

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036949**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2021.01.19**

(21) Номер заявки  
**201792101**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.05.27**

(51) Int. Cl. *A61K 38/07* (2006.01)  
*C07K 1/06* (2006.01)  
*C07K 5/10* (2006.01)  
*C07K 5/107* (2006.01)

---

(54) **БИОЛОГИЧЕСКИ РАСЩЕПЛЯЕМЫЕ ТЕТРАПЕПТИДНЫЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ АГЕНТЫ**

---

(31) **62/168,244; 62/235,833**

(32) **2015.05.29; 2015.10.01**

(33) **US**

(43) **2018.06.29**

(86) **PCT/US2016/034517**

(87) **WO 2016/196243 2016.12.08**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЭРРОУХЭД ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,  
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Карлсон Джеффри С., Блохин  
Андрей В. (US)**

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

(56) US-A1-20080214648  
US-B1-6214345  
WO-A1-2000047608  
WO-A1-2009117531  
US-B1-7589170

---

(57) Описаны тетрапептидные линкеры для обратимого присоединения первого соединения к аминоксодержащему второму соединению. Также описаны соединения, содержащие тетрапептидные линкеры, и способы применения тетрапептидных линкеров.

**B1**

**036949**

**036949**  
**B1**

### Уровень техники

Физиологически лабильные линкеры или модификаторы являются подходящими для множества процессов, включая доставку терапевтических лекарственных средств. Практическая ценность линкера или модификатора может быть дополнительно усилена, если в результате расщепления линкера образуется по меньшей мере один из исходных компонентов в немодифицированном состоянии, не содержащий малейшего количества линкера или модификатора.

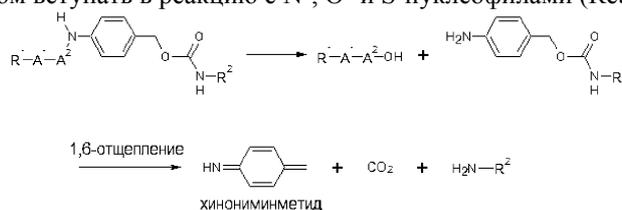
В клинических и доклинических условиях было исследовано несколько стратегий обратимого связывания или модификации соединения. Такие обратимые конъюгаты применяют для уменьшения токсичных эффектов и улучшения фармакологических свойств соединения. Для того чтобы являться эффективным, обратимый конъюгат должен оставаться стабильным в сосудистом русле и при этом обеспечивать высвобождение соединения после взаимодействия конъюгата с клеткой-мишенью. Кроме того расщепление линкера или модификатора должно происходить таким образом, при котором соединение может достичь своей биохимической мишени и эффективно с ней взаимодействовать. Часто необходимо высвобождение соединения в немодифицированном состоянии.

Примеры обратимых конъюгатов включают пролекарства - производные лекарственных средств, которые остаются неактивными в своей прототипной форме, но метаболизируются в организме с получением активных лекарственных средств, и носители, такие как конъюгаты антитела с лекарственным средством. Было показано, что образование обратимых конъюгатов является подходящим при разработке противоопухолевых химиотерапевтических лекарственных средств и при доставке нуклеотидов.

Rozema с соавт. (патент США 8137695) продемонстрировали обратимую модификацию полиаминов с применением диметилмалеиновых ангидридов, которые образуют рН-чувствительные малеамидные связи. Доставка модифицированного полимера в клетки и интернализация приводит к расщеплению малеамидной связи в условиях пониженного рН эндосом с регенерацией полимерных аминов.

Помимо рН-чувствительных связей были разработаны пептидсодержащие связи, которые активируются протеазами *in vivo*. Rozema с соавт. (патент США 8426554) предложили способ обратимой регуляции активности мембраноактивных полиаминов по разрушению мембран с применением стерических стабилизаторов или нацеливающих групп, конъюгированных с полимерными аминокислотными боковыми цепями посредством дипептидного спейсера *p*-амидобензил-карбамата (РАВС). Согласно опубликованному дизайну в присутствии протеолитических ферментов гидролиз анилидовой связи запускает каскад 1,6-отщепления, который приводит к получению немодифицированного поликатионного полимера с восстановленными мембранолитическими свойствами.

Применение саморасщепляющегося спейсера РАВС при разработке пролекарств впервые было предложено Carl с соавт. (1981). В данной стратегии объединяют расщепление ковалентной анилидовой связи со спонтанным высвобождением целевого субстрата. Спейсеры РАВС интенсивно исследовали в отношении контролируемого высвобождения лекарственного средства из терапевтического агента, в особенности, в случае противораковой терапии (Dorywalska et al., 2015, Zhang et al., 2014, Florent et al., 1998, Toki et al., 2002, Shamis et al., 2004, Amir et al., 2005, Amir et al., 2005, Gopin et al., 2006, Zhang et al., 2013, Zhang et al., 2013). Однако существует опасение, что аза-хинонметид, также известный как хинониминметид (QIM), образующийся в процессе отщепления РАВС, может являться источником токсичности в связи с его свойством вступать в реакцию с N-, O- и S-нуклеофилами (Reboud-Ravaux et al., 2009).



Были описаны определенные пептидные пролекарства, поддающиеся протеолизу, в которых отсутствует спейсер РАВС (Zhong et al., 2013, Cho KY et al., 2012). Однако ограничение ранее описанных пептидных пролекарств, поддающихся протеолизу, заключается в том, что компонент родительского лекарственного средства, который представляет собой первичный амин, не высвобождается из данных пролекарств со скоростью, сравнимой с таковой аналогов на основе саморасщепляющегося РАВС. Отщепление C-концевого аминокислотного остатка эндопептидазами в течение протеолиза пролекарства, как представляется, является стадией, лимитирующей скорость реакции (Masquelier et al. 1980, Schmid et al., 2007, Schmid et al., 2007, Elsadek et al., 2010, Trouet et al., 1982).

### Краткое описание изобретения

В настоящей заявке описаны тетрапептидные линкеры для обратимого присоединения первого соединения к аминокислотному второму соединению. Физиологически расщепляемые линкеры содержат тетрапептид, имеющий общую формулу:  $-A^4-A^3-A^2-A^1-$ , где  $A^4$  представляет собой гидрофобную L-аминокислоту,  $A^3$  представляет собой гидрофильную L-аминокислоту,  $A^2$  представляет собой гидрофобную L-аминокислоту, и  $A^1$  представляет собой L-пролин, L-лейцин или L-N-метилаланин. Тетрапептидные линкеры расщепляются (перерабатываются) протеолитическими ферментами, такими как эндоген-

ные протеазы, присутствующие в организме, в особенности, млекопитающего, в ткани, клетке или внутриклеточном компартменте или органелле. Кроме того протеолитические ферменты легко и быстро расщепляют пептидную связь с С-концевой стороны  $A^1$  с высвобождением аминокислотного второго соединения. Также описаны композиции, содержащие описанные тетрапептидные линкеры, и способы применения тетрапептидов для обратимого присоединения двух фрагментов или обратимой модификации амина или аминокислотного соединения. Описанные обратимые линкеры и модификаторы обеспечивают возможность модификации, стабильной в сыворотке, и могут расщепляться *in vivo*.

В настоящей заявке описаны тетрапептидные связывающие агенты, содержащие:  $R^5$ - $A^4$ - $A^3$ - $A^2$ - $A^1$ - $R^7$ , где  $R^5$  содержит первое соединение,  $A^4$  представляет собой гидрофобную L-аминокислоту,  $A^3$  представляет собой гидрофильную L-аминокислоту,  $A^2$  представляет собой гидрофобную L-аминокислоту, и  $A^1$  представляет собой L-пролин, L-лейцин или L-N-метилаланин, и  $R^7$  представляет собой аминокислотную группу.  $R^7$  выбирают таким образом, что в результате реакции с амином или аминокислотным соединением образуется амидная связь с  $A^1$ . Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^3$  представляет собой полярную незаряженную L-аминокислоту. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения тетрапептидные связывающие агенты можно использовать для обратимого присоединения первого соединения к аминокислотному соединению. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения тетрапептидные связывающие агенты можно использовать для обратимой модификации аминокислотного соединения. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения тетрапептидные связывающие агенты можно использовать для обратимой модификации полиамина. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиамин представляет собой мембраноактивный полиамин.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения авторы настоящего изобретения описали композиции, содержащие первое соединение, присоединенное ко второму соединению посредством тетрапептидного связывающего агента, причем тетрапептидный связывающий агент состоит из  $A^4A^3A^2A^1$ , где  $A^4$  представляет собой гидрофобную L-аминокислоту,  $A^3$  представляет собой гидрофильную L-аминокислоту,  $A^2$  представляет собой гидрофобную L-аминокислоту,  $A^1$  представляет собой L-пролин, L-лейцин или L-N-метилаланин, и  $A^1$  присоединен ко второму соединению посредством амидной связи. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^3$  представляет собой полярную незаряженную L-аминокислоту. Расщепление (переработка) тетрапептида протеолитическими ферментами *in vitro* или *in vivo* приводит к расщеплению между  $A^1$  и вторым соединением с высвобождением второго соединения. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^4A^3A^2A^1$  содержит последовательность: FCitFP (SEQ ID NO: 12), VCitFP (SEQ ID NO: 19), ACitFP (SEQ ID NO: 3), FKFP (SEQ ID NO: 16), FCitVP (SEQ ID NO: 13), FCitFL (SEQ ID NO: 11), FCitF(Nme)A (SEQ ID NO: 9) или FCitAP (SEQ ID NO: 8), где F представляет собой L-фенилаланин, Cit представляет собой L-цитруллин, P представляет собой L-пролин, V представляет собой L-валин, A представляет собой L-аланин, K представляет собой L-лизин, L представляет собой L-лейцин, (Nme)A представляет собой L-N-метилаланин.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения описаны композиции, содержащие обратимо модифицированные полиамины. Полиамины модифицированы посредством обратимой модификации множества аминов в полиамине описанными в настоящей заявке тетрапептидными связывающими агентами. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиамин представляет собой амфипатический мембраноактивный полиамин. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиция дополнительно содержит триггер РНКи. Полиамин может быть присоединен к триггеру РНКи ковалентным способом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связь для ковалентного присоединения полиамина к триггеру РНКи включает физиологически лабильную связь, такую как дисульфидная связь. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиамин не присоединен к триггеру РНКи ковалентным способом, и триггер РНКи присоединен ковалентным способом к нацеливающей группе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения описаны способы присоединения первого соединения к аминокислотному второму соединению, причем указанные способы включают: присоединение первого соединения к аминокислотному тетрапептиду и образование амидной связи между карбоксиконцом тетрапептида и аминокислотным вторым соединением, причем тетрапептид содержит аминокислотную последовательность  $A^4A^3A^2A^1$ , где  $A^4$  представляет собой гидрофобную L-аминокислоту,  $A^3$  представляет собой гидрофильную L-аминокислоту,  $A^2$  представляет собой гидрофобную L-аминокислоту, и  $A^1$  представляет собой L-пролин, L-лейцин или L-N-метилаланин. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^4$  представляет собой фенилаланин. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^3$  представляет собой полярную незаряженную L-аминокислоту. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полярная незаряженная аминокислота представляет собой L-цитруллин. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^2$  представляет собой фенилаланин. Согласно некоторым вариантам реализа-

ции настоящего изобретения A<sup>1</sup> представляет собой пролин.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения тетрапептидный линкер или связывающий агент содержит последовательность из четырех аминокислот, которая выбрана из группы, состоящей из: FCitFP (SEQ ID NO: 12), VCitFP (SEQ ID NO: 19), ACitFP (SEQ ID NO: 3), FKFP (SEQ ID NO: 16), FCitVP (SEQ ID NO: 13), FCitFL (SEQ ID NO: 11), FCitF(Nme)A (SEQ ID NO: 9), FCitAP (SEQ ID NO: 8), где F представляет собой L-фенилаланин, Cit представляет собой L-цитруллин, P представляет собой L-пролин, V представляет собой L-валин, A представляет собой L-аланин, K представляет собой L-лизин, L представляет собой L-лейцин, (Nme)A представляет собой L-N-метилаланин.

В настоящей заявке описано применение тетрапептида фенилаланин-цитруллин-фенилаланин-пролин (FCitFP (SEQ ID NO: 12)) для получения физиологически расщепляемого линкера. Линкер FCitFP быстро расщепляется протеолитическими ферментами в организме млекопитающего, ткани млекопитающего, клетке млекопитающего или внутриклеточном компартменте или органелле млекопитающего. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотное соединение присоединено к пролину посредством амидной связи. С-концевая амидная связь пролина эффективно расщепляется протеазами *in vivo* с высвобождением аминокислотного соединения.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения первое соединение может быть выбрано из группы, состоящей из: нацеливающей группы, лиганда рецептора клетки, лиганда интегрина, лиганда RGD, миметика RGD, лиганда асиалогликопротеинового рецептора (ASGPr), галактозы, производного галактозы, N-ацетилгалактозамина, фолата, стерического стабилизатора, полиэтиленгликоля (PEG), полинуклеотида, полимера, полиамина, антитела, лекарственного средства, гаптена, дигоксигенина, витамина, биотина, флуорофора, антитела, моноклонального антитела и фрагмента антитела.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотное второе соединение может быть выбрано из группы, состоящей из: нацеливающей группы, лиганда рецептора клетки, лиганда интегрина, лиганда RGD, миметика RGD, лиганда асиалогликопротеинового рецептора (ASGPr), галактозы, производного галактозы, N-ацетилгалактозамина, фолата, стерического стабилизатора, полиэтиленгликоля (PEG), полинуклеотида, полимера, полиамина, антитела, лекарственного средства, гаптена, дигоксигенина, витамина, биотина, антитела, моноклонального антитела и фрагмента антитела.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения описаны композиции для доставки триггера РНКи в клетку *in vivo*.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Структуры некоторых компонентов, использованных для получения или исследования описанных тетрапептидных линкеров.

