sigma alpha 1-4 (фирма Martin Christ). После лиофилизации частицы ресуспендировали в таком же объеме воды и применяли для анализа. В качестве контроля липоплексы смешивали с растворами защитных агентов в таких же концентрациях без замораживания и лиофилизации.

In vitro трансфекция.

Трансфекцию осуществляли согласно методу, описанному в примере 15, используя 233 нг мРНК на лунку.

Измерение размера.

Гидродинамический диаметр частиц измеряли, используя устройство ZetaSier Nano ZS (фирма Malvern).

Результаты.

Как продемонстрировано на фиг. 28, все протестированные сахара обладали способностью поддерживать размер частиц и трансфектирующую эффективность в различных концентрациях. Частицы, полученные с целью сравнения без защитных агентов (0%), оказались менее эффективными и значительно увеличивались в размере из-за процессов агрегации.

Пример 23. Транспорт РНК в ткань млекопитающих *ex vivo*.

Материалы и методы.

Липидоидная препаративная форма.

Получали согласно методу, описанному в примере 15, используя C12-(2-3-2), DOPE, холестерин, DPG-PEG2k и мРНК, которая кодирует люциферазу светляка, при соотношении N/P 17, без диализа.

Обработка образцов ткани.

Кусочки ткани (мышца, жировая ткань, артерия или легкое, см. таблицу) размером примерно 1 см изымали из свежееубитого животного (свинья или овца; см. таблицу) и промывали в 3ФР. В каждый кусочек ткани инъектировали 100 мкл липидоидной препаративной формы, содержащей 10 мкг РНК, или 200 мкл липидоидной препаративной формы, содержащей 20 мкг РНК (см. таблицу). В случае обработки артерии овцы липидоидные препаративные формы инъектировали в полость сосуда, который с обоих концов зажимали с помощью нити. Ткань культивировали в течение 24 ч в среде для культуры клеток (DMEM), содержащей 10% FCS.

Анализ экспрессии люциферазы.

Через 24 ч образцы инкубировали в 3ФР, содержащем люциферин (100 мкг/мл) в течение 30 мин. Люциферазную активность измеряли с помощью системы для визуализации *in vivo* (IVIS, фирма Perkin Elmer).

Результаты.

Как продемонстрировано на фиг. 29, C12-(2-3-2) обладал способностью транспортировать мРНК, кодирующую люциферазу светляка, в клетки широкого разнообразия различных тканей различных видов, что приводило к экспрессии люциферазы. В противоположность этому в необработанных образцах (Г, Д, нижний кусочек ткани) не обнаружен сигнал визуализации.

Пример 24. Экспрессия ангиотензин I-превращающего фермента 2 (ACE-2) *in vitro*.

Липидоидная препаративная форма.

Препаративную форму получали согласно методу, описанному в примере 15, используя C12-(2-3-2), DOPE, холестерин, DPG-PEG2k без добавления мРНК, что приводило к получению "пустых" липоплексов. Получение препаративной формы комплексов липидоидов и мРНК осуществляли путем последующей загрузки. Для этой цели 1 мкл мРНК, кодирующей ACE-2 (1 мг/мл), смешивали с 4 мкл содержащего липоплекс раствора и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре.

In vitro трансфекция клеток.

Для трансфекции *in vitro* 300000 HepG2-клеток высевали в лунку 6-луночного планшета за 24 ч до обработки в 2 мл среды, содержащей 10% FCS. В день трансфекции среду обменивали на 2 мл свежей среды. Липидоидные препаративные формы получали согласно описанному выше методу и в каждую лунку добавляли 2,5 мкл раствора, содержащего 500 нг мРНК. В контрольные лунки инъектировали в таком же количестве липидоидную препаративную форму без добавления мРНК в процессе приготовления формы.

Обнаружение экспрессии ACE-2 с помощью вестерн-блоттинга.

Через 24 ч удаляли среду для трансфекции и клетки промывали 1 мл 3ФР. Клетки лизировали в течение 10 мин на льду, используя 250 мкл лизирующего буфера (25мМ Трис-HCl, 0,1% ТритонX, pH 7,4). После соскабливания лизатов дебрис удаляли центрифугированием в течение 10 мин при 14000 об/мин.

После оценки количества белка (BCA-анализ, фирма Thermo-Fisher scientific) его вносили по 10 мкг на полосу в гель 10% ДСН-ПААГ (фирма Thermo-Fisher scientific). После электрофореза при 100 В в течение 1,5 ч гель блоттировали на мембрану из ПВДФ (TransBlot Turbo, фирма Biorad).

После блоттирования мембрану блокировали, используя 5% порошкообразного молока в TBS-T (20 мМ Трис-HCl, 500 мМ NaCl, pH 7,5, 0,1% Твин 20) в течение 30 мин. После блокады мембрану зондировали антителом к ACE2 (фирма R&D systems) в разведении 1:10000 при 4°C в течение ночи. После трех стадий промывки (по 10 мин каждая, TBS-T) мембрану зондировали, используя антикозье антитело, конъюгированное с HRP (SCBT), в разведении 1:10000 в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего осуществляли три стадии промывки (по 10 мин каждая, TBS-T). Сигналы получали, используя люминисцентный субстрат для HRP (фирма GE healthcare), и сигналы анализировали с помощью камеры (ChemiDoc XRS+, фирма Bio-Rad). После обнаружения ACE2-сигналов анализировали равномерность загрузки, используя антитело к GAPDH (NEB) в разведении 1:1000, в течение 4 ч при комнатной температуре.

Результаты.

На фиг. 30 представлены результаты анализа трансфекции методом вестерн-блоттинга. На левых двух полосах представлены результаты для лизатов обработанных клеток, а на правых полосах - лизаты необработанных клеток. Четко продемонстрировано, что экспрессию ACE-2 удалось обнаружить только

в образцах, обработанных липидоидными препаративными формами, в которые после приготовления загружали РНК, кодирующую ACE-2. Указанный эксперимент продемонстрировал, что мРНК ACE-2 можно также транспортировать с помощью содержащей C12-(2-3-2) липидоидной препаративной формы. Продemonстрировано также, что метод последующей загрузки пустых липоплексов также приводит к эффективному транспорту мРНК в клетки.

Пример 25. Экспрессия мышиногo эритропoэтина (mEPO) в мышax линии Balb/c.

Материалы и методы.

Липидоидная препаративная форма.

Препаративную форму получали согласно методу, описанному в примере 15, используя C12-(2-3-2), DOPE, холестерин, DMPE-PEG2k и мРНК, которая кодирует мышиный эритропoэтин (mEPO), при соотношении N/P 15.

Животные.

Соответствуют описанным в примере 11.

Обработка животных.

Концентрацию липидоидной препаративной формы регулировали с помощью 1× ЗФР и разводили с получением 5, 10 и 20 мкг мРНК каждый раз в 130 мкл. Для дозирования трех мышей обрабатывали путем внутривенной инъекции. В качестве контроля мышей обрабатывали ЗФР. Через 6 ч после обработки получали образцы крови и анализировали в отношении уровней мышиногo EPO.

Количественная оценка мышиногo EPO.

Количественную оценку мышиногo эритропoэтина осуществляли с помощью ELISA для мышиногo EPO (Quantikine ELISA, фирма R&D Systems Inc.) согласно протоколу производителя.

Результаты.

В этом эксперименте определяли экспрессию мышиногo эритропoэтина у мышей после обработки мРНК, кодирующей мышиный EPO, включенной в содержащую C12-(2-3-2) липидоидную препаративную форму. Как продемонстрировано на фиг. 31, мышиный EPO удалось обнаружить через 6 ч во всех группах в концентрациях, существенно более высоких, чем в обработанной ЗФР контрольной группе. Таким образом, кодирующая мышиный EPO мРНК эффективно транспортировалась в клетки, что приводило к экспрессии белка.

Пример 26.

Эффективность в отношении транспортирования матричной РНК модифицированного олиго(алкиленамином) (2-3-2) линейного полимера поли(аллиламина).

Материалы и методы.

Получение полиплекса.

Полиплекс получали согласно методу, описанному в примере 1, используя поли(аллиламин) (PALAM), модифицированный олиго(алкиленамином) (2-3-2), (2-2-2) или (3-3-3). Синтез описан в примере получения V.

In vitro трансфекция полиплексами.

Трансфекцию NIH3T3-клеток осуществляли согласно методу, описанному в примере 1, используя 500 нг мРНК и соотношение N/P 12.

Результаты.

Как продемонстрировано на фиг. 32, после трансфекции полиплексами, содержащими мРНК и PALAM-(2-3-2), в клетках обнаружен существенно более высокий уровень экспрессии люциферазы, чем после трансфекции комплексами PALAM-(2-2-2)/мРНК или PALAM-(3-3-3)/мРНК. Таким образом, эти результаты продемонстрировали, что модификация линейного аминоконцевого полимера олиго(алкиленамином) с чередующимися алкильными цепями приводила к такому же благоприятному воздействию, что и при применении полимера с линейным карбоксиконцевым каркасом.

Пример 27. Эффективность в отношении транспортирования матричной РНК модифицированного олиго(алкиленамином) (2-3-2) дендритного полимера полипропиленimina.

Материалы и методы.

Получение полиплекса.

Полиплекс получали согласно методу, описанному в примере 1, используя полипропиленimin (PPI), модифицированный олиго(алкиленамином) (2-3-2), (2-2-2) или (3-3-3). Синтез описан в примере получения VI.

In vitro трансфекция полиплексами.

Трансфекцию NIH3T3-клеток осуществляли согласно методу, описанному в примере 1, используя 500 нг мРНК и соотношение N/P 32.

Результаты.

Как продемонстрировано на фиг. 33, после трансфекции полиплексами, содержащими мРНК и PPI-(2-3-2), в клетках обнаружен существенно более высокий уровень экспрессии люциферазы, чем после трансфекции комплексами PPI-(2-2-2)/мРНК или PPI-(3-3-3)/мРНК. Таким образом, эти результаты продемонстрировали, что модификация дендритного полимера олиго(алкиленамином) с чередующимися алкильными цепями приводила к такому же благоприятному воздействию, что и при применении поли-

мера с линейным каркасом.

Пример 28. Эффективность в отношении транспортирования внутриклеточной РНК содержащей C12-(2-3-2) препаративной формы после подкожной инъекции крысам.

Материалы и методы.

Липидоидная препаративная форма.

Препаративную форму получали согласно методу, описанному в примере 15, используя C12-(2-3-2), DOPE, холестерин, DMG-PEG2k и мРНК, которая кодирует люциферазу светляка, при соотношении N/P 17.

Обработка животных.

Концентрацию липидоидной препаративной формы регулировали с помощью 1×ЗФР. 500 мкл препаративной формы, содержащей 63 мкг РНК, инъектировали подкожно самкам крыс линии Buffalo, через 6 ч после обработки крыс анестезировали путем внутривентральной инъекции медетомидина (11,5 мкг/кг BW), мидазолама (115 мкг/кг BW) и фентанила (1,15 мкг/кг BW). D-люциферин в качестве субстрата (30 мг в ЗФР на крысу) вносили путем внутривентральной инъекции. Биолюминисценцию измеряли через 10 мин с помощью системы для визуализации IVIS 100 (фирма Xenogen, Аламеда, США).

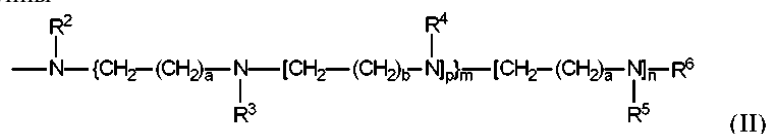
Результаты.

Как продемонстрировано на фиг. 34, у крыс обнаружен яркий люминисцентный сигнал на стороне, в которую осуществляли инъекцию, демонстрируя, что транспорт РНК в окружающую ткань был очень эффективным. Установлено также, что функциональность РНК не изменялась, поскольку она могла продуцировать кодируемый белок.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для введения РНК в клетку, указанная композиция содержит одноцепочечную РНК и компонент, содержащий олиго(алкиленамин), где компонент выбран из

а) олигомера или полимера, содержащего множество групп формулы (II) в качестве боковой цепи и/или концевой группы



где переменные a, b, p, m, n и R²-R⁶ имеют указанные ниже значения независимо в каждой группе формулы (II) во множестве указанных групп:

a обозначает 1 и b обозначает целое число от 2 до 4; или a обозначает целое число от 2 до 4 и b обозначает 1,

p обозначает 1 или 2,

m обозначает 1 или 2;

n обозначает 0 или 1 и

m+n ≥ 2;

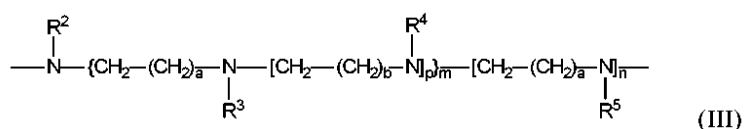
R²-R⁵, каждый независимо друг от друга, выбран из водорода; группы -CH₂-CH(OH)-R⁷, -CH(R⁷)-CH₂-OH, -CH₂-CH₂-(C=O)-O-R⁷, -CH₂-CH₂-(C=O)-NH-R⁷ или -CH₂-R⁷, где R⁷ выбран из C₃-C₁₈-алкила или C₃-C₁₈-алкенила, имеющего одну двойную связь C=C;

R⁶ выбран из водорода; группы -CH₂-CH(OH)-R⁷, -CH(R⁷)-CH₂-OH, -CH₂-CH₂-(C=O)-O-R⁷, -CH₂-CH₂-(C=O)-NH-R⁷ или -CH₂-R⁷, где R⁷ выбран из C₃-C₁₈-алкила или C₃-C₁₈-алкенила, имеющего одну двойную связь C=C; и -C(NH)-NH₂;

где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (II), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионной группы формулы (II)

и где полимерный или олигомерный каркас полимера или олигомера содержит множество групп формулы (II) в качестве боковой цепи и/или концевой группы, обеспечены полимерным или олигомерным каркасом, выбранным из поли(аминокислот), содержащих множество звеньев глутаминовой или аспарагиновой кислоты, полиакриловой кислоты, полиметакриловой кислоты, сополимера этилакрилата и акриловой кислоты и сополимера метилметакрилата и метакриловой кислоты;

б) олигомера или полимера, содержащего множество групп формулы (III) в виде повторяющихся звеньев



где переменные a, b, p, m, n и R²-R⁵ независимо друг от друга имеют указанные ниже значения для каждой группы формулы (III) во множестве указанных групп:

a обозначает 1 и b обозначает целое число от 2 до 4; или a обозначает целое число от 2 до 4 и b обо-

значает 1,

p обозначает 1 или 2,

m обозначает 1 или 2;