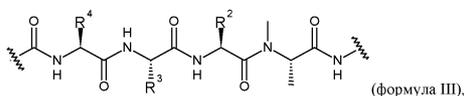
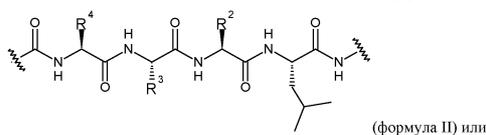
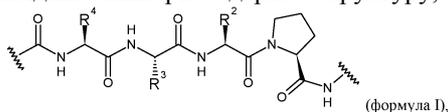
Фиг. 2. График, иллюстрирующий: А) скорость ферментативного расщепления соединения 39 и В) скорость ферментативного расщепления соединения 29.

Фиг. 3. График, иллюстрирующий кинетику реакции для соединений 29 и 39, скорости образования промежуточных продуктов (%) в течение времени (ч) (С=цитруллин).

#### Подробное описание изобретения

Описаны тетрапептидные линкеры и тетрапептидные связывающие агенты, подходящие для обратимого присоединения первого соединения к аминокислотному второму соединению и/или для обратимой модификации аминокислотного второго соединения. Описанные тетрапептидные линкеры демонстрируют улучшенную кинетику расщепления по сравнению с ранее описанными пептидными линкерами, использованными для доставки пролекарств (Rejmanova et al., 1983, Malugin et al., 2007, Miller et al., 2009, Soler et al., 2015, Chu et al., 2012). Тетрапептидные линкеры являются стабильными в отношении гидролиза при отсутствии протеолитических ферментов. В присутствии протеолитических ферментов (также называемых протеиназами, протеазами или пептидазами) тетрапептид легко расщепляется *in vitro* или *in vivo*. Более конкретно, описанные тетрапептидные линкеры и тетрапептидные связывающие агенты быстро расщепляются между карбоксиконцевой аминокислотой тетрапептида и аминокислотным вторым соединением с высвобождением аминокислотного второго соединения.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения описаны тетрапептидные линкеры, причем указанные тетрапептидные линкеры содержат структуру, представленную формулой:



где

$R^4$  представляет собой R-группу (боковую цепь) природной, неприродной изомерной или синтетической гидрофобной L-аминокислоты, индекс гидрофобности (Monera et al., J. Protein Sci. 1995, 1, 319) которой при pH 7 составляет 41 или более, нормированный к глицину, поскольку таковой относится к составу боковой цепи аминокислоты (R-группы),

$R^3$  представляет собой R-группу (боковую цепь) незаряженной гидрофильной или основной гидрофильной L-аминокислоты, индекс гидрофобности (Monera et al., J. Protein Sci. 1995, 1, 319) которой при pH 7 составляет -28 или менее, нормированный к глицину, поскольку таковой относится к составу боковой цепи аминокислоты (R-группы), и

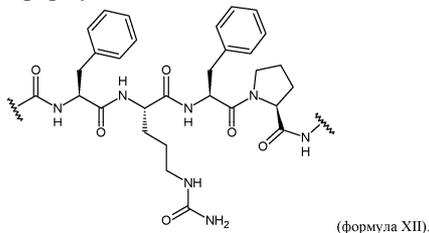
$R^2$  представляет собой R-группу (боковую цепь) природной, неприродной изомерной или синтетической гидрофобной L-аминокислоты, индекс гидрофобности (Monera et al., J. Protein Sci. 1995, 1, 319) которой при pH 7 составляет 41 или более, нормированный к глицину, поскольку таковой относится к составу боковой цепи аминокислоты (R-группы).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $R^2$  и  $R^4$  независимо выбраны из группы, состоящей из:  $-CH_3$ ,  $-CH(CH_3)_2$ ,  $-CH_2CH(CH_3)_2$ ,  $-CH(CH_3)CH_2CH_3$  и  $-CH_2C_6H_6$  (фенилаланин).

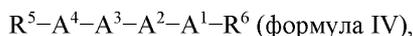
Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $R^3$  выбран из группы, состоящей из:  $-(CH_2)_3NHC(=O)NH_2$ ,  $-CH_2CONH_2$ ,  $-(CH_2)_4NH_3^+$  и  $-(CH_2)_3-NH-C(=NH)-NH_2$ . Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $R^3$  представляет собой  $-(CH_2)_3NHC(=O)NH_2$ .

После воздействия протеаз *in vivo*, например, в лизосоме, C-концевая амидная связь тетрапептида быстро расщепляется (перерабатывается).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения тетрапептидные линкеры содержат структуру, представленную формулой:



Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения описаны биологически лабильные соединения, причем указанные биологически лабильные соединения содержат первое соединение, присоединенное к аминокислотному второму соединению посредством тетрапептидного линкера, содержащего:



где

$R^5$  представляет собой первое соединение,

$R^6$  представляет собой аминокислотное второе соединение,

$A^4$  представляет собой природную, неприродную изомерную или синтетическую гидрофобную L-аминокислоту, индекс гидрофобности (Monera et al., J. Protein Sci. 1995, 1, 319) которой при pH 7 составляет 41 или более, нормированный к глицину, поскольку таковой относится к составу боковой цепи аминокислоты (R-группы),

$A^3$  представляет собой незаряженную или основную гидрофильную L-аминокислоту, индекс гидрофобности (Monera et al., J. Protein Sci. 1995, 1, 319) которой при pH 7 составляет -28 или менее, нормированный к глицину, поскольку таковой относится к составу боковой цепи аминокислоты (R-группы),

$A^2$  представляет собой природную, неприродную изомерную или синтетическую гидрофобную L-аминокислоту, индекс гидрофобности (Monera et al., J. Protein Sci. 1995, 1, 319) которой при pH 7 составляет 41 или более, нормированный к глицину, поскольку таковой относится к составу боковой цепи аминокислоты (R-группы),

$A^1$  представляет собой L-пролин, L-лейцин или L-N-метилаланин, и

$A^1$  присоединен к  $R^6$  посредством амидной связи.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^1$  представляет собой L-пролин,  $A^2$  и  $A^4$  независимо представляют собой L-аланин, L-валин, L-лейцин, L-изолейцин или L-фенилаланин (боковые цепи  $-CH_3$ ,  $-CHCH_3$ ,  $-CH(CH_3)_2$ ,  $-CH_2CH(CH_3)_2$ ,  $-CH(CH_3)CH_2CH_3$  или  $-CH_2C_6H_6$ , соответственно), и  $A^3$  представляет собой L-цитруллин, L-аспарагин или L-лизин (боковые цепи  $-(CH_2)_3NHC(=O)NH_2$ ,  $-CH_2CONH_2$ ,  $-(CH_2)_4NH_3^+$  или  $-(CH_2)_3-NH-C(=NH)-NH_2$ , соответственно).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^1$  представляет собой L-пролин,  $A^2$  и  $A^4$  представляют собой L-фенилаланин, и  $A^3$  представляет собой L-цитруллин (FCitFP (SEQ ID NO: 12)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^1$  представляет собой L-пролин,  $A^2$  представляет собой L-фенилаланин,  $A^3$  представляет собой L-лизин, и  $A^4$  представляет собой L-фенилаланин (FKFP (SEQ ID NO: 16)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^1$  представляет собой L-пролин,  $A^2$  представляет собой L-валин,  $A^3$  представляет собой L-цитруллин, и  $A^4$  представляет собой L-фенилаланин (FCitVP (SEQ ID NO: 13)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^1$  представляет собой L-пролин,  $A^2$  представляет собой L-фенилаланин,  $A^3$  представляет собой L-цитруллин, и  $A^4$  представляет собой L-валин (VCitFP (SEQ ID NO: 19)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^1$  представляет собой L-пролин,  $A^2$  представляет собой L-аланин,  $A^3$  представляет собой L-цитруллин, и  $A^4$  представляет собой L-фенилаланин (FCitAP (SEQ ID NO: 8)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^1$  представляет собой L-пролин,  $A^2$  представляет собой L-фенилаланин,  $A^3$  представляет собой L-цитруллин, и  $A^4$  представляет собой L-аланин (ACitFP (SEQ ID NO: 3)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^1$  представляет собой лейцин,  $A^2$  и  $A^4$  независимо представляют собой L-аланин, L-валин, L-лейцин, L-изолейцин или L-фенилаланин (боковые цепи  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CHCH}_3$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$  или  $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ , соответственно), и  $A^3$  представляет собой L-цитруллин, L-аспарагин, или L-лизин, или L-аргинин (боковые цепи  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$  или  $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_3^+$ , соответственно).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^1$  представляет собой L-лейцин,  $A^2$  представляет собой L-фенилаланин,  $A^3$  представляет собой L-цитруллин, и  $A^4$  представляет собой L-фенилаланин (FCitFL (SEQ ID NO: 11)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^1$  представляет собой L-N-метилаланин,  $A^2$  и  $A^4$  независимо представляют собой L-аланин, L-валин, L-лейцин, L-изолейцин или L-фенилаланин (боковые цепи  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CHCH}_3$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$  или  $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ , соответственно), и  $A^3$  представляет собой L-цитруллин, L-аспарагин, L-лизин, L-аргинин (боковые цепи  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ , или  $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_3^+$ , или  $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_3^+$ , соответственно).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^1$  представляет собой L-N-метилаланин,  $A^2$  представляет собой L-фенилаланин,  $A^3$  представляет собой L-цитруллин, и  $A^4$  представляет собой L-фенилаланин (FCitF(Nme)A (SEQ ID NO: 9)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $R_5$  содержит соединение, которое выбрано из перечня, включающего стерический стабилизатор, PEG,  $\text{H}-(\text{CH}_2)_{0-2}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{1-500}-\text{O}$ ,  $-(\text{CH}_2)_{0-2}-$ ,  $\text{PEG}_{1-100}$ , нацеливающую группу, лиганд рецептора клетки, интегрин-связывающий лиганд, лиганд RGD, миметик RGD, лиганд асиалогликопротеинового рецептора (ASGPr), галактозу, производное галактозы, N-ацетилгалактозамин, фолат, полинуклеотид, полимер, полиамин, антитело, лекарственное средство, гаптен, дигоксигенин, витамин, биотин, флуорофор, антитело, иммуноглобулин, моноклональное антитело и фрагмент антитела.

$R_6$  представляет собой соединения, содержащие первичный амин, которые выбраны из группы, состоящей из: стерического стабилизатора, PEG,  $\text{H}-(\text{CH}_2)_{0-2}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{1-500}-\text{O}$ ,  $-(\text{CH}_2)_{0-2}-$ ,  $\text{PEG}_{1-100}$ , нацеливающей группы, лиганда рецептора клетки, интегрин-связывающего лиганда, лиганда RGD, миметика RGD, лиганда асиалогликопротеинового рецептора (ASGPr), галактозы, производного галактозы, N-ацетилгалактозамина, фолата, полинуклеотида, аминоксидированного полинуклеотида, полимера, аминоксидированного полимера, полиамина, амфипатического мембраноактивного полиамина, антитела, лекарственного средства, гаптена, дигоксигенина, витамина, биотина, флуорофора, антитела, моноклонального антитела и фрагмента антитела.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения описаны тетрапептидные модифицирующие агенты для обратимого присоединения первого соединения к аминоксидированному второму соединению посредством биологически лабильного тетрапептидного линкера, причем указанные тетрапептидные модифицирующие агенты содержат:



где

$R^5$  представляет собой первое соединение,

$A^4$  представляет собой природную, неприродную изомерную или синтетическую гидрофобную L-аминоксидированную, индекс гидрофобности (Monera et al., J. Protein Sci. 1995, 1, 319) которой при pH 7 составляет 41 или более, нормированный к глицину, поскольку таковой относится к составу боковой цепи аминоксидированной (R-группы),

$A^3$  представляет собой незаряженную или основную гидрофильную L-аминоксидированную, индекс гидрофобности (Monera et al., J. Protein Sci. 1995, 1, 319) которой при pH 7 составляет -28 или менее, нормированный к глицину, поскольку таковой относится к составу боковой цепи аминоксидированной (R-группы),

$A^2$  представляет собой природную, неприродную изомерную или синтетическую гидрофобную L-аминоксидированную, индекс гидрофобности (Monera et al., J. Protein Sci. 1995, 1, 319) которой при pH 7 составляет 41 или более, нормированный к глицину, поскольку таковой относится к составу боковой цепи аминоксидированной (R-группы),