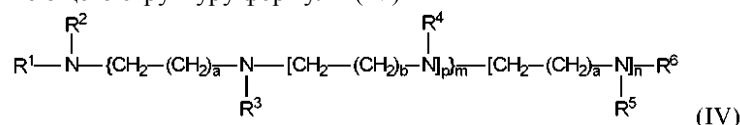
n обозначает 0 или 1 и

$$m+n \geq 2;$$

R^2-R^5 , каждый независимо друг от друга, выбран из водорода; группы $-CH_2-CH(OH)-R^7$, $-CH(R^7)-CH_2-OH$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-O-R^7$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-NH-R^7$ или $-CH_2-R^7$, где R^7 выбран из C_3-C_{18} -алкила или C_3-C_{18} -алкенила, имеющего одну двойную связь $C-C$; и $-C(NH)-NH_2$;

и где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (III), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионной группы формулы (III); и

в) липидоида, имеющего структуру формулы (IV)



в которой переменные a, b, p, m, n и R^1-R^6 имеют указанные ниже значения:

а обозначает 1 и b обозначает целое число от 2 до 4; или a обозначает целое число от 2 до 4 и b обозначает 1,

p обозначает 1 или 2,

m обозначает 1 или 2;

n обозначает 0 или 1 и

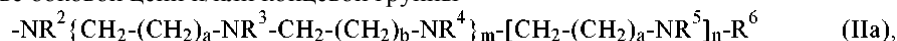
$$m+n \geq 2:$$

R^1-R^6 , каждый независимо друг от друга, выбран из водорода; группы $-CH_2-CH(OH)-R^7$, $-CH(R^7)-CH_2-OH$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-O-R^7$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-NH-R^7$ или $-CH_2-R^7$, где R^7 выбран из C_3-C_{18} -алкила или C_3-C_{18} -алкенила, имеющего одну двойную связь $C-C$; и $-C(NH)-NH_2$; при условии, что по меньшей мере два остатка из R^1-R^6 обозначают группу $-CH_2-CH(OH)-R^7$, $-CH(R^7)-CH_2-OH$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-O-R^7$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-NH-R^7$ или $-CH_2-R^7$, где R^7 выбран из C_3-C_{18} -алкила или C_3-C_{18} -алкенила, имеющего одну двойную связь $C-C$;

и где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (IV), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионного липидоида формулы (IV).

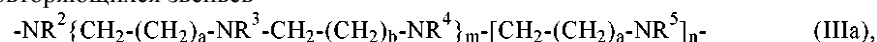
2. Композиция по п.1, содержащая одноцепочечную РНК и компонент, который содержит олиго(алкиленамин), выбранный из компонентов а) и б), где

компонент а) представляет собой олигомер или полимер, содержащий множество групп формулы (Па) в качестве боковой цепи и/или концевой группы



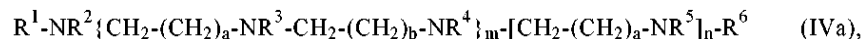
где а, b, m, n и R²-R⁶ имеют значения, указанные в п.1, и где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (Па), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионной олигомерной или полимерной структуры; и

компонент б) представляет собой олигомер или полимер, содержащий множество групп формулы (IIIa) в виде повторяющихся звеньев



где а, b, m, n и R²-R⁵ имеют значения, указанные в п.1, и где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (Ша), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионной олигомерной или полимерной структуры.

3. Композиция по п.1, содержащая одноцепочечную РНК и липидоид, имеющий структуру формулы (IVa)



где а, b, m, n и R¹-R⁶ имеют значения, указанные в п.1, и где один или несколько атомов азота, указанный(ых) в формуле (IVa), может(гут) быть протонированным(и) с образованием катионного липидоида.

4. Композиция по одному из пп.1-3, в которой в формуле (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV) или (IVa) n обозначает 1.

5. Композиция по одному из пп.1-3, в которой в формуле (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV) или (IVa) m обозначает 1 и n обозначает 1.

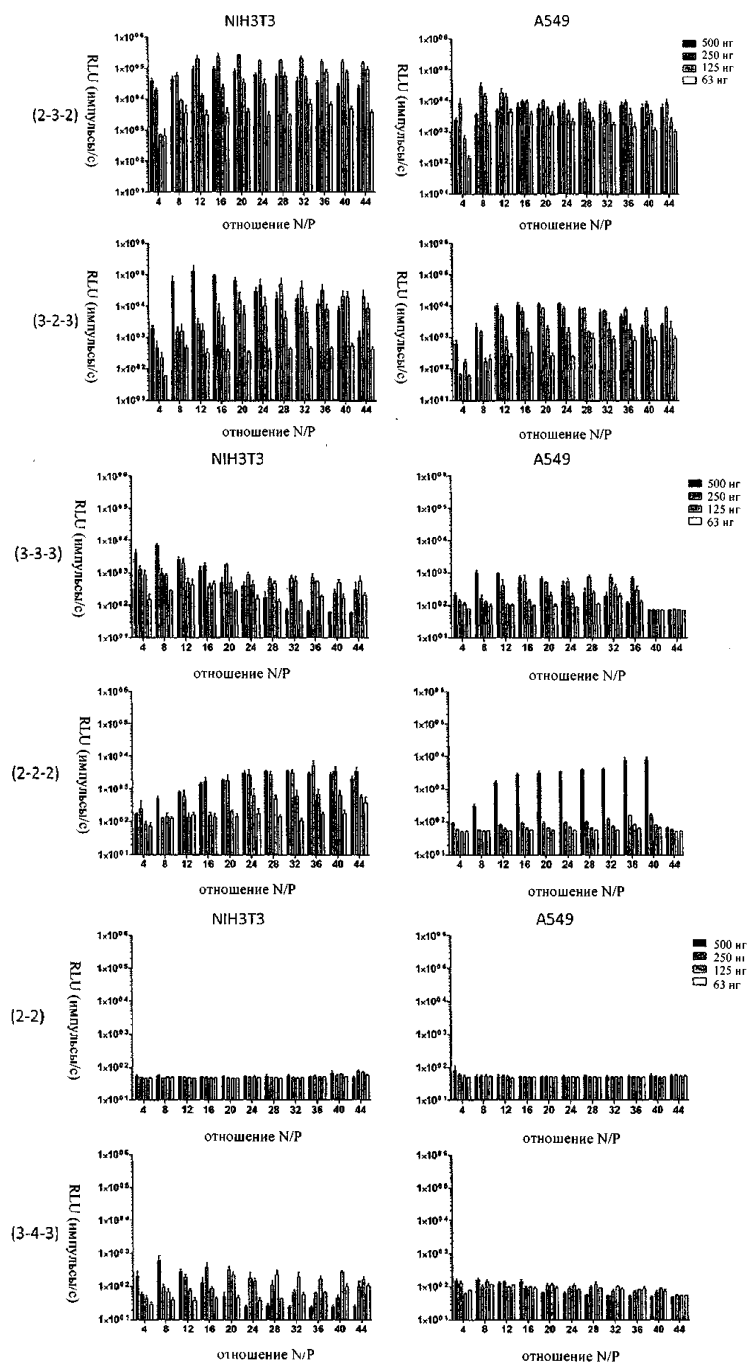
6. Композиция по одному из пп.1-5, в которой в формуле (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV) или (IVa) а обозначает 1 и b обозначает 2 или а обозначает 2 и b обозначает 1.

7. Композиция по одному из пп.1-6, в которой липидоид представляет собой катионный липидоид и в которой катионный липидоид образует комплекс с одноцепочечной РНК.

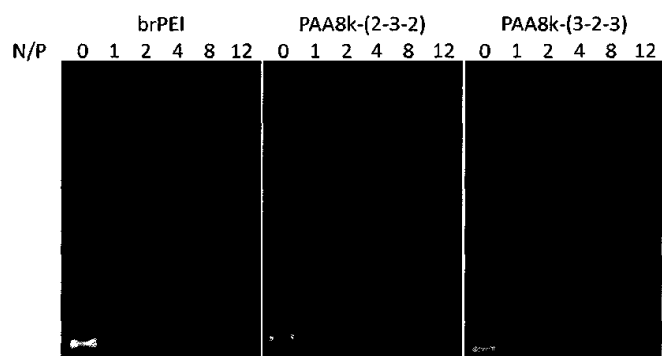
8. Композиция по одному из пп.1-7, которая находится в лиофилизированной форме.

9. Композиция по п.8, которая дополнительно содержит лиопротектор.

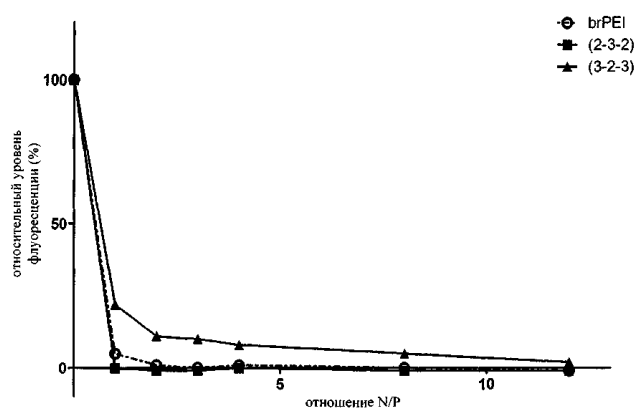
10. Композиция по п.9, в которой лиопротектор представляет собой трегалозу.
11. Композиция по одному из пп.1-10, в которой одноцепочечная РНК представляет собой мРНК.
12. Композиция по одному из пп.1-11 для применения в генной терапии.
13. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию по одному из пп.1-11.
14. Применение композиции по одному из пп.1-11 для введения РНК в клетку.
15. Способ введения РНК в клетку- или ткань-мишень, заключающийся в том, что осуществляют стадию, на которой приводят в контакт композицию по одному из пп.1-11 с клеткой- или тканью-мишенью.