A<sup>1</sup> представляет собой L-пролин, L-лейцин или L-N-метилаланин, и

R<sup>7</sup> содержит аминореактивную группу, такую как, но не ограничиваясь указанными: активированные сложные эфиры TFP (тетрафторфенила) или NHS (N-гидроксисукцинимид) 2-МТ (2-меркаптотиазолина).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения A<sup>1</sup> представляет собой пролин, A<sup>2</sup> и A<sup>4</sup> независимо представляют собой аланин, валин, лейцин, изолейцин или фенилаланин (боковые цепи -CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> или -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, соответственно), и A<sup>3</sup> представляет собой цитруллин или аспарагин (боковые цепи -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub> или -CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, соответственно).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения A<sup>1</sup> представляет собой пролин, A<sup>2</sup> и A<sup>4</sup> представляют собой фенилаланин, и A<sup>3</sup> представляет собой цитруллин (FCitFP (SEQ ID NO: 12)). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения A<sup>1</sup> представляет собой пролин, A<sup>2</sup> представляет собой фенилаланин, A<sup>3</sup> представляет собой цитруллин, и A<sup>4</sup> представляет собой аланин (ACitFP (SEQ ID NO: 3)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения A<sup>1</sup> представляет собой L-пролин, A<sup>2</sup> и A<sup>4</sup> независимо представляют собой L-аланин, L-валин, L-лейцин, L-изолейцин или L-фенилаланин (боковые цепи -CH<sub>3</sub>, -CHCH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> или -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, соответственно), и A<sup>3</sup> представляет собой L-цитруллин, L-аспарагин или L-лизин (боковые цепи -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub> или -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, соответственно).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения A<sup>1</sup> представляет собой L-пролин, A<sup>2</sup> и A<sup>4</sup> представляют собой L-фенилаланин, и A<sup>3</sup> представляет собой L-цитруллин (FCitFP (SEQ ID NO: 12)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения A<sup>1</sup> представляет собой L-пролин, A<sup>2</sup> представляет собой L-фенилаланин, A<sup>3</sup> представляет собой L-лизин, и A<sup>4</sup> представляет собой L-фенилаланин (FKFP (SEQ ID NO: 16)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения A<sup>1</sup> представляет собой L-пролин, A<sup>2</sup> представляет собой L-валин, A<sup>3</sup> представляет собой L-цитруллин, и A<sup>4</sup> представляет собой L-фенилаланин (FCitVP (SEQ ID NO: 13)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения A<sup>1</sup> представляет собой L-пролин, A<sup>2</sup> представляет собой L-фенилаланин, A<sup>3</sup> представляет собой L-цитруллин, и A<sup>4</sup> представляет собой L-валин (VCitFP (SEQ ID NO: 19)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения A<sup>1</sup> представляет собой L-пролин, A<sup>2</sup> представляет собой L-аланин, A<sup>3</sup> представляет собой L-цитруллин, и A<sup>4</sup> представляет собой L-фенилаланин (FCitAP (SEQ ID NO: 8)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения A<sup>1</sup> представляет собой L-пролин, A<sup>2</sup> представляет собой L-фенилаланин, A<sup>3</sup> представляет собой L-цитруллин, и A<sup>4</sup> представляет собой L-аланин (ACitFP (SEQ ID NO: 3)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения A<sup>1</sup> представляет собой лейцин, A<sup>2</sup> и A<sup>4</sup> независимо представляют собой L-аланин, L-валин, L-лейцин, L-изолейцин или L-фенилаланин (боковые цепи -CH<sub>3</sub>, -CHCH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> или -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, соответственно), и A<sup>3</sup> представляет собой L-цитруллин, L-аспарагин или L-лизин (боковые цепи -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, соответственно).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения A<sup>1</sup> представляет собой L-лейцин, A<sup>2</sup> представляет собой L-фенилаланин, и A<sup>3</sup> представляет собой L-лизин, и A<sup>4</sup> представляет собой L-фенилаланин (FKFL (SEQ ID NO: 15)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения A<sup>1</sup> представляет собой L-лейцин, A<sup>2</sup> представляет собой L-фенилаланин, A<sup>3</sup> представляет собой L-цитруллин, и A<sup>4</sup> представляет собой L-фенилаланин (FCitFL (SEQ ID NO: 11)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения A<sup>1</sup> представляет собой L-N-метилаланин, A<sup>2</sup> и A<sup>4</sup> независимо представляют собой L-аланин, L-валин, L-лейцин, L-изолейцин или L-фенилаланин (боковые цепи -CH<sub>3</sub>, -CHCH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> или -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, соответственно), и A<sup>3</sup> представляет собой L-цитруллин, L-аспарагин или L-лизин (боковые цепи -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub> или -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, соответственно).

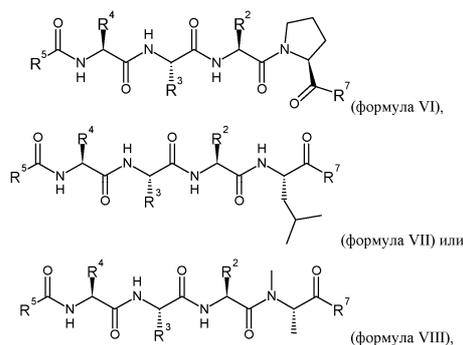
Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения A<sup>1</sup> представляет собой L-N-метилаланин, A<sup>2</sup> представляет собой L-фенилаланин, и A<sup>3</sup> представляет собой L-цитруллин, и A<sup>4</sup> представляет собой L-фенилаланин (FCitF(Nme)A (SEQ ID NO: 9)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения R<sub>5</sub> содержит соединение, которое выбрано из перечня, включающего стерический стабилизатор, PEG, H-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>1-500</sub>-O<sub>0-1</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-2</sub>-, PEG<sub>1-100</sub>, нацеливающую группу, лиганд рецептора клетки, интегрин-связывающий лиганд, лиганд RGD, миметик RGD, лиганд асиалогликопротеинового рецептора (ASGPr), галактозу, производное галактозы, N-ацетилгалактозамин, фолат, полинуклеотид, полимер, полиамин, липид, липосому, антитело, лекарственное средство, гаптен, диоксигенин, витамин, биотин, флуорофор, антитело, иммуноглобулин, моноклональное антитело и фрагмент антитела.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающая группа включает лиганд рецептора поверхности клетки. Рецептор поверхности клетки может включать, но не ограничен указанными, асиалогликопротеиновый рецептор и рецептор интегринов. Лиганд асиалогликопротеинового рецептора может включать, но не ограничен указанными, галактозу, галактозамин, N-формилгалактозамин, N-ацетилгалактозамин, N-пропионилгалактозамин, N-n-бутаноилгалактозамин и N-изо-бутаноилгалактозамин или димер, тримеры или тетрамеры указанных соединений. Рецептор интегринов может включать, но не ограничен указанными, рецептор интегрин  $\alpha\upsilon\beta 3$  и интегрин  $\alpha\upsilon\beta 6$ . Лиганд рецептора интегринов может включать, но не ограничен указанными, RGD или миметик RGD (см., например, публикацию патента США US-2015-0045573 A1, включенную в настоящую заявку посредством ссылки).

Стерический стабилизатор может включать, но не ограничен указанным, полиэтиленгликоль (PEG). PEG содержит 1-120 этиленовых единиц, 3-30 этиленовых единиц или 3-24 этиленовые единицы.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения описаны соединения для обратимого присоединения первого соединения к аминокислотному второму соединению посредством биологически лабильного тетрапептидного линкера, причем указанные соединения содержат структуру, представленную формулой:



где

$R^5$  представляет собой первое соединение,

$R^4$  представляет собой R-группу (боковую цепь) природной, неприродной изомерной или синтетической гидрофобной L-аминокислоты, индекс гидрофобности (Monera et al., J. Protein Sci. 1995, 1,319) которой при pH 7 составляет 41 или более, нормированный к глицину, поскольку таковой относится к составу боковой цепи аминокислоты (R-группы),

$R^3$  представляет собой R-группу (боковую цепь) незаряженной гидрофильной или основной гидрофильной L-аминокислоты, индекс гидрофобности (Monera et al., J. Protein Sci. 1995, 1, 319) которой при pH 7 составляет -28 или менее, нормированный к глицину, поскольку таковой относится к составу боковой цепи аминокислоты (R-группы), и

$R^2$  представляет собой R-группу (боковую цепь) природной, неприродной изомерной или синтетической гидрофобной L-аминокислоты, индекс гидрофобности (Monera et al., J. Protein Sci. 1995, 1, 319) которой при pH 7 составляет 41 или более, нормированный к глицину, поскольку таковой относится к составу боковой цепи аминокислоты (R-группы).

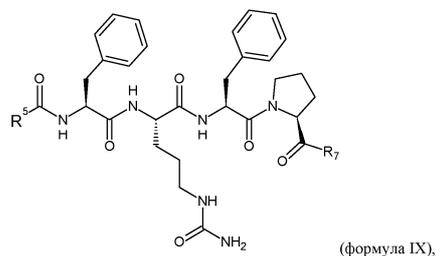
$R^7$  содержит амореактивную группу.

$R^7$  выбирают таким образом, что в результате реакции с амином или аминокислотным соединением образуется амидная связь с  $A^1$ . Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения амореактивная группа представляет собой TFP (тетрафторфенил) или NHS (N-гидрокси-сукцинимид).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $R^2$  и  $R^4$  независимо выбраны из группы, состоящей из:  $-CH_3$ ,  $-CH(CH_3)_2$ ,  $-CH_2CH(CH_3)_2$ ,  $-CH(CH_3)CH_2CH_3$  и  $-CH_2C_6H_5$ .

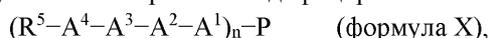
Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $R^3$  выбран из группы, состоящей из:  $-(CH_2)_3NHCONH_2$  и  $-CH_2CONH_2$ .

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения описаны соединения для обратимого присоединения первого соединения к аминокислотному второму соединению посредством биологически лабильного тетрапептидного линкера, причем указанные соединения содержат структуру, представленную формулой:



где  $R^5$  представляет собой первое соединение, и  $R^7$  содержит аминокреактивную группу.  $R^7$  выбирают таким образом, что в результате реакции с амином или аминокреактивным соединением образуется амидная связь с  $A^1$ . Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокреактивная группа представляет собой TFP (тетрафторфенил) или NHS (N-гидроксисукцинимид).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения описаны обратимо модифицированные полиамины, причем указанный обратимо модифицированный полиамин содержит:



где

каждый  $R^5$ ,  $A^4$ ,  $A^3$ ,  $A^2$  и  $A^1$  является таким, как описано выше,

$P$  содержит полиамин,

$n$  представляет собой целое число, большее или равное 1, и

каждый  $A^1$  присоединен к амину в полиамине посредством амидной связи.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиамин представляет собой мембраноактивный полиамин. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мембраноактивный полиамин представляет собой амфипатический мембраноактивный полиамин.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^1$  представляет собой L-пролин,  $A^2$  и  $A^4$  независимо представляют собой L-аланин, L-валин, L-лейцин, L-изолейцин или L-фенилаланин (боковые цепи  $-CH_3$ ,  $-CHCH_3$ ,  $-CH(CH_3)_2$ ,  $-CH_2CH(CH_3)_2$ ,  $-CH(CH_3)CH_2CH_3$  или  $-CH_2C_6H_5$ , соответственно), и  $A^3$  представляет собой L-цитруллин, L-аспарагин или L-лизин (боковые цепи  $-(CH_2)_3NHCONH_2$ ,  $-CH_2CONH_2$  или  $-(CH_2)_4NH_3^+$ , соответственно).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^1$  представляет собой L-пролин,  $A^2$  и  $A^4$  представляют собой L-фенилаланин, и  $A^3$  представляет собой L-цитруллин (FCitFP (SEQ ID NO: 12)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^1$  представляет собой L-пролин,  $A^2$  представляет собой L-фенилаланин,  $A^3$  представляет собой L-лизин, и  $A^4$  представляет собой L-фенилаланин (FKFP (SEQ ID NO: 16)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^1$  представляет собой L-пролин,  $A^2$  представляет собой L-валин,  $A^3$  представляет собой L-цитруллин, и  $A^4$  представляет собой L-фенилаланин (FCitVP (SEQ ID NO: 13)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^1$  представляет собой L-пролин,  $A^2$  представляет собой L-фенилаланин,  $A^3$  представляет собой L-цитруллин, и  $A^4$  представляет собой L-валин (VCitFP (SEQ ID NO: 19)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^1$  представляет собой L-пролин,  $A^2$  представляет собой L-аланин,  $A^3$  представляет собой L-цитруллин, и  $A^4$  представляет собой L-фенилаланин (FCitAP (SEQ ID NO: 8)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^1$  представляет собой L-пролин,  $A^2$  представляет собой L-фенилаланин,  $A^3$  представляет собой L-цитруллин, и  $A^4$  представляет собой L-аланин (ACitFP (SEQ ID NO: 3)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^1$  представляет собой лейцин,  $A^2$  и  $A^4$  независимо представляют собой L-аланин, L-валин, L-лейцин, L-изолейцин или L-фенилаланин (боковые цепи  $-CH_3$ ,  $-CHCH_3$ ,  $-CH(CH_3)_2$ ,  $-CH_2CH(CH_3)_2$ ,  $-CH(CH_3)CH_2CH_3$  или  $-CH_2C_6H_5$ , соответственно), и  $A^3$  представляет собой L-цитруллин, L-аспарагин или L-лизин (боковые цепи  $-(CH_2)_3NHCONH_2$ ,  $-CH_2CONH_2$  или  $-(CH_2)_4NH_3^+$ , соответственно).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^1$  представляет собой L-лейцин,  $A^2$  представляет собой L-фенилаланин,  $A^3$  представляет собой L-лизин, и  $A^4$  представляет собой L-фенилаланин (FKFL (SEQ ID NO: 15)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^1$  представляет собой L-лейцин,  $A^2$  представляет собой L-фенилаланин,  $A^3$  представляет собой L-цитруллин, и  $A^4$  представляет собой L-фенилаланин (FCitFL (SEQ ID NO: 11)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^1$  представляет собой L-N-метилаланин,  $A^2$  и  $A^4$  независимо представляют собой L-аланин, L-валин, L-лейцин, L-изолейцин или L-фенилаланин (боковые цепи  $-CH_3$ ,  $-CHCH_3$ ,  $-CH(CH_3)_2$ ,  $-CH_2CH(CH_3)_2$ ,  $-CH(CH_3)CH_2CH_3$  или  $-CH_2C_6H_5$ , соответственно), и  $A^3$  представляет собой L-цитруллин, L-аспарагин или L-лизин (боковые цепи  $-(CH_2)_3NHCONH_2$ ,  $-CH_2CONH_2$  или  $-(CH_2)_4NH_3^+$ , соответственно).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения  $A^1$  представляет собой L-N-метилаланин,  $A^2$  представляет собой L-фенилаланин, и  $A^3$  представляет собой L-цитруллин, и  $A^4$  представляет собой L-фенилаланин (FCitF(Nme)A (SEQ ID NO: 9)).

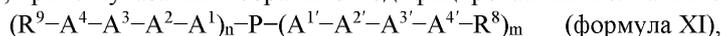
Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения обратимо модифицированный полиамин образуется в результате осуществления реакции полиамина с множеством описанных тетрапептидных модифицирующих агентов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения присоединение тетрапептидных модифицирующих агентов к мембраноактивному полиамину мас-

кирует мембранную активность мембраноактивного полиамина посредством образования маскированного полиамина или полимера для доставки.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения более 50% аминов в полиамине являются модифицированными (значение n составляет более 50% от количества аминов в полиамине). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения более 60% аминов в полиамине являются модифицированными. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения более 70% аминов в полиамине являются модифицированными. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения более 75% аминов в полиамине являются модифицированными. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения более 80% аминов в полиамине являются модифицированными. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения более 85% аминов в полиамине являются модифицированными. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения более 90% аминов в полиамине являются модифицированными. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения более 95% аминов в полиамине являются модифицированными. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения 100% аминов в полиамине являются модифицированными.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения R<sup>5</sup> содержит нацеливающую группу, и обратимо модифицированный полиамин дополнительно конъюгирован с триггером РНКи. Конъюгат триггера РНКи с обратимо модифицированным полиамином можно использовать для доставки триггера РНКи в клетки *in vivo* с целью нокаутирования экспрессии гена-мишени. Конъюгат получают и вводят пациенту. Введение может представлять собой, но не ограничено указанными, внутрисосудистую инъекцию и подкожную инъекцию. Расщепление (ферментативное расщепление) тетрапептидов протеолитическими ферментами *in vitro* или *in vivo* приводит к расщеплению между A<sup>1</sup> и полиамином с высвобождением полиамина. Скорость высвобождения полиамина является достаточной для обеспечения доставки лекарственного средства или триггера РНКи.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения описаны обратимо модифицированные полиамины, причем указанный обратимо модифицированный полиамин содержит:



где

каждый A<sup>4</sup>, A<sup>3</sup>, A<sup>2</sup> и A<sup>1</sup> является таким, как описано выше,

A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup> и A<sup>4</sup> независимо являются такими, как описано выше, для A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup> и A<sup>4</sup>, соответственно,

R<sup>9</sup> содержит нацеливающую группу,

R<sup>8</sup> содержит стерический стабилизатор,

P содержит полиамин,

каждый n и m представляет собой целое число, большее или равное 1, и каждый из A<sup>1</sup> и A<sup>1'</sup> присоединен к аминам в полиамине посредством амидных связей.

Обратимо модифицированный полиамин образуется в результате осуществления реакции полиамина с множеством описанных тетрапептидных модифицирующих агентов.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиамин представляет собой мембраноактивный полиамин. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мембраноактивный полиамин представляет собой амфипатический мембраноактивный полиамин.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения более 50% аминов в полиамине являются модифицированными (значение n+m составляет более 50% от количества аминов в полиамине). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения более 60% аминов в полиамине являются модифицированными. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения более 70% аминов в полиамине являются модифицированными. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения более 75% аминов в полиамине являются модифицированными. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения более 80% аминов в полиамине являются модифицированными. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения более 85% аминов в полиамине являются модифицированными. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения более 90% аминов в полиамине являются модифицированными. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения более 95% аминов в полиамине являются модифицированными. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения 100% аминов в полиамине являются модифицированными.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения обратимо модифицированный полиамин дополнительно конъюгирован с триггером РНКи. Конъюгат триггера РНКи с обратимо модифицированным полиамином можно использовать для доставки триггера РНКи в клетки *in vivo* с целью нокаутирования экспрессии гена-мишени. Конъюгат получают и вводят пациенту. Введение может представлять собой, но не ограничено указанными, внутрисосудистую инъекцию и подкожную инъекцию. Расщепление (ферментативное расщепление) тетрапептидов протеолитическими ферментами *in vitro* или *in vivo* приводит к расщеплению между A<sup>1</sup> и полиамином с высвобождением полиамина. Скорость высвобождения полиамина является достаточной для обеспечения доставки лекарственного средства или

триггера РНКи.

Неожиданно авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что вставка С-концевого остатка L-пролина в тетрапептидный линкер в значительной степени улучшает характеристики расщепления линкера. Регенерация  $H_2N-R^6$  ( $H_2N-P$  из формул X и XI) происходит при значительно более высокой скорости, когда в положении  $A^1$  присутствует L-пролин. Не опираясь на какую-либо теорию, считают, что эндогенные ферменты, как представляется, быстро расщепляют тетрапептид между  $A^3$  и  $A^2$  с получением первого соединения, присоединенного к дипептиду  $A^4-A^3$  ( $R^5-A^4-A^3-CO_2H$ ), и второго соединения, присоединенного к дипептиду  $A^2-A^1$  ( $H_2N-A^2-A^1-N(H)-R^6$ ). Присутствие пролина в положении  $A^1$  подавляет расщепление между  $A^2$  и  $A^1$ . Если в положении  $A^1$  присутствует несколько аминокислот, отличных от пролина, эндогенные экзопротеазы, как представляется, быстро отщепляют  $A^2$  от ( $H_2N-A^2-A^1-N(H)-R^6$ ) с получением  $H_2N-A^2-CO_2H$  плюс  $H_2N-A^1-N(H)-R^6$ . Отщепление одной аминокислоты от второго соединения, как представляется, является медленным и приводит к медленной регенерации исходного аминокислотного соединения ( $H_2N-R^6$ ). Авторы настоящего изобретения обнаружили, что при отсутствии пролина в положении  $A^1$  конъюгаты с одной аминокислотой ( $H_2N-A^1-N(H)-R^2$ ) легко образовывались в результате исходного расщепления между  $A^2$  и  $A^1$  или в результате расщепления между  $A^3$  и  $A^2$  с последующим расщеплением между  $A^2$  и  $A^1$ . Напротив, если в положении  $A^1$  присутствует пролин, тогда дипептид  $A^2-A^1$ , как представляется, быстро расщепляется эндогенными дипептидазами с получением  $H_2N-A^2-Pro-CO_2H$  и высвободившегося второго соединения  $H_2N-R^6$ . Аналогичные результаты были получены с L-лейцином или N-метилаланином и положением  $A^1$ .

В настоящей заявке мембраноактивные полиамины представляют собой поверхностно-активные амфипатические полимеры, способные вызывать один или несколько из следующих эффектов в отношении биологической мембраны: изменение или разрушение мембраны, которое позволяет молекулам, не проникающим через мембраны, поступать в клетку или пересекать мембрану, образование пор в мембране, фрагментацию мембран или разрушение или растворение мембраны. В настоящей заявке мембрана или мембрана клетки содержит липидный бислой. Изменение или разрушение мембраны можно функционально определить на основании активности полимера по меньшей мере в одном из следующих анализов: лизиса красных кровяных клеток (гемолиза), утечки из липосомы, слияния липосом, слияния клеток, лизиса клеток и высвобождения из эндосомы. Мембраноактивные полимеры, которые могут вызывать лизис мембран клеток, также называют мембранолитическими полимерами. Полимеры, которые, предпочтительно, вызывают разрушение эндосом или лизосом по сравнению с плазматической мембраной, считают эндосомолитическими. Эффект мембраноактивных полимеров в отношении мембраны клетки может являться временным. Мембраноактивные полимеры обладают аффинностью в отношении мембраны и вызывают денатурацию или деформацию структур бислоя. Мембраноактивные полимеры могут являться синтетическими или природными амфипатическими полимерами.

Доставка полинуклеотида в клетку опосредуется мембраноактивным полимером, разрушающим или дестабилизирующим плазматическую мембрану или мембрану внутренней везикулы (такой как эндосома или лизосома), в том числе посредством образования поры в мембране или разрушения эндосомальных или лизосомальных везикул, что делает возможным высвобождение содержимого везикулы в цитоплазму клетки.

В настоящей заявке стерический стабилизатор представляет собой неионный гидрофильный полимер (природный, синтетический или природный), который предотвращает или ингибирует внутримолекулярные или межмолекулярные взаимодействия молекулы, к которой присоединен данный стерический стабилизатор, по сравнению с молекулой, не содержащей стерического стабилизатора. Стерический стабилизатор препятствует вовлечению молекулы, к которой присоединен данный стерический стабилизатор, в электростатические взаимодействия. Электростатическое взаимодействие представляет собой нековалентное связывание двух или нескольких веществ вследствие сил притяжения между положительным и отрицательным зарядами. Стерические стабилизаторы могут ингибировать взаимодействие с компонентами крови и вследствие этого опсонизацию, фагоцитоз и поглощение ретикулоэндотелиальной системой. Таким образом, стерические стабилизаторы могут увеличивать время циркуляции молекул, к которым присоединены данные стерические стабилизаторы. Стерические стабилизаторы также могут ингибировать агрегацию молекул. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения стерический стабилизатор представляет собой полиэтиленгликоль (PEG) или производное PEG. Подходящие молекулы PEG содержат приблизительно 1-120 мономеров этиленгликоля.

Нацеливающие группы (также нацеливающие лиганды) используют для нацеливания или доставки соединений к клеткам- или тканям-мишеням либо к конкретным типам клеток. Нацеливающие группы усиливают связывание молекул с клеткой-мишенью. Таким образом, нацеливающие группы могут усиливать фармакокинетические свойства или свойства биораспределения конъюгата, к которому присоединены данные нацеливающие группы, для улучшения распределения конъюгата в клетке и поглощения клетками. Связывание нацеливающей группы, такой как лиганд, с клеткой или рецептором клетки может запустить эндоцитоз. Нацеливающие группы могут быть выбраны из группы, состоящей из: соединений, обладающих аффинностью в отношении молекулы поверхности клетки, лигандов рецепторов клетки и антител, фрагментов антитела и миметиков антител, обладающих аффинностью в отношении молекул

поверхности клетки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающая группа включает лиганд рецептора клетки. Множество лигандов использовали для нацеливания лекарственных средств и генов в клетки и к конкретным рецепторам клетки. Лиганды рецепторов клетки могут быть выбраны из группы, состоящей из: углеводов, гликанов, сахаридов (включая, но не ограничиваясь указанными: галактозу, производные галактозы, маннозу и производные маннозы), витаминов, фолата, биотина, аптамеров, пептидов (включая, но не ограничиваясь указанными: RGD-содержащие пептиды, инсулин, EGF и трансферрин) и миметиков RGC.

В настоящей заявке лиганд ASGPr (или лиганд ASGPr) включает галактозу и производное галактозы, которое характеризуется аффинностью в отношении ASGPr, равной или большей, чем таковая галактозы. Связывание нацеливающих групп галактозы с ASGPr облегчает клеткоспецифичное нацеливание пептида для доставки к гепатоцитам и эндоцитоз пептида для доставки в гепатоциты. Лиганды ASGPr могут быть выбраны из группы, состоящей из: лактозы, галактозы, N-ацетилгалактозамина (GalNAc), галактозамина, N-формилгалактозамина, N-ацетилгалактозамина, N-пропионилгалактозамина, N-n-бутаноилгалактозамина и N-изобутаноилгалактозамина (Iobst, S.T. and Drickamer, K. J.B.C. 1996, 277, 6686). Лиганды ASGPr могут являться мономерными (например, могут содержать один галактозамин) или мультимерными (например, могут содержать несколько галактозаминов).

Триггеры РНКи (также называемые триггерами дсРНКи) ингибируют экспрессию гена посредством биологического процесса РНК-интерференции (РНКи). Триггеры РНКи включают двуспиральную РНК или РНК-подобные структуры, как правило, содержащие 15-50 пар оснований или 18-26 пар оснований и содержащие последовательность нуклеиновых оснований, по меньшей мере на 90% комплементарную в пределах коровой области кодирующей последовательности в экспрессированном гене-мишени в клетке. Триггеры РНКи включают, но не ограничены указанными: малую интерферирующую РНК (миРНК), двуспиральную РНК (дсРНК), микроРНК, малую шпилечную РНК (мшРНК) и дайсер-субстраты (патенты США №№ 8084599, 8349809 и 8513207).

Под ингибированием, понижающей регуляцией или нокдауном экспрессии генов подразумевают, что экспрессия гена, которую измеряют по уровню мРНК, транскрибированной с гена, или по уровню полипептида, белка или субъединицы белка, транслированной с мРНК, уменьшается ниже уровня, наблюдаемого при отсутствии блокирующих конъюгатов полинуклеотидов, описанных в настоящей заявке. Ингибирование, понижающая регуляция или нокдаун экспрессии генов с помощью полинуклеотида, доставляемого посредством композиций, описанных в настоящей заявке, находится ниже уровня, наблюдаемого в присутствии контрольной неактивной нуклеиновой кислоты, нуклеиновой кислоты со скремблированной последовательностью или с инактивирующими ошибками спаривания, или при отсутствии конъюгации полинуклеотида с обратимо модифицированным полимером.

В фармакологии и токсикологии путь введения представляет собой путь, посредством которого осуществляется контакт лекарственного средства, жидкости, яда или другого вещества с организмом. Как правило, способы введения лекарственных средств и нуклеиновых кислот для лечения млекопитающего хорошо известны в данной области техники, и данные способы можно применять для введения композиций, описанных в настоящей заявке. Композиции, описанные в настоящей заявке, могут быть введены посредством любого подходящего пути, включая парентеральный, в препарате, соответствующим образом приспособленном к данному пути. Таким образом, соединения, описанные в настоящей заявке, могут быть введены посредством инъекции, например, внутривенным, внутримышечным, внутрикожным, подкожным или интраперитонеальным путем. Соответственно, композиции, описанные в настоящей заявке, могут быть включены в фармацевтические композиции и/или могут образовывать часть фармацевтически приемлемого носителя или вспомогательного вещества.

Парентеральные пути введения включают внутрисосудистые (внутривенные, внутриартериальные), внутримышечные, интрапаренхимальные, интрадермальные, субдермальные, подкожные, внутриопухолевые, интраперитонеальные, интратекальные, субдуральные, эпидуральные и внутрилимфатические инъекции, для которых используют шприц и иглу или катетер.

Описанные композиции инъектируют в растворах фармацевтически приемлемого носителя. "Фармацевтически приемлемый" относится к таковым свойствам и/или веществам, которые являются приемлемыми для млекопитающего с фармакологической/токсикологической точки зрения. Фраза "фармацевтически приемлемый" означает молекулярные объекты, композиции и свойства, которые являются физиологически переносимыми и, как правило, не вызывают аллергической или другой нежелательной или токсичной реакции при введении млекопитающему. Термин "фармацевтически приемлемый" означает подлежащий одобрению регуляторным органом федерального правительства или правительства штата или приведенный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и, более конкретно, у людей.