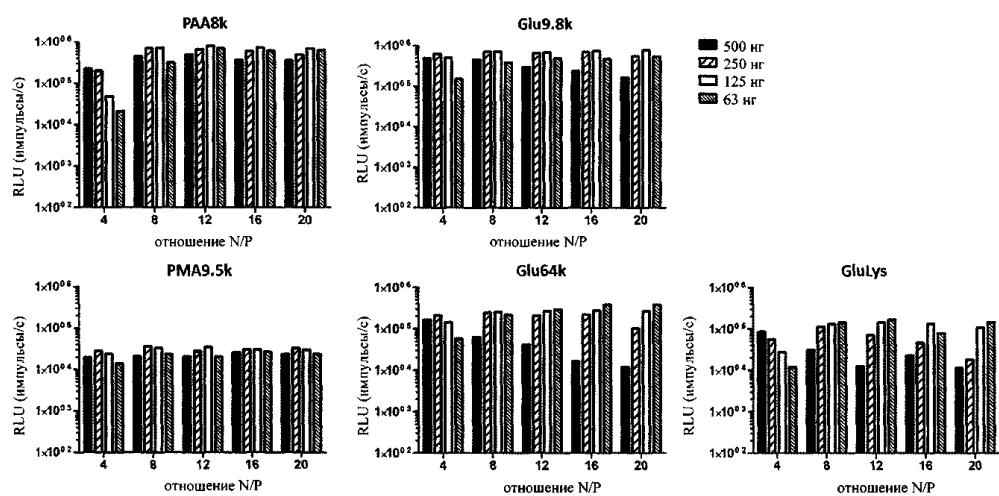
Фиг. 1



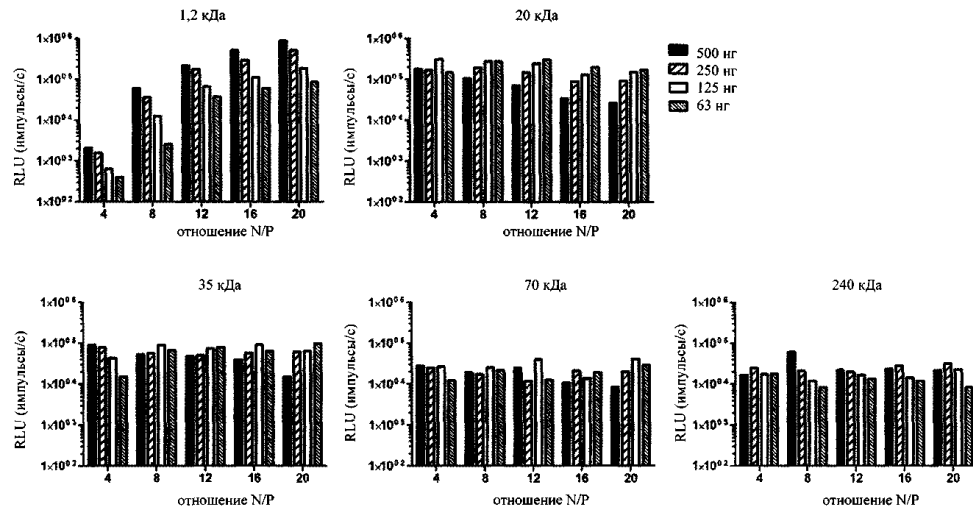
Фиг. 2



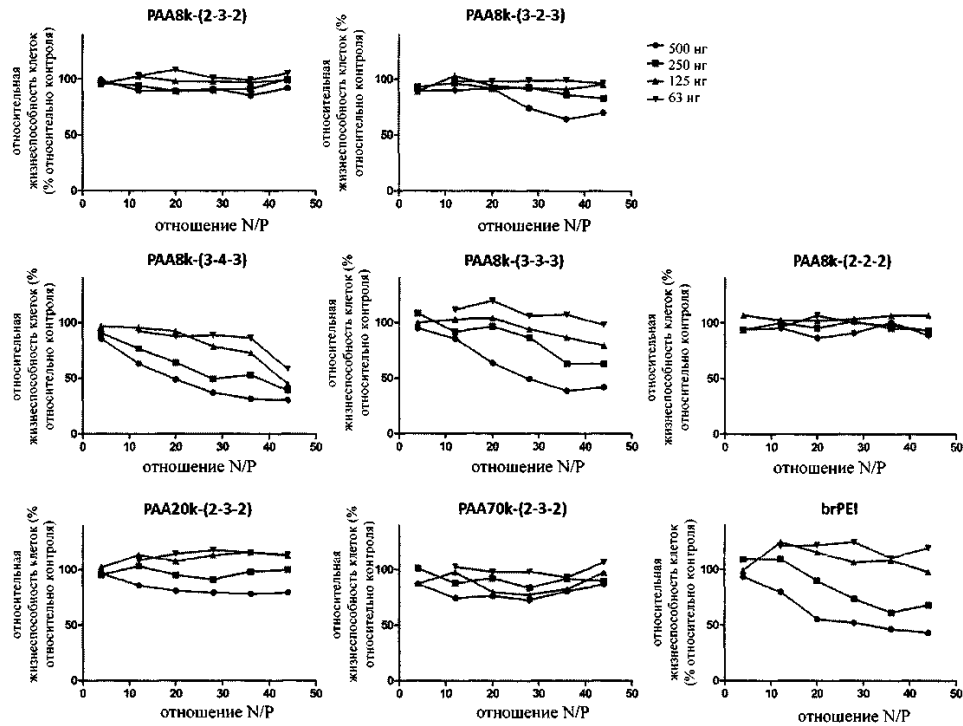
Фиг. 3



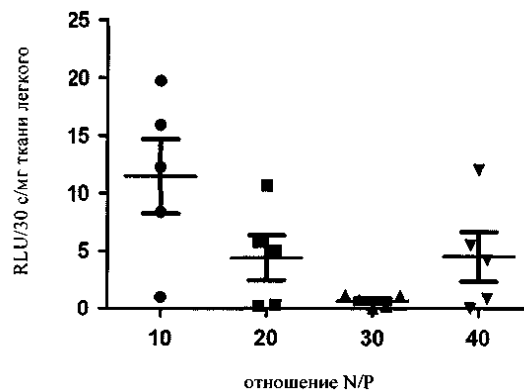
Фиг. 4



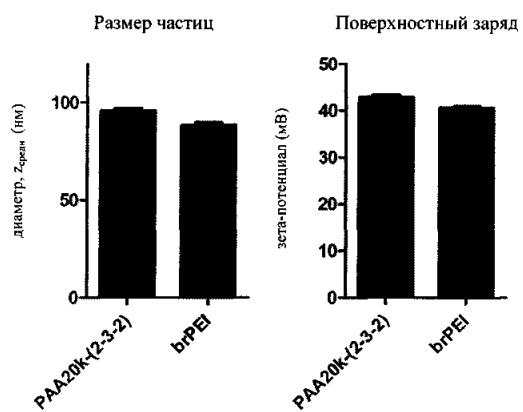
Фиг. 5



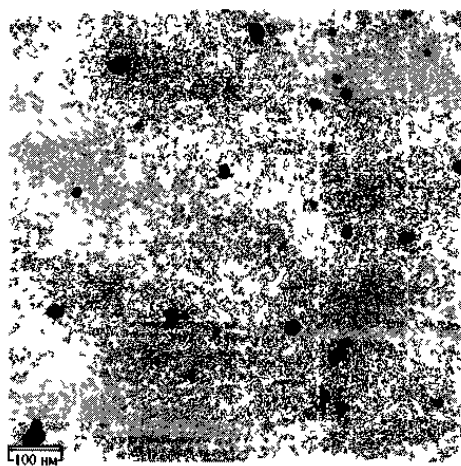
Фиг. 6



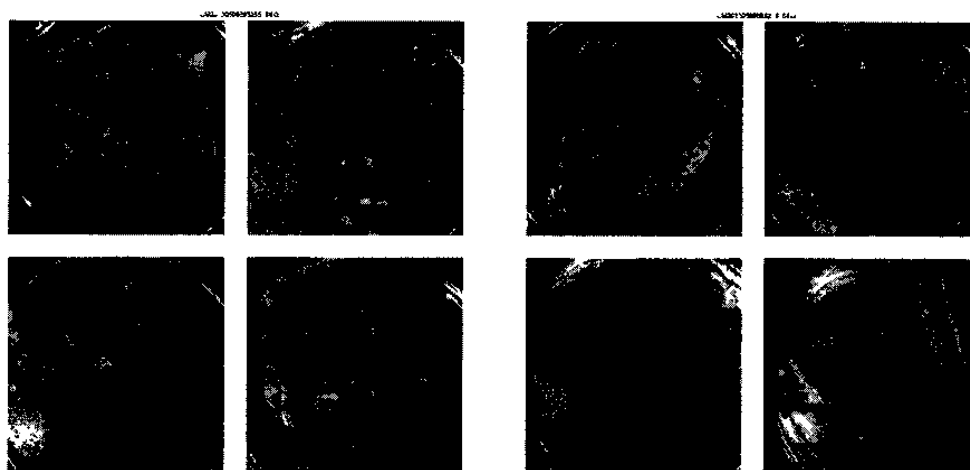
Фиг. 7



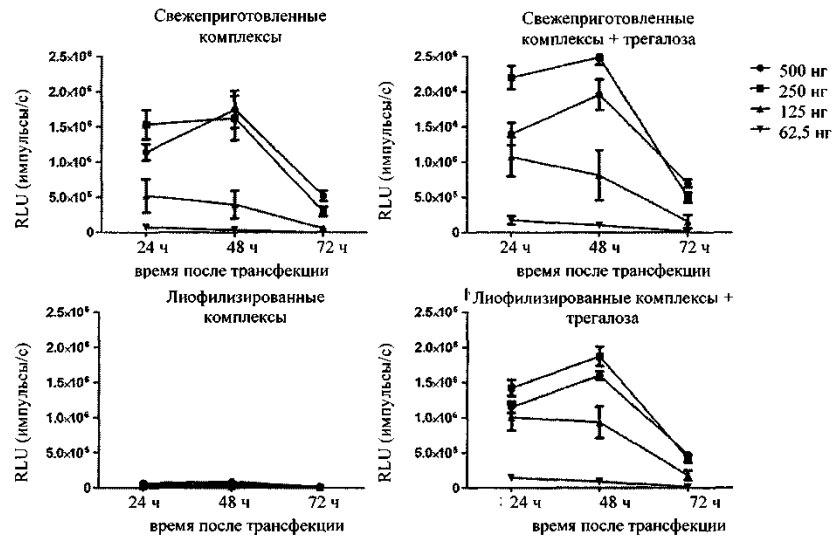
Фиг. 8



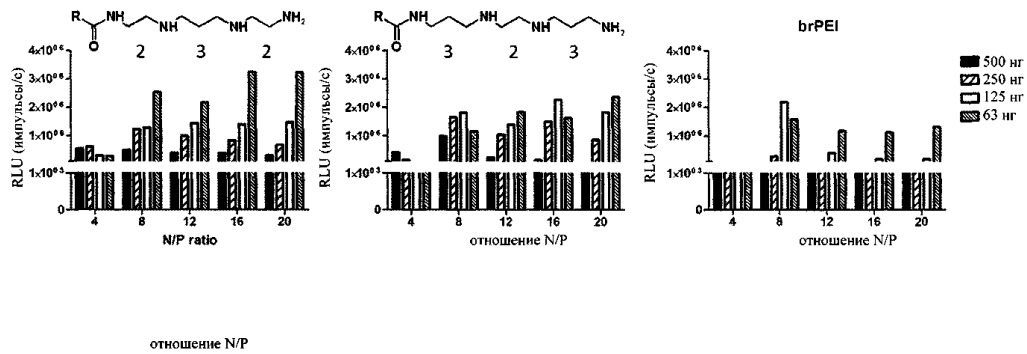
Фиг. 9



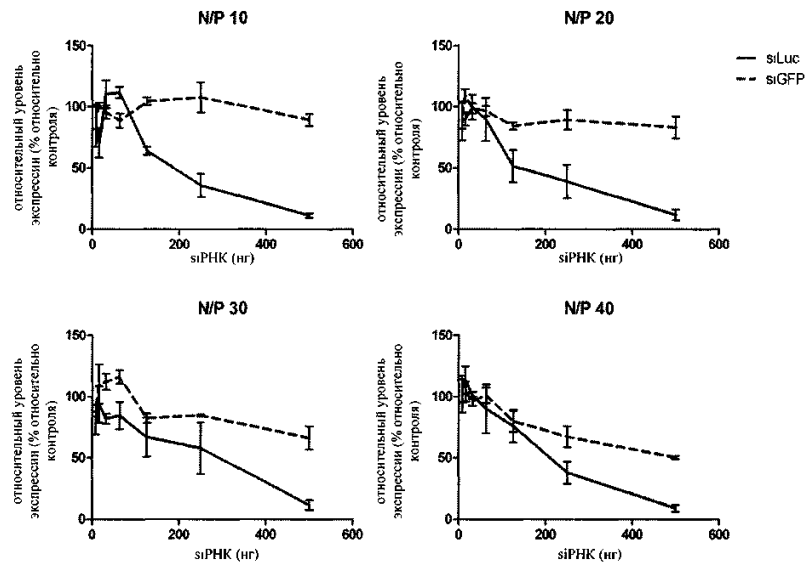
Фиг. 10



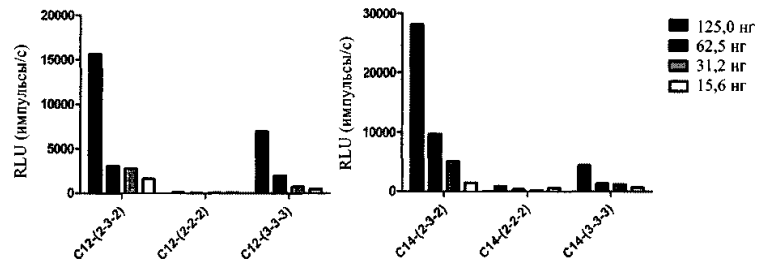
Фиг. 11



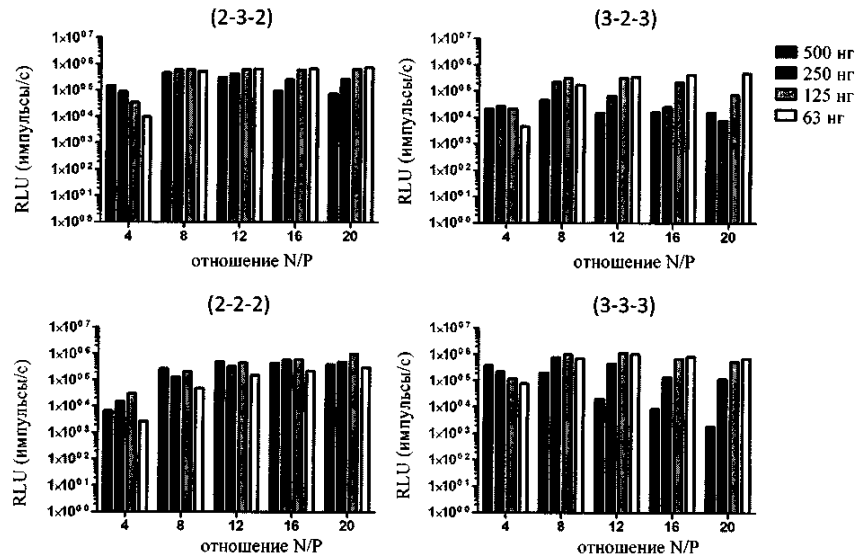
Фиг. 12



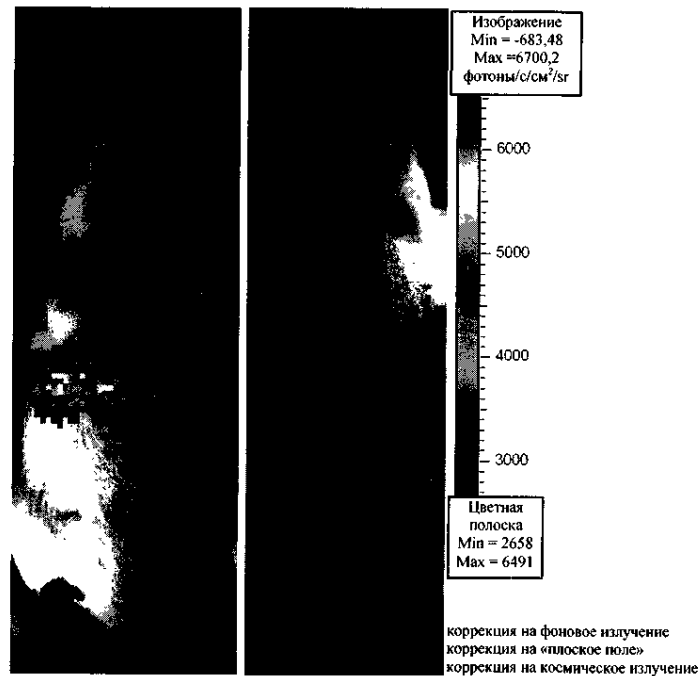
Фиг. 13



Фиг. 14

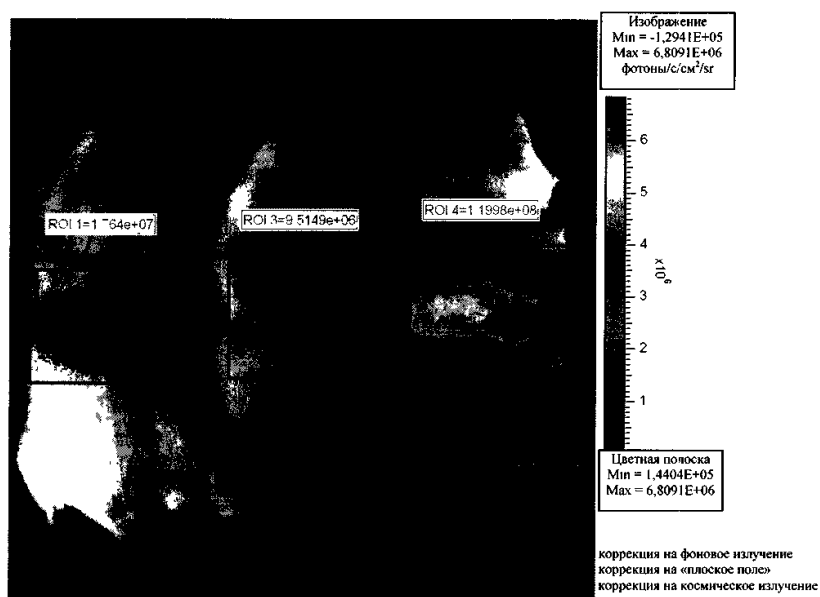


Фиг. 15

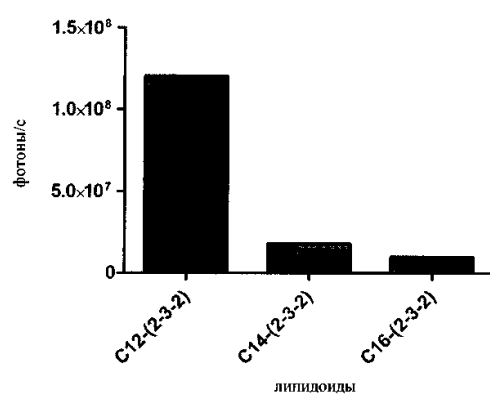


Фиг. 16

А.

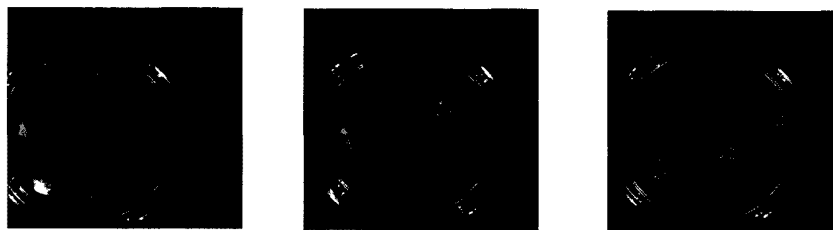


Б.