В настоящей заявке "фармацевтическая композиция" содержит фармакологически эффективное количество активной фармацевтической субстанции (АФС, также терапевтического продукта, например, триггера РНКи), фармацевтически приемлемый носитель и, необязательно, одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества (вспомогательные вещества) представляют собой вещества, отличные от АФС, безопасность

которых была соответствующим образом оценена и которые целенаправленно были включены в систему для доставки лекарственного средства. Вспомогательные вещества не оказывают или не предназначены для оказания терапевтического эффекта в предусмотренной дозе. Вспомогательные вещества могут выступать для а) способствования обработке системы доставки лекарственного средства в процессе производства, б) защиты, поддержания или усиления стабильности, биодоступности или переносимости АФС пациентом, в) способствования обнаружению продукта и/или d) усиления другого свойства общей безопасности, эффективности, доставки АФС в процессе хранения или применения.

Вспомогательные вещества включают, но не ограничены указанными: вещества, способствующие всасыванию, антиадгезивные вещества, противовспенивающие вещества, антиоксиданты, связывающие вещества, буферные вещества, носители, покрывающие вещества, красители, вещества, способствующие доставке, декстран, декстрозу, разбавители, разрыхлители, эмульгирующие вещества, наполнители, вещества-наполнители, вкусоароматические вещества, вещества, способствующие скольжению, смачивающие вещества, смазывающие вещества, масла, полимеры, консерванты, солевой раствор, соли, растворители, сахара, суспендирующие средства, матрицы с замедленным высвобождением, подсластители, загустители, вещества, регулирующие тоничность, вещества основы, водоотталкивающие вещества и увлажняющие вещества. Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество может представлять собой инертное вещество или может не представлять собой инертное вещество.

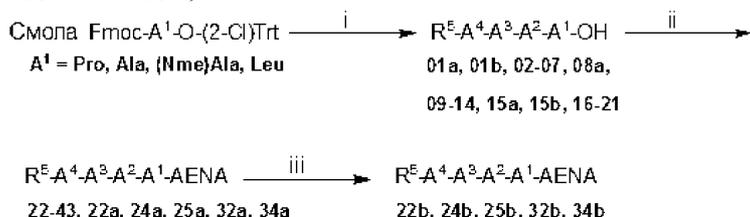
Фармацевтические композиции, описанные в настоящей заявке, могут содержать другие дополнительные компоненты, обычно присутствующие в фармацевтических композициях. Фармацевтически активные вещества могут включать, но не ограничены указанными: противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства (например, антигистамин, дифенгидрамин и т.д.). Также предусмотрено, что клетки, ткани или выделенные органы, которые экспрессируют или содержат определенные в настоящей заявке триггеры РНКи, можно использовать в качестве "фармацевтических композиций". В настоящей заявке "фармакологически эффективное количество", "терапевтически эффективное количество" или просто "эффективное количество" означает такое количество триггера РНКи, которое обеспечивает предусмотренный фармакологический, терапевтический или профилактический результат.

Лекарственные средства, содержащие тетрапептидный линкер, также являются объектом настоящего изобретения, как и способы производства таких лекарственных средств, причем указанные способы включают приведение одного или нескольких соединений, содержащих тетрапептидный линкер и, при необходимости, одно или несколько других терапевтически ценных веществ, в галеновую лекарственную форму для введения.

### Примеры

Пример 1. Синтез тетрапептидных линкеров и конъюгатов, содержащих тетрапептидные линкеры.

А) Синтез пептида и пептидов, меченных AENA.



(i) Твердофазный синтез соединений 1-21: Пептидные кислоты синтезировали из коммерчески доступной смолы 2-Cl-Trt (EMD Millipore, Биллерика, Массачусетс), предварительно нагруженной пролином, лейцином, аланином или N-метилаланином. Пошаговое добавление проводили с применением стандартных способов области техники твердофазного синтеза. Сочетание проводили с применением РУБОР (4 экв.), аминокислоты (4 экв.) и DIEA (8 экв.). Снятие защиты Fmoc проводили с помощью 20% пиперидина в DMF.

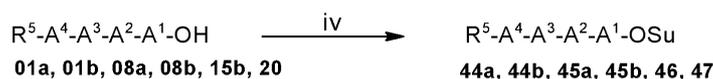
После синтеза пептида с N-концевой аминокислоты снимали защиту и сочетали с указанной группой R<sup>5</sup>. Сочетание проводили с применением 2 экв. активированных NHS сложных эфиров NAG(OAc)<sub>3</sub> (как получено в публикациях US 8802773 и Rozema et al., 2015) или PEG<sub>12</sub> (Quanta Biodesign, Плейн-Сити, Огайо, № CAS: 756525-94-7) в DMF, содержащем 4 экв. DIEA. Другие группы R<sup>5</sup> можно присоединить с применением аналогичного синтеза. После присоединения R<sup>5</sup> пептиды отщепляли от смолы с применением HFIP (30%) в DCM в течение 0,25 ч. После удаления растворителя осадок растирали с Et<sub>2</sub>O. Субстраты впоследствии использовали без дополнительной очистки.

(ii) Общая схема получения соединений 22-43 (22a, 24a, 25a, 32a, 34a): К раствору неочищенного пептидного субстрата (1-21) добавляли РУБОР (2 экв.), DIEA (2 экв.), затем AENA (2 экв.) и перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. После завершения растворитель удаляли в вакууме. Соединения 24a, 25a, 32a и 34a впоследствии использовали без дополнительной очистки. Все другие субстраты очищали с применением метода ВЭЖХ с колонкой с обращенной фазой Thermo Scientific Aquasil C18 (250×21,2, Уолтем, Массачусетс) при элюировании градиентом ацетонитрила и воды, забуференной

0,1% муравьиной кислотой. После очистки все соединения высушивали посредством лиофилизации.

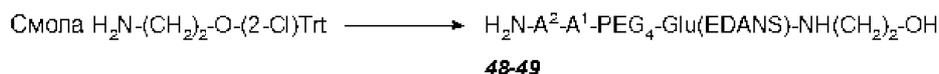
(iii) Получение соединений 22b, 24b, 25b, 32b и 34b: Соединения 24a и 25a обрабатывали 2% гидразином в DMF в течение 15 мин, и впоследствии все растворители удаляли в вакууме. Соединение 32a обрабатывали 50% TFA в DCM в течение 1 ч, и впоследствии все растворители удаляли в вакууме. Соединение 34a обрабатывали чистой муравьиной кислотой в течение 18 ч, и впоследствии все растворители удаляли в вакууме. Часть неочищенного соединения 22a обрабатывали MeOH (25%), H<sub>2</sub>O (45%) и TEA (35%), перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, и впоследствии все растворители удаляли в вакууме. Все соединения, с которых снимали защиту, как описано, впоследствии очищали методом ВЭЖХ, как описано на стадии (ii).

В. Общая схема получения соединений 44a, 44b, 45a, 45b и 34b, активация пептидных субстратов сложным эфиром (iv):



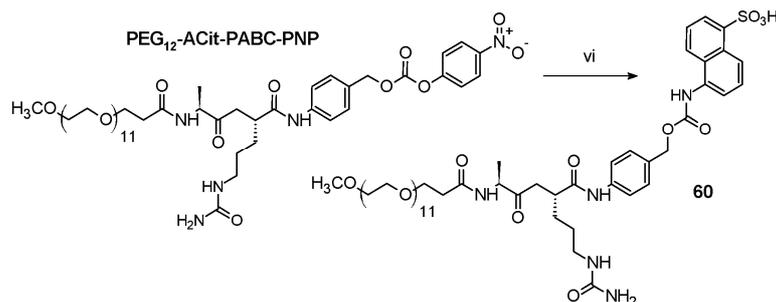
Неочищенные соединения 01a, 01b, 08a, 08b, 15b и 20 сначала очищали методом ВЭЖХ, как описано на стадии (ii). Перед очисткой методом ВЭЖХ соединения 01a и 08a обрабатывали MeOH (25%), H<sub>2</sub>O (45%) и TEA (35%), как при получении 22b, описанном на стадии (iii). Впоследствии все соединения активировали следующим образом. В высушенную над пламенем колбу к раствору при температуре 0°C, содержащему очищенный субстрат в DMF или DCM в концентрации 0,2 М, добавляли NHS (3 экв.) и DCC (3 экв.) и оставляли перемешиваться при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение ночи. После завершения смесь частично концентрировали, охлаждали до температуры -20°C, фильтровали, а затем все растворители удаляли в вакууме. Осадок растворяли в минимальном количестве DCM и MeOH, преципитировали в холодном Et<sub>2</sub>O и собирали посредством сцеживания растворителя после центрифугирования. Преципитацию в Et<sub>2</sub>O повторяли до тех пор, пока перестала обнаруживаться остаточная дициклогексилмочевина, что подтверждали методом ЯМР (ядерного магнитного резонанса). Все полученные соединения впоследствии использовали без дополнительной очистки.

С) Синтез субстратов, меченных EDANS, общая схема получения соединений 48-59:



Каждую пептидную кислоту синтезировали из коммерчески доступной смолы 2-Cl-Trt (EMD Millipore, Биллерика, Массачусетс), предварительно нагруженной этаноламином. Ступенчатый твердофазный синтез проводили, как описано на стадии (i). После синтеза пептида N-концевой FMOC удаляли, и последовательность отщепляли от смолы с применением 5% TFA, 5% H<sub>2</sub>O в DCM в течение 0,5 ч и очищали методом ВЭЖХ, как описано на стадии (ii). Перед очисткой соединения 52 и 53 обрабатывали в 50% TFA, 5% TIS, 5% H<sub>2</sub>O в DCM в течение 1 ч.

D) Получение соединения 60 (vi), синтез контроля для анализа ферментативного расщепления:



К раствору, содержащему PEG<sub>12</sub>-ACit-PABC-PNP (0,052 ммоль, 56 мг), полученный, как описано ранее (US 8802733, Rozema et al., 2015, Carlson et al., 2015), и TEA (0,078 ммоль, 10,8 мкл) в DMF (400 мкл), добавляли EDANS (0,052 ммоль, 14 мг) и оставляли перемешиваться в виде суспензии при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение ночи. После завершения все растворители удаляли в вакууме, неочищенный осадок растирали с Et<sub>2</sub>O и очищали с применением SiO<sub>2</sub> при элюировании в градиенте MeOH (10-20%) в CHCl<sub>3</sub>. Выход составил 58 мг (92%).

Таблица 1

## Пептидные линкеры

Соединение	R <sup>5</sup>	A <sup>4</sup>	A <sup>3</sup>	A <sup>2</sup>	A <sup>1</sup>	*R <sup>6</sup>
01a	NAG(OAc) <sub>3</sub>	Phe	Cit	Phe	Pro	OH
01b	PEG <sub>12</sub>	Phe	Cit	Phe	Pro	OH
02	PEG <sub>12</sub>	Phe	Lys(dde)	Phe	Pro	OH
03	PEG <sub>12</sub>	Phe	Lys(dde)	Phe	Leu	OH
04	NAG(OAc) <sub>3</sub>	Phe	Cit	Val	Pro	OH
05	PEG <sub>12</sub>	Phe	Cit	Phe	Leu	OH
06	NAG(OAc) <sub>3</sub>	Val	Cit	Phe	Pro	OH
07	PEG <sub>12</sub>	Phe	Cit	Phe	(Nme)Ala	OH
08a	NAG(OAc) <sub>3</sub>	Phe	Cit	Ala	Pro	OH
08b	PEG <sub>12</sub>	Phe	Cit	Ala	Pro	OH
09	PEG <sub>12</sub>	Ala	Cit	Phe	Pro	OH
10	PEG <sub>12</sub>	Phe	Asn(dmcp)	Phe	Pro	OH
11	NAG(OAc) <sub>3</sub>	Phe	Cit	Ala	Ala	OH
12	PEG <sub>12</sub>	Phe	Asp(O <sup>t</sup> Bu)	Phe	Pro	OH
13	NAG(OAc) <sub>3</sub>	Ala	Cit	Ala	Ala	OH
14	NAG(OAc) <sub>3</sub>	Cit	Ala	Ala	Ala	OH
15a	NAG(OAc) <sub>3</sub>	Ala	Cit	Ala	Pro	OH
15b	PEG <sub>12</sub>	Ala	Cit	Ala	Pro	OH
16	PEG <sub>12</sub>	Gly	Phe	Leu	Gly	OH
17	NAG(OAc) <sub>3</sub>	Phe	Cit	Phe	Ala	OH
18	NAG(OAc) <sub>3</sub>	-	Cit	Ala	Ala	OH
19	NAG(OAc) <sub>3</sub>	-	Ala	Ala	Ala	OH
20	PEG <sub>12</sub>	-	Cit	Ala	Pro	OH
21	NAG(OAc) <sub>3</sub>	-	Ala	Cit	Ala	OH
22a	NAG(OAc) <sub>3</sub>	Phe	Cit	Phe	Pro	AENA
22b	NAG(OH) <sub>3</sub>	Phc	Cit	Phe	Pro	AENA
23	PEG <sub>12</sub>	Phe	Cit	Phe	Pro	AENA
24a	PEG <sub>12</sub>	Phe	Lys(dde)	Phe	Pro	AENA
24b	PEG <sub>12</sub>	Phe	Lys(NH <sub>2</sub> )	Phe	Pro	AENA
25a	PEG <sub>12</sub>	Phe	Lys(dde)	Phe	Leu	AENA
25b	PEG <sub>12</sub>	Phe	Lys(NH <sub>2</sub> )	Phe	Leu	AENA
26	NAG(OAc) <sub>3</sub>	Phe	Cit	Val	Pro	AENA
27	PEG <sub>12</sub>	Phe	Cit	Phe	Leu	AENA
28	NAG(OAc) <sub>3</sub>	Val	Cit	Phe	Pro	AENA
29	PEG <sub>12</sub>	Phe	Cit	Phe	(Nme)Ala	AENA
30	NAG(OAc) <sub>3</sub>	Phe	Cit	Ala	Pro	AENA
31	PEG <sub>12</sub>	Ala	Cit	Phe	Pro	AENA
32a	PEG <sub>12</sub>	Phe	Asn(dmcp)	Phe	Pro	AENA
32b	PEG <sub>12</sub>	Phe	Asn(NH <sub>2</sub> )	Phe	Pro	AENA
33	NAG(OAc) <sub>3</sub>	Phe	Cit	Ala	Ala	AENA
34a	PEG <sub>12</sub>	Phe	Asp(O <sup>t</sup> Bu)	Phe	Pro	AENA
34b	PEG <sub>12</sub>	Phe	Asp(OH)	Phe	Pro	AENA
35	NAG(OAc) <sub>3</sub>	Ala	Cit	Ala	Ala	AENA
36	NAG(OAc) <sub>3</sub>	Cit	Ala	Ala	Ala	AENA
37	NAG(OAc) <sub>3</sub>	Ala	Cit	Ala	Pro	AENA
38	PEG <sub>12</sub>	Gly	Phe	Leu	Gly	AENA
39	NAG(OAc) <sub>3</sub>	Phe	Cit	Phe	Ala	AENA
40	NAG(OAc) <sub>3</sub>	-	Cit	Ala	Ala	AENA
41	NAG(OAc) <sub>3</sub>	-	Ala	Ala	Ala	AENA
42	PEG <sub>12</sub>	-	Cit	Ala	Pro	AENA
43	NAG(OAc) <sub>3</sub>	-	Ala	Cit	Ala	AENA
44a	NAG(OH) <sub>3</sub>	Phe	Cit	Phe	Pro	OSu
44b	PEG <sub>12</sub>	Phe	Cit	Phe	Pro	OSu
45a	NAG(OH) <sub>3</sub>	Phe	Cit	Ala	Pro	OSu
45b	PEG <sub>12</sub>	Phe	Cit	Ala	Pro	OSu
46	PEG <sub>12</sub>	Ala	Cit	Ala	Pro	OSu
47	PEG <sub>12</sub>	-	Cit	Ala	Pro	OSu
48	H <sub>2</sub> N	-	-	Phe	Pro	PGA
49	H <sub>2</sub> N	-	-	Leu	Pro	PGA
50	H <sub>2</sub> N	-	-	Val	Pro	PGA
51	H <sub>2</sub> N	-	-	Phe	(Nme)Ala	PGA
52	H <sub>2</sub> N	-	-	Asn(NH <sub>2</sub> )	Pro	PGA
53	H <sub>2</sub> N	-	-	Ser(OH)	Pro	PGA
54	H <sub>2</sub> N	-	-	Phe	Leu	PGA
55	H <sub>2</sub> N	-	-	Ala	Pro	PGA
56	H <sub>2</sub> N	-	-	Phe	Ala	PGA
57	H <sub>2</sub> N	-	-	-	Leu	PGA
58	H <sub>2</sub> N	-	-	Gly	Pro	PGA
59	H <sub>2</sub> N	-	-	-	Ala	PGA
60	PEG <sub>12</sub>	-	Ala	Cit	PABC	EDANS

\*где R<sup>6</sup>=-OH, A<sup>1</sup> оканчивается карбоксильной группой (т.е. -OH заменяет -NH-).

Структуры некоторых компонентов показаны на фиг. 1.

Пример 2. Скорость расщепления тетрапептидных линкеров.

Различные комбинации аминокислот, тетрапептиды, использовали для присоединения различных первых фрагментов (R<sup>5</sup>) к репортерной группе AENA второго соединения (R<sup>6</sup>) с получением субстратов для анализа (субстратов). Скорости расщепления пептидов оценивали посредством анализа фермента-

тивного расщепления субстратов в присутствии лизосомального экстракта крыс.

Репортерные группы сочетали с С-концом пептидных субстратов, как описано выше, для мониторинга методом спектроскопии в ультрафиолетовой и видимой частях спектра с целью исследования влияния аминокислотной последовательности на кинетику расщепления пептида методом ВЭЖХ. N-(2-аминоэтил)-4-нитроанилин (AENA) или N-(аминоэтил)-5-нафтиламин-1-сульфоновую кислоту (EDANS) использовали в качестве репортерных групп для мониторинга методом ВЭЖХ, поскольку в процессе отщепления от пептида или после этого не оказывалось влияние ни на поглощательную способность, ни на максимальную длину волны. N-конец каждого пептидного субстрата модифицировали метоксиполиэтиленгликолем (PEG<sub>12</sub>) или N-ацетилгалактозамином (NAG(OR)<sub>3</sub>) (фиг. 1).

Анализ ферментативного расщепления: Эксперименты по протеолитическому расщеплению проводили при постоянной концентрации субстрата (0,51 мкмоль) с применением лизосомального (ферментативного) экстракта печени (0,45 мкг/мкл) в 25 мМ растворе MES, забуференном до pH 5, содержащем 1% CHAPS и 1,8 мМ DTT, который инкубировали при температуре 37°C. Ферментативный экстракт активировали в присутствии DTT в течение 15 мин при температуре 37°C перед добавлением пептидных субстратов, меченных AENA. В различные временные точки вплоть до 26 ч отбирали аликвоты объемом 20 мкл и подкисляли до pH 3 с помощью TFA. Анализ фракций проводили методом ВЭЖХ с колонкой с обращенной фазой Aquasil C18 (250×4,6, Thermofisher, Уолтем, Массачусетс), контролировали при длине волны 390 и 335 нм для AENA и EDANS, соответственно. Элюирование проводили градиентом ацетонитрила и воды, забуференной 0,1% муравьиной кислотой. Измеряли образование немодифицированной репортерной молекулы. Для минимизации количества циклов замораживания - оттаивания лизосомальный экстракт разделяли на несколько аликвот перед хранением при температуре -80°C. Для каждого исследования использовали новую аликвоту немедленно после оттаивания. Лизосомальный экстракт получали от самок крыс линии Вистар посредством дифференциального центрифугирования в градиенте плотности (Graham et al., 2000). Концентрацию белка в экстракте лизосом определяли посредством стандартных протоколов анализа белка с помощью бицинониновой кислоты. Соединение 60 использовали для нормирования скорости между экспериментами (табл. 2-4). Средняя экспериментальная скорость, наблюдаемая для 60 в ходе нескольких анализов, составила 123,8 нмоль/ч. Нормированную скорость образца рассчитывали в виде: [(средняя скорость соединения 60 ÷ экспериментальная скорость соединения 60)] × экспериментальная скорость образца.

Скорость (также называемую быстротой или скоростью расщепления) экстраполировали в течение раннего линейного обмена (табл. 2). В настоящей заявке скорость определяют как линейную скорость образования репортерной группы при завершении, составляющем менее 50% (скорость ферментативного расщепления считали линейной при завершении, составляющем менее 50%). Для субстратов, у которых расщепление отклонялось от последовательной кинетики первого порядка, процент репортерной группы, высвободившийся в конечную точку ферментативного расщепления, использовали в качестве метрики для сравнения.

Данные табл. 2 свидетельствуют, что наиболее высокие скорости расщепления наблюдались в случае тетрапептидов, содержащих объемные гидрофобные аминокислоты в положениях A<sup>2</sup> и A<sup>4</sup>, объемные гидрофильные (полярные) аминокислоты в положении A<sup>3</sup> и пролин или лейцин в положении A<sup>1</sup>. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислота в положении A<sup>1</sup> представляет собой пролин.

Тетрапептидные линкеры, содержащие пролин в положении A<sup>1</sup>, характеризуются наивысшими скоростями. Если пролин соединений 30 (FCitAP (SEQ ID NO: 8)) и 23 (FCitFP (SEQ ID NO: 12)) заменяли на аланин, получая соединения 33 (FCitAA (SEQ ID NO: 7)) и 39 (FCitFA (SEQ ID NO: 10)), наблюдалось кардинальное уменьшение скорости и времени завершения ферментативного расщепления. Замена лейцина в положении A<sup>1</sup> в соединении 27 пролином, как показано в соединении 23, привела к значительному увеличению скорости в случае содержащего пролин тетрапептида. Небольшое увеличение скорости также наблюдалось в случае содержащего пролин соединения 24b по сравнению с содержащим лейцин соединением 25b.

Тетрапептиды, содержащие более большие (объемные) гидрофобные аминокислоты в положениях A<sup>2</sup> и A<sup>4</sup>, также, как правило, демонстрировали более высокие скорости. Увеличение объема боковой цепи в положении A<sup>2</sup> соединений 30, 26 и 23 увеличивало скорость ферментативного расщепления. Аналогично увеличение объема боковой цепи в положении A<sup>4</sup> увеличивало скорость ферментативного расщепления, как показано в случае соединений 31, 28 и 23, соответственно.

Тетрапептиды, содержащие объемные полярные (нейтральные или положительно заряженные) аминокислоты в положении A<sup>3</sup>, демонстрировали более высокие скорости расщепления, см. соединения 23, 24b, 32b и 34b.

N-метилирование соединения 39 в положении A<sup>1</sup> с получением соединения 29 привело к более высокой скорости и более быстрому завершению ферментативного расщепления (см. также фиг. 2).

Таблица 2

Скорость расщепления различных пептидных линкеров.  
Синтезировали различные пептиды и определяли скорость расщепления

Субстрат анализа	Последовательность пептида	SEQ ID NO:	Скорость (60), нмоль/ч	Скорость образца, нмоль/ч	Нормированная скорость, нмоль/ч	% высвобождения в конечной точке (21 ч)
(23) PEG <sub>12</sub> -FCitFP-AENA	FCitFP	12	123,6	192,7	192,9	*99,5
(24b) PEG <sub>12</sub> -FKFP- AENA	FKFP	16	134,7	134,8	123,9	***98,9
(25b) PEG <sub>12</sub> -FKFL- AENA	FKFL	15	123,5	117,0	117,4	**99,8
(26) NAG(OAc) <sub>3</sub> -FCitVP- AENA	FCitVP	13	144,3	119,5	102,5	97,8
(27) PEG <sub>12</sub> -FCitFL- AENA	FCitFL	11	123,5	94,5	94,7	**99,7
(28) NAG(OAc) <sub>3</sub> -VCitFP- AENA	VCitFP	19	137,8	84,3	75,8	*99,4
(29) PEG <sub>12</sub> -FCitF(Nme)A- AENA	FCitF(Nme)A	9	123,6	62,5	62,6	*97,3
(30) NAG(OAc) <sub>3</sub> -FCitAP- AENA	FCitAP	8	108,4	54,3	62,0	96,5
(31) PEG <sub>12</sub> -ACitFP- AENA	ACitFP	3	123,6	49,5	49,6	*98,9
(32b) PEG <sub>12</sub> -FNFP- AENA	FNFP	17	134,7	42,0	38,6	***99,3
(33) NAG(OH) <sub>3</sub> -FCitAA- AENA	FCitAA	7	137,8	-	-	68,5
(34b) PEG <sub>12</sub> -FDFP- AENA	FDFP	14	134,7	18,0	16,6	***66,5
(35) NAG(OAc) <sub>3</sub> -ACitAA- AENA	ACitAA	1	120,0	-	-	49,8
(36) NAG(OAc) <sub>3</sub> -CitAAA- AENA	CitAAA	5	100,9	-	-	**47,7
(37) NAG(OAc) <sub>3</sub> -ACitAP- AENA	ACitAP	2	108,0	11,8	13,5	44,2
(38) PEG <sub>12</sub> -GFLG- AENA	GFLG	18	127,4	10,0	9,7	**47,8
(39) NAG(OAc) <sub>3</sub> -FCitFA- AENA	FCitFA	10	108,4	-	-	40,5
(40) NAG(OAc) <sub>3</sub> -CitAA- AENA	CitAA		120,0	3,7	3,9	15,6
(41) NAG(OAc) <sub>3</sub> -AAA- AENA	AAA		120,0	1,6	1,6	8,2
(42) PEG <sub>12</sub> -CitAP- AENA	CitAP		135,2	1,0	0,9	**5,8
(43) NAG(OAc) <sub>3</sub> -ACA- AENA	ACitA		120,0	-	-	1,1

\* - конечная точка в момент времени 23 ч;

\*\* - конечная точка в момент времени 24 ч;

\*\*\* - конечная точка в момент времени 26 ч

(номера соединения и аминокислоты набраны жирным шрифтом).

В случае данного тетрапептида природа соединения R<sup>5</sup> не оказывала существенного влияния на скорость расщепления (скорость высвобождения немодифицированного H<sub>2</sub>N-R<sup>6</sup>). Соединения 22a и 23 являлись по существу эквивалентными в отношении скорости протеолитического расщепления (табл. 3). Аналогично было показано, что модифицированный ацетилом NAG(OAc)<sub>3</sub>, соединение 22a, оказывал незначительный эффект в отношении скорости ферментативного расщепления по сравнению с немодифицированным аналогом, соединением 22b (табл. 3).

Таблица 3

Скорость расщепления линкера FCitFP (SEQ ID NO: 12), содержащего различные N-концевые фрагменты (R<sup>5</sup>) (соединения 23, 22a и 22b)

Субстрат анализа	Скорость, нмоль/ч		
	Соединение 60	Образец	Нормированная
(23) PEG <sub>12</sub> -FCitFP-AENA	123,6	192,7	192,9
(22a) NAG(OAc) <sub>3</sub> -FCitFP-AENA	144,0	244,9	210,5
(22b) NAG(OH) <sub>3</sub> -FCitFP-AENA	137,8	223,7	201,0

Пример 3. Эффект аминокислот A<sup>1</sup> и A<sup>2</sup> в отношении скорости ферментативного расщепления дипептидов.