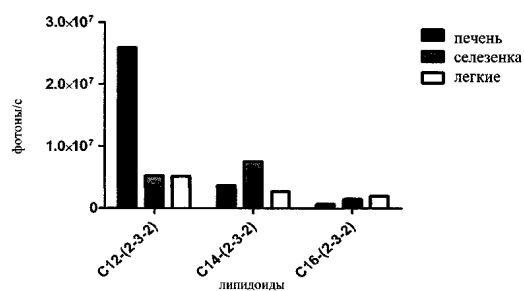


Фиг. 17

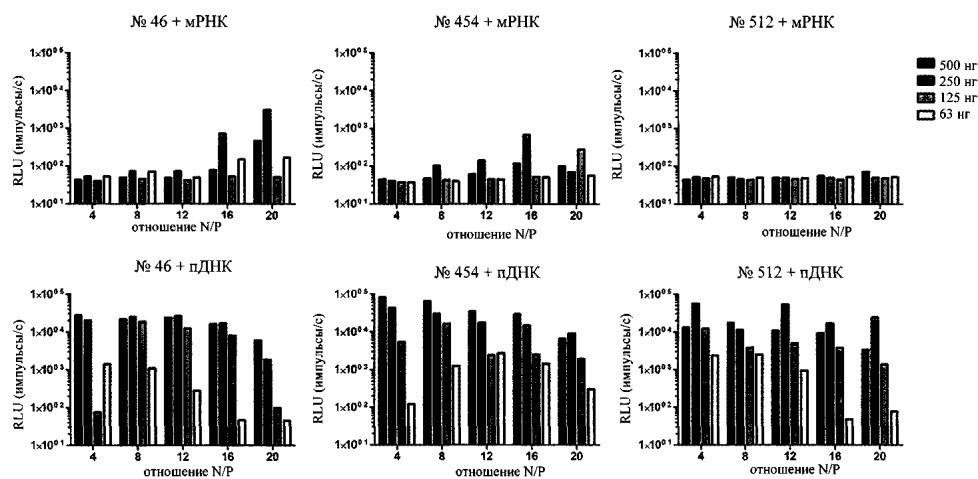
А.



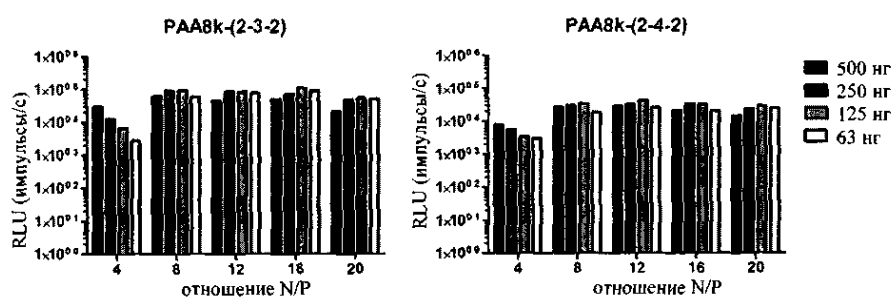
Б.



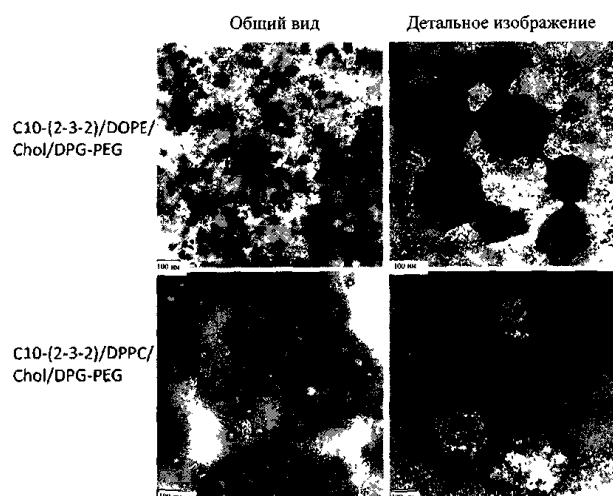
Фиг. 18



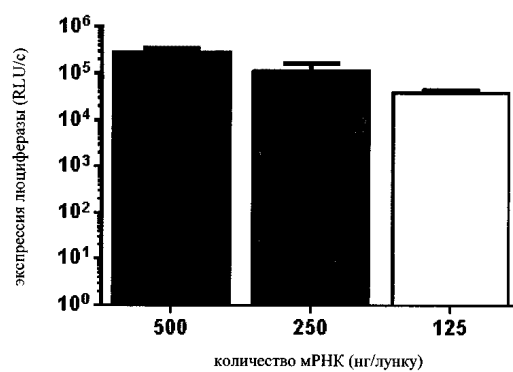
Фиг. 19



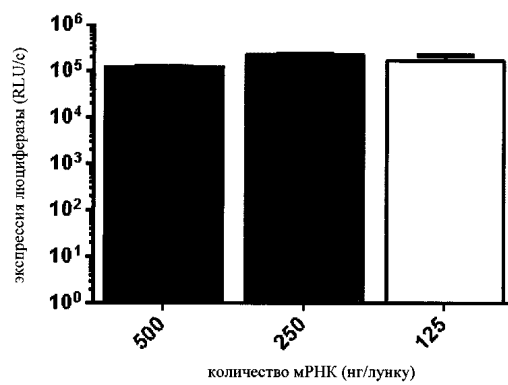
Фиг. 20



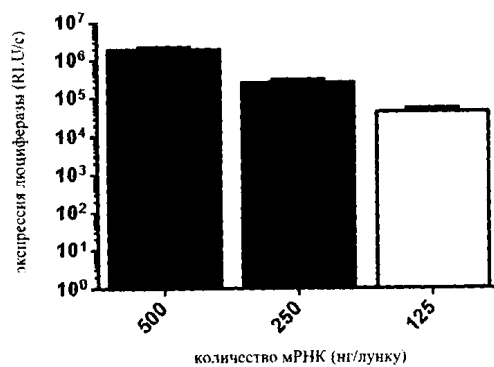
Фиг. 21



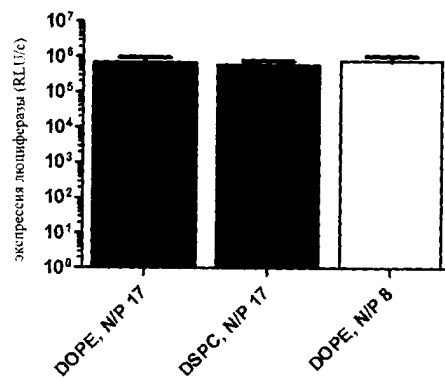
Фиг. 22



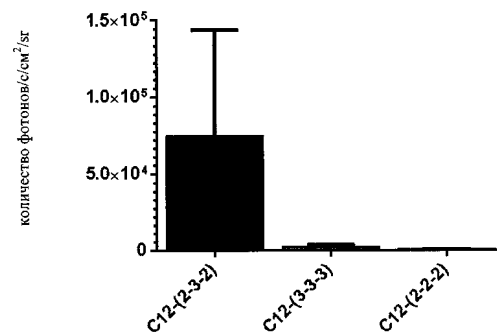
Фиг. 23



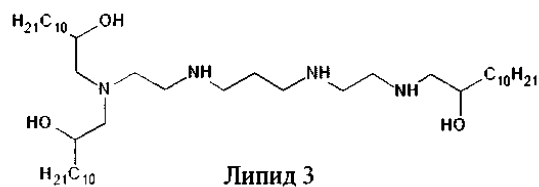
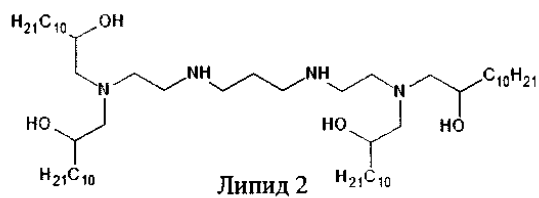
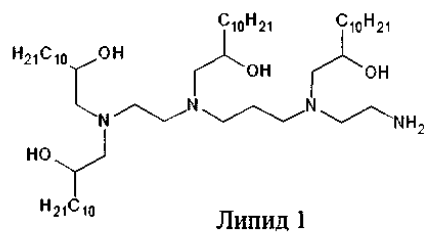
Фиг. 24



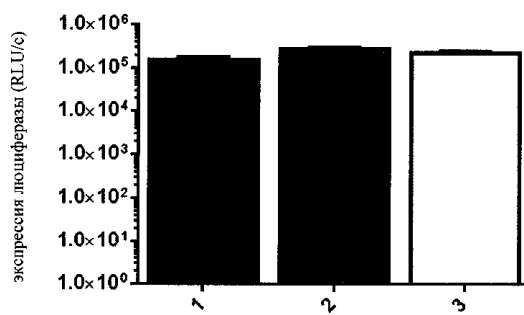
Фиг. 25



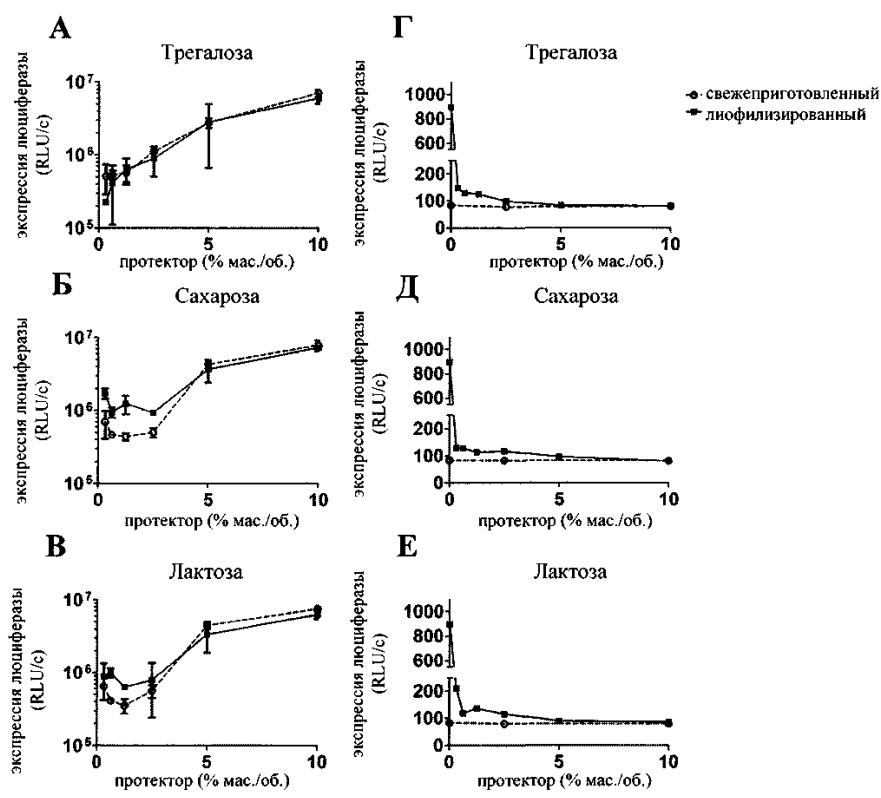
Фиг. 26



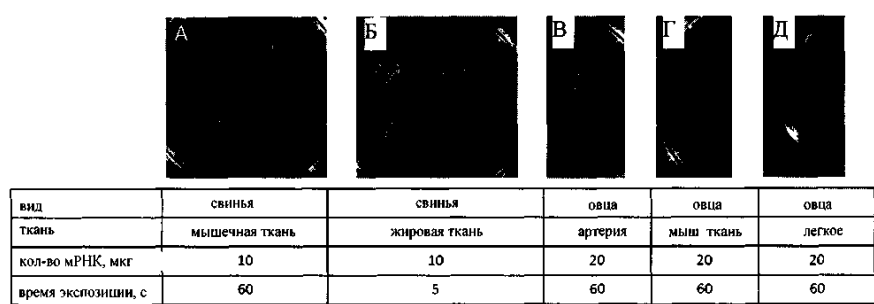
Фиг. 27А



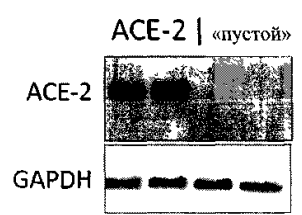
Фиг. 27Б



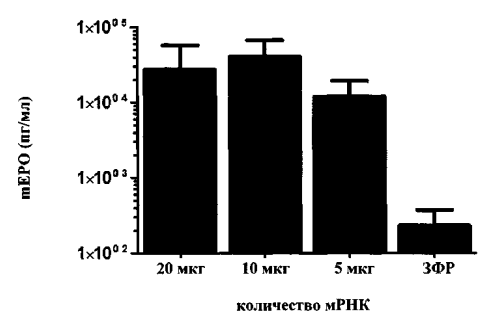
Фиг. 28



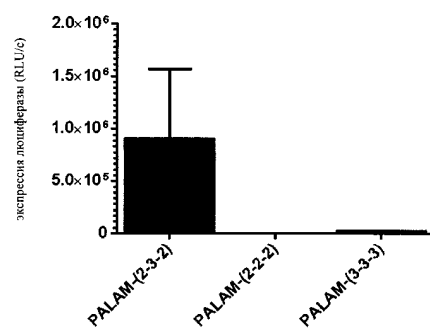
Фиг. 29



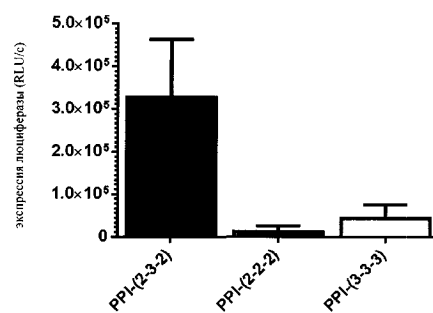
Фиг. 30



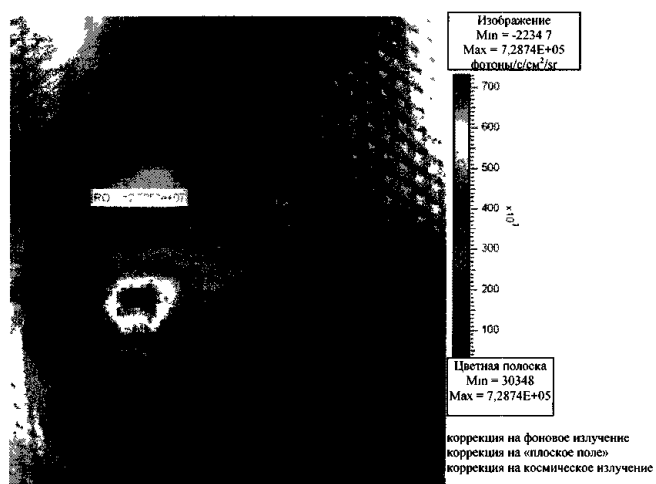
Фиг. 31



Фиг. 32



Фиг. 33



Фиг. 34



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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