Получали дипептидные субстраты, содержащие аминоконек и С-концевые (R<sup>6</sup>) репортеры EDANS, для последующего анализа эффектов аминокислот A<sup>1</sup> и A<sup>2</sup> в отношении скорости расщепления. Дипептидные субстраты имитировали тетрапептидные линкеры после первого события расщепления тетрапептида между аминокислотами A<sup>2</sup> и A<sup>3</sup>. Дипептиды обрабатывали экстрактами, и продукты ферментативного расщепления анализировали, как описано выше. Как видно из табл. 4, дипептиды, содержащие пролин в положении A<sup>1</sup>, демонстрировали самую высокую скорость расщепления. В соответствии с данными табл. 2 скорость расщепления, как было обнаружено, зависела от аминокислоты в положении A<sup>1</sup> и от размера и заряда аминокислоты в положении A<sup>2</sup> (табл. 4). Пептиды с пролином в положении A<sup>1</sup> характеризовались наибольшей скоростью расщепления. Скорость расщепления также увеличивалась с увеличением размера и гидрофобности аминокислоты A<sup>2</sup>, как наблюдается в случае соединений 48, 49, 50, 52, 55 и 58.

Добавление фенилаланина к соединениям 57 и 59 (с получением соединений 54 и 56, соответственно) привело к значительному увеличению скорости ферментативного расщепления, несмотря на дополнительную аминокислоту.

Таблица 4  
Скорость расщепления дипептидных субстратов,  
модифицированных С-концевым EDANS

Название соединения	Последовательность субстрата	Скорость (60), нмоль/ч	Скорость образца, нмоль/ч	Нормированная скорость, нмоль/ч
(48) H <sub>2</sub> N-FP-PEG <sub>4</sub> -Glu(EDANS)-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -OH	F-P	145,0	448,5	383,0
(49) H <sub>2</sub> N-LP-PEG <sub>4</sub> -Glu(EDANS)-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -OH	L-P	127,6	349,1	338,7
(50) H <sub>2</sub> N-VP-PEG <sub>4</sub> -Glu(EDANS)-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -OH	V-P	135,2	213,5	195,5
(51) H <sub>2</sub> N-F(Nme)A-Glu(EDANS)-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -OH	F-(Nme)A	135,2	177,6	162,6
(52) H <sub>2</sub> N-NP-PEG <sub>4</sub> -Glu(EDANS)-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -OH	N-P	127,6	156,5	151,9
(53) H <sub>2</sub> N-SP-PEG <sub>4</sub> -Glu(EDANS)-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -OH	S-P	127,6	145,0	140,7
(54) H <sub>2</sub> N-FL-PEG <sub>4</sub> -Glu(EDANS)-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -OH	F-L	145,0	155,0	132,4
(55) H <sub>2</sub> N-AP-PEG <sub>4</sub> -Glu(EDANS)-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -OH	A-P	135,2	125,7	115,1
(56) H <sub>2</sub> N-FA-PEG <sub>4</sub> -Glu(EDANS)-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -OH	F-A	135,2	61,3	56,1
(57) H <sub>2</sub> N-L-PEG <sub>4</sub> -Glu(EDANS)-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -OH	L	135,2	58,3	53,3
(58) H <sub>2</sub> N-GP-PEG <sub>4</sub> -Glu(EDANS)-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -OH	G-P	127,6	14,4	13,9
(59) H <sub>2</sub> N-A-PEG <sub>4</sub> -Glu(EDANS)-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -OH	A	135,2	7,9	7,2

Пример 4. Анализ ферментативного расщепления с применением экстрактов из различных источников.

Наблюдаемые скорости расщепления не зависели от источника протеолитических ферментов. Порядок увеличения скорости (23>30>37>42) сохранялся при ферментативном расщеплении с применением коммерчески доступного экстракта S9 из печени крысы и человека (Xenotech LLC, Ленекса, Канзас) (табл. 5). Таким образом, скорости расщепления, как ожидается, являются аналогичными среди различных видов и типов клеток.

Таблица 5  
Относительная скорость субстратов в различных экстрактах

Название соединения	Последовательность субстрата (SEQ ID NO.)	Относительная* скорость		
		Лизосомальный экстракт	Экстракт S9 крысы	Экстракт S9 человека
(23) PEG <sub>12</sub> -FCFP-AENA	FCitFP (12)	100,0	100,0	100,0
(30) NAG(OAc) <sub>3</sub> -FCitAP-AENA	FCitAP (8)	32,1	28,3	45,7
(37) NAG(OAc) <sub>3</sub> -ACitAP-AENA	ACitAP (2)	7,0	3,3	7,1
(42) PEG <sub>12</sub> -CitAP-AENA	CitAP	0,5	0,6	1,7

\* - нормированная к соединению 23.

Пример 5. Анализ промежуточных продуктов ферментативного расщепления пептидного линкера.

Затем аликвоты из примеров 2 и 3 анализировали методом ВЭЖХ и масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением для обнаружения промежуточных продуктов ферментативного расщепления. Анализ позволил выявить множество положений, поддающихся расщеплению, для исходного эндопротеолитического события расщепления субстрата. Тетрапептидные линкеры, содержащие пролин в положении A<sup>1</sup> (22a, 22b, 23, 24b, 26, 28, 30, 31, 34b, 37 и 42), как представляется, не образовывали значительного количества промежуточного продукта H<sub>2</sub>N-Pro-R<sup>6</sup>, т.е., как представляется, значительное ферментативное расщепление между пролином в положении A<sup>1</sup> и аминокислотой в положении A<sup>2</sup> отсутствовало. Наблюдались исключительно A<sup>2</sup>-пролин-AENA или свободный AENA. Когда A<sup>1</sup> представлял собой аланин или лейцин, стадией, лимитирующей скорость реакции, являлся протеолиз последнего остатка. Промежуточные продукты ферментативного расщепления для соединений 39 (FCitFA (SEQ ID NO: 10)) и 29 (FCitF(Nme)A (SEQ ID NO: 9)) показаны на фиг. 2.

Пример 6. Высвобождение H<sub>2</sub>N-R<sup>6</sup> не нарушалось из-за стерического объема полимерного соединения в положении R<sup>6</sup>.

Тетрапептидные модифицирующие агенты, содержащие PEG, синтезировали с применением группы PEG в положении R<sup>5</sup> и активированного сложного эфира в положении R<sup>7</sup> (формула V). Мембраноактивные полиамины (см. ниже) модифицировали миРНК фактора VII, CDM-NAG и указанными тетрапептидными (45b, 46) или контрольными трипептидными (47) модифицирующими агентами, как было описано ранее (патенты США 8137695 и 8426554), с образованием динамического поликонъюгата полимера для доставки. Затем мышам инъецировали 1 мг/кг полимера, конъюгированного с 0,25 мг/кг миРНК. В день 5 образцы отбирали и анализировали в отношении фактора VII. Для нокдауна фактора VII требуется отщепление модифицирующего агента от полиамина при скорости, аналогичной ранее описанным мас-

кирующим агентам на основе CDM и маскирующим агентам на основе дипептида РАВС. Как показано в табл. 6, описанные тетрапептидные агенты (45b, 46) являлись эффективными модифицирующими агентами при применении в сочетании с ДРС-опосредованной доставкой миРНК (патенты США 8137695 и 8426554), что свидетельствует о быстром расщеплении в клетке для высвобождения мембраноактивного полиамина. Эффективный нокдаун *in vitro* также свидетельствует, что присутствие группы PEG не оказывало отрицательного влияния на ферментативное расщепление линкера *in vivo*. Для динамического конъюгата полимеров для доставки, модифицированных тетрапептидами, функционализированными PEG<sub>12</sub>, порядок увеличения нокдауна *in vivo* (45b>46>47) коррелировал с результатами кинетики *in vitro*. Валидация модели для оценки кинетики *in vitro* была подтверждена результатами, полученными в исследованиях на животных.

Таблица 6  
Нормированные уровни фактора VII после инъекции конъюгатов полимера с миРНК, нацеленных с помощью лабильного в отношении кислот CDM-NAG<sup>11</sup>

Модифицирующий агент PEG-пептид	Относительная активность F VII
(45b) PEG-FCitAP-OSu	40±06
(46) PEG-ACitAP-OSu	66±28
(47) PEG-CitAP-OSu	97±34

Пример 7. Анализ лабильности *in vivo*. Тетрапептиды анализировали для определения лабильности и обратимости *in vivo* посредством исследования линкеров в качестве модифицирующих агентов для ДРС-опосредованной доставки миРНК.

А) триггеры РНК-интерференции (миРНК).

Синтез миРНК: Контрольную миРНК следующих последовательностей синтезировали с применением стандартной фосфорамидитной химии.

Смысловая миР7: 5'-(NH<sub>2</sub>-C6)-GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)-3' SEQ ID NO: 4

Антисмысловая миР7: 5'dTsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcdTsdT-3' SEQ ID NO: 6

(нижний регистр, замена 2'-ОМе; f, замена 2'-F; d, замена 2'-дезоксид; и s, фосфотиоатная связь.)

Модификации амина миРНК дисульфидом DBCO: Модифицированную DBCO миРНК синтезировали посредством реакции 5'-аминомодифицированной миРНК с 1 массовым эквивалентом (мас. экв.) сложного эфира дибензоциклооктин-S-S-N-гидроксисукцинимидила (ALDRICH, каталожный № 761532) и 0,36 мас. экв. NaHCO<sub>3</sub> в воде при температуре 4°C в течение 16 ч. Затем модифицированную миРНК преципитировали посредством добавления 9 объемов этанола и инкубации при температуре -80°C в течение 2 ч. Преципитат растворяли в буфере ФБР, не содержащем РНКазу, и количественно определяли посредством измерения поглощения при длине волны 260 нм.

В) Синтез полимера:

RAFT-сополимер N-Вос-этоксипетиламинакрилата и втор-бутилакрилата (ЕАВ).

Готовили растворы AIBN (1,00 мг/мл) и RAFT-агента СРСРА (10,0 мг/мл) в бутилацетате. Молярный состав исходной мономерной смеси представлял собой 55% N-Вос-этоксипетиламинакрилата, 45% втор-бутилакрилата (№ CAS 2998-08-5). Теоретическая ММ (молекулярная масса) составила 100000.

N-Вос-этоксипетиламинакрилат (0,890 г, 3,43 ммоль), втор-бутилакрилат (0,391 г, 0,360 ммоль), раствор СРСРА (0,350 мл, 0,0125 ммоль), раствор AIBN (0,308 мл, 0,00188 ммоль) и бутилацетат (5,3 мл) вносили в стеклянную пробирку объемом 20 мл с магнитной мешалкой. Пробирку запечатывали крышкой с диафрагмой, и через раствор барботировали азот с применением длинного шприца со вторым шприцем в качестве выходного канала в течение 1 ч. Шприцы удаляли, и пробирку нагревали до температуры 80°C в течение 16 ч с применением масляной бани. Раствору позволяли охладиться до комнатной температуры и переносили в центрифужную пробирку объемом 50 мл перед добавлением в раствор гексана (35 мл). Раствор центрифугировали в течение 2 мин при 4400 об/мин. Слой супернатанта аккуратно сцеживали, и нижний слой (твердый или гелеподобный) промывали гексаном. Затем нижний слой повторно растворяли в DCM (7 мл), преципитировали в гексане (40 мл) и еще раз центрифугировали. Супернатант сцеживали, и нижний слой промывали гексаном перед тем как полимер высушивали под пониженным давлением в течение нескольких часов. Выход неочищенного ЕАВ-сополимера составил 0,856 г. Образцы неочищенного полимера отбирали для анализа методом многоугольного рассеяния излучения (multi-angle light scattering, MALS). Высушенный неочищенный сополимер растворяли в DCM (100 мг/мл). Добавляли гексан до момента достижения точки помутнения. Полученный в результате непрозрачный раствор центрифугировали. Нижний слой экстрагировали и полностью преципитировали в гексане. Фракцию центрифугировали, после чего сополимер выделяли и высушивали в вакууме. Выход выделенной фракции ЕАВ-сополимера составил 0,478 г. Образцы фракционированного сополимера отбирали для анализа методом <sup>1</sup>H-ЯМР (протонного ядерного магнитного резонанса) и MALS. Состав, определенный методом <sup>1</sup>H-ЯМР, представлял собой 61% N-Вос-этоксипетиламина и акрилата, 39% втор-бутилакрилата.

Анализ методом MALS: Приблизительно 10 мг сополимера растворяли в 0,5 мл 75% дихлорметана,

20% тетрагидрофурана, 5% ацетонитрила. Молекулярную массу и полидисперсность (PDI) измеряли с применением детектора мультиракурсного светорассеяния Wyatt Heleos II, присоединенного к аппарату для ВЭЖХ Shimadzu Prominence с применением колонки Jordi 5 мкм 7,8×300 Mixed Bed LS DVB. ММ неочищенного полимера: 59000 (PDI 1,3), ММ фракционированного полимера: 70000 (PDI:1,1).

Снятие защиты/диализ: Высушенные образцы обрабатывали 2 М HCl в уксусной кислоте (~7 мл) в течение 1 ч для удаления защитных групп ВОС. Затем реакционную смесь разводили 20 мл воды и оставляли перемешиваться в течение 10-15 мин. После этого фракции диализовали с применением трубок для диализа с ММ 3500 при высоком содержании соли, при высоком содержании соли и воды в течение 15 ч, 8 ч и 15ч соответственно. Затем фракции переносили в центрифужные пробирки объемом 50 мл и лиофилизировали в течение 3 дней или досуха. Высушенные образцы восстанавливали до концентрации 20 мг/мл водой для последующего исследования.

С) Образование обратимо модифицированного конъюгата миРНК с полиамином: Полиакрилат ЕАВ в 5 мМ буфере HEPES, pH 8,0 модифицировали 1,5 мас.% азидом PEG<sub>4</sub>, активированным N-гидроксисукцинимидилом (сложный эфир азидо-dPEG<sub>4</sub>-NHS от Quanta Biodesign), с целью обеспечения азидных групп для последующего присоединения миРНК. Затем модифицированный азидом полимер разводили до концентрации 5 мг/мл в основном HEPES, 60 мг/мл. К данному раствору добавляли 15 мг/мл (3 мас. экв.) указанных расщепляемых протеазой модифицирующих реактивов PEG (описанных в настоящей заявке тетрапептидных агентов или PEG<sub>12</sub>-FCit-PAVC-PNP (8426554)) для модификации 40-50% доступных аминогрупп. Через 1 ч к раствору полимера добавляли модифицированную DBCO миРНК фактора VII грызунов (0,25 мас. экв. относительно полимера). После инкубации в течение ночи конъюгаты дополнительно модифицировали посредством добавления молярного избытка относительно доступных аминогрупп производного N-ацетилгалактозамина CDM-NAG, NAG-A<sup>4</sup>-A<sup>3</sup>-A<sup>2</sup>-A<sup>1</sup>-NHS или NAG-ACit-PAVC-PNP (патент США 8426554, Rozema et al., 2015, Carlson et al., 2015) и инкубировали в течение 30 мин для обратимой модификации оставшихся ЕАВ-аминов полимера.

D) Анализ *in vivo*.

Мыши и процедуры анализа. Самцов крыс линии Вистар и самок мышей ICR в возрасте от 6 до 8 недель получали в компании Harlan Sprague-Dawley (Индианаполис, Индиана). Животных содержали в соответствии с протоколами по использованию животных, одобренными комитетом по содержанию и использованию животных Arrowhead Madison Inc. Грызунов содержали при цикле 12 ч света/темноты при свободном доступе к воде и пище (Harlan Teklad Rodent Diet, Harlan, Мэдисон, Висконсин). Животным вводили инъекции 1 мг/кг полимера, конъюгированного с 0,25 мг/кг миРНК. Образцы отбирали через 5 дней после инъекции.

Измерения активности FVII в сыворотке. Образцы сыворотки готовили путем забора крови посредством субмандибулярного кровозабора в микроцентрифужные пробирки, содержащие 0,109 М антикоагулянта цитрата натрия (1 объем), согласно стандартным процедурам. Активность FVII в сыворотке измеряли хромогенным способом с применением набора для анализа (BIOPHEN VII, Aniaga, Мейсон, Огайо) согласно рекомендациям производителя. Поглощение в результате развития колориметрической реакции измеряли с применением считывающего устройства для микропланшетов Tecan Safire-2 при длине волны 405 нм.

Данные табл. 7 демонстрируют, что полимеры для доставки на основе тетрапептидов, модифицированных DPC, являлись эффективными для доставки миРНК *in vivo*. Также тетрапептидные агенты являлись настолько же эффективными, как и ранее описанные модифицирующие агенты на основе дипептида PAVC. Конъюгаты, несущие 44a и 44b, которые содержат протеолитический тетрамер FCitFP (SEQ ID NO: 12), продемонстрировали активность, эквивалентную активности конъюгатов, в которых для нуклеиновой кислоты применяли расщепление, опосредованное PAVC (табл. 7). Эффективная доставка миРНК свидетельствует об эффективной модификации и нацеливании полиамина и успешном ферментативном расщеплении и высвобождении полимера в гепатоцитах после доставки в клетку.

Активность и функция *in vivo* коррелировали с данными о скорости ферментативного расщепления *in vitro*, причем полимеры для доставки на основе DPC, модифицированного FCitFP (SEQ ID NO: 12), демонстрировали лучшую доставку миРНК, чем полимеры для доставки на основе DPC, модифицированного FCitAP. Таким образом, данные о скорости ферментативного расщепления *in vitro* точно прогнозировали данные о ферментативном расщеплении и высвобождении *in vivo*.

Таблица 7

Нормированные уровни фактора VII после инъекции конъюгатов полимера с миРНК, нацеленных с помощью лабильных в отношении протеазы реактивов NAG

Модифицирующий агент	Относительная активность фактора VII
Активность у мышей	
(44a) PEG-FCitFP-OSu/(44b) NAG-FCitFP-OSu	27±06
(45a) PEG-FCitAP-OSu/(45b) NAG-FCitAP-OSu	48±14
PEG-FCit-PABC-PNP/NAG-ACit-PABC-PNP	24±11
Активность у крыс	
(44a) PEG-FCitFP-OSu/(44b) NAG-FCitFP-OSu	26±22
(45a) PEG-FCitAP-OSu/(45b) NAG-FCitAP-OSu	48±8
PEG-FCit-PABC-PNP/NAG-ACit-PABC-PNP	30±13

Пример 8. Полимеры для доставки на основе тетрапептидов-миметиков RGD и тетрапептидов DPC, модифицированных PEG.

А) Синтез амфипатических мембраноактивных полиаминов APN 1170-100A (100A) и APN 1203-006 (006).

Полимер	ММ (защищенный)	Теоретическая ММ (после снятия защиты)	PDI	% Введенных аминов	% Введенных алкилов	% Удаления концевых групп	Азиды/Полимер
APN 1170-100A	64430	45765	1,22	56	44	0	1,25
APN 1203-006	60330	43578	1,05	56	44	99	1,14

i) Материалы. 2,2'-Азобис-(2,4-диметилвалеронитрил) (V-65, инициатор радикальной полимеризации) заказывали в компании Wako Pure Chemical Industries. Пропилакрилат заказывали в компании Poly-science Inc. N-Вос-этоксипропиламинакрилат получали в компании WuXi Inc. 2-(додецилтиокарбонотиоилтио)-2-метилпропионовую кислоту (DDMAT, RAFT-агент), 1,1'-азобис-(циклогексанкарбонитрил) (ACHN), 1-этилпиперидингипофосфит (EHP), пентафторфенол, N,N'-дициклогексилкарбодиимид и N,N'-диизопропил-этиламин заказывали в компании Sigma Aldrich. O-(2-Аминоэтил)-O'-(2-азидоэтил)триэтиленгликоль (азидо-PEG<sub>4</sub>-амин) заказывали в компании Biomatrik Inc.

ii) RAFT-сополимер N-Вос-этоксипропиламинакрилата и пропилакрилата (EAP). Готовили растворы V-65 (2 мг/мл) и RAFT-агента DDMAT (10 мг/мл) в бутилацетате. Молярный состав исходной мономерной смеси представлял собой 52% N-Вос-этоксипропиламинакрилата, 48% пропилакрилата. Теоретическая ММ составила 75000. Молярное соотношение RAFT-агента (DDMAT) к инициатору (V-65) составило 6,67:1. N-Вос-этоксипропиламинакрилат (1,778 г, 6,86 ммоль), пропилакрилат (0,794 мл, 0,722 г, 6,33 ммоль), раствор DDMAT (1,215 мл, 0,0333 ммоль), раствор V-65 (0,621 мл, 0,005 ммоль) и бутилацетат (10,2 мл) вносили в стеклянную пробирку объемом 20 мл с магнитной мешалкой. Пробирку запечатывали крышкой с диафрагмой, и через раствор барботировали азот с применением длинной иглы со второй иглой в качестве выходного канала в течение 1 ч. Иглы удаляли, и пробирку нагревали до температуры 50°C в течение 24 ч при перемешивании. Раствору позволяли охладиться до комнатной температуры и переносили поровну в две центрифужные пробирки объемом 50 мл до добавления гексана (35 мл) в обе пробирки. Раствор центрифугировали в течение 2 мин при 4400 об/мин. Слой супернатанта аккуратно сцеживали, и нижний слой промывали гексаном. Затем нижний слой из каждой пробирки повторно растворяли в дихлорметане (7 мл), преципитировали в гексане (40 мл) и еще раз центрифугировали. Супернатант сцеживали, и нижний слой промывали гексаном перед тем как слои объединяли в одну центрифужную пробирку объемом 50 мл и полимер высушивали под пониженным давлением в течение нескольких часов. Выход неочищенного EAP-сополимера составил 2,1 г. Образцы сополимера отбирали для анализа методом многоугольного рассеяния излучения (MALS) и <sup>1</sup>H-ЯМР.

Полимер 006: Состав, определенный методом <sup>1</sup>H-ЯМР, являлся следующим: 55% N-Вос-этоксипропиламинакрилата и 45% пропилакрилата. ММ 006, определенная методом MALS, составила 58600 г/моль с индексом полидисперсности (PDI) 1,04.

Полимер 100A: Состав, определенный методом <sup>1</sup>H-ЯМР: 56% N-Вос-этоксипропиламинакрилата и 44% пропилакрилата. ММ, определенная методом MALS: 65150, PDI 1,122.

iii) Индуцированное радикалами удаление ω-концевой группы (исключительно полимер 006). Готовили растворы 1,1'-азобис-(циклогексанкарбонитрила) (ACHN, 20 мг/мл) и 1-этилпиперидингипофосфита (EHP, 100 мг/мл) в толуоле. EAP (2 г, 0,035 ммоль), ACHN (0,213 мл, 0,5 экв., 0,0174 ммоль), EHP (1,25 мл, 20 экв., 0,697 ммоль) и толуол (25,2 мл) вносили в стеклянную пробирку объемом 40 мл с магнитной мешалкой. Пробирку запечатывали крышкой с диафрагмой, и через раствор барботировали азот с применением длинной иглы со второй иглой в качестве выходного канала в течение 1 ч. Иглы удаляли, и пробирку нагревали до температуры 100°C в течение 2 ч. Раствору позволяли охладиться до комнатной температуры, и ~20 мл толуола удаляли посредством ротационного выпаривания.

ривания. Оставшийся раствор переносили в центрифужную пробирку объемом 50 мл и добавляли гексан (35 мл). Раствор центрифугировали в течение 2 мин при 4400 об/мин. Слой супернатанта аккуратно сцеживали, и нижний слой промывали гексаном. Затем нижний слой повторно растворяли в дихлорметане (7 мл), преципитировали в гексане (40 мл) и еще раз центрифугировали. Супернатант сцеживали, и нижний слой промывали гексаном перед тем как полимер высушивали под пониженным давлением в течение ~1 ч. Полимер растворяли в метил-трет-бутиловом эфире (80 мл) и переносили в делительную воронку. Затем раствор промывали 3×30 мл объемов H<sub>2</sub>O с последующей промывкой 3×30 мл объемов насыщенного NaCl. Затем раствор полимера высушивали над сульфатом натрия и фильтровали через вакуум-фильтры 0,45 мкм GHP. МТВЕ удаляли посредством ротационного выпаривания в высоком вакууме. Отбирали образец для контроля удаления концевой группы с применением УФ-спектрофотометра. Удаление концевой группы согласно расчету составило 99%. Отбирали образцы для анализа методом MALS, ГХ-ПИД (газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором) и <sup>1</sup>H-ЯМР. Состав 006, определенный методом <sup>1</sup>H-ЯМР, являлся следующим: 55% N-Вос-этоксипропиламинакрилата и 45% пропиламинакрилата. Конверсия 006, определенная методом ГХ-ПИД, составила 81,4% для N-Вос-этоксипропиламинакрилата и 77,3% для пропиламинакрилата. Конверсия 100А, определенная методом ГХ-ПИД, составила 87% для N-Вос-этоксипропиламинакрилата и 83% для пропиламинакрилата. ММ полимера 006, определенная методом MALS, составила 57700 г/моль с индексом полидисперсности (PDI) 1,06.

iv) Активация α-концевой группы пентафторфенолом. ЕАР-полимер (2 г, 0,0347 ммоль), пентафторфенол (63,8 мг, 0,3466 ммоль), N,N'-дициклогексилкарбодимид (71,5 мг, 0,3466 ммоль) и дихлорметан (40 мл) вносили в круглодонную колбу объемом 100 мл с магнитной мешалкой. Колбу закупоривали резиновой мембраной, и через систему продували азот в течение 15 мин. Раствор перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре. Добавляли дополнительный пентафторфенол (63,8 мг, 0,3466 ммоль) и N,N'-дициклогексилкарбодимид (71,5 мг, 0,3466 ммоль), колбу закупоривали резиновой мембраной, и через систему продували азот в течение 15 мин. Раствор перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Полимер преципитировали гексаном (~10× объем), центрифугировали, и растворитель сцеживали. Полимер растворяли в минимальном количестве дихлорметана, преципитировали гексаном (~10× объем), центрифугировали, и растворитель сцеживали. Полимер растворяли в минимальном количестве этилацетата, преципитировали гексаном (~10× объем), центрифугировали, и растворитель сцеживали. Преципитат полимера высушивали в высоком вакууме до тех пор, пока твердое вещество не достигло постоянной массы.

v) Функционализация α-концевой группы азидом. В круглодонной колбе объемом 100 мл, оборудованной резиновой мембраной и магнитной мешалкой, полимер с предшествующей стадии (1,9 г, 0,0329 ммоль) растворяли в дихлорметане (38 мл). В колбу при перемешивании добавляли азидо-PEG<sub>4</sub>-амин (86,4 мг, 0,3293 ммоль) и N,N'-диизопропилэтиламин (46,8 мг, 63,1 мкл, 0,3622 ммоль). Через систему продували азот в течение 15 мин, и реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение ночи. В колбу добавляли дополнительный азидо-PEG<sub>4</sub>-амин (86,4 мг, 0,3293 ммоль) и N,N'-диизопропилэтиламин (46,8 мг, 63,1 мкл, 0,3622 ммоль), через систему продували газообразный N<sub>2</sub>, и реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Полимер преципитировали гексаном (~10× объем), центрифугировали, и растворитель сцеживали. Полимер растворяли в минимальном количестве дихлорметана, преципитировали гексаном (~10× объем), центрифугировали, и растворитель сцеживали. Преципитат полимера высушивали в высоком вакууме до тех пор, пока твердое вещество не достигло постоянной массы. Выход функционализированного азидом ЕАР составил 1,77 г. Образцы сополимера отбирали для анализа методом многоугольного рассеяния излучения (MALS) и <sup>1</sup>H-ЯМР.

Полимер 006: Состав, определенный методом <sup>1</sup>H-ЯМР, являлся следующим: 56% N-Вос-этоксипропиламинакрилата и 44% пропиламинакрилата. ММ, определенная методом MALS, составила 60330 г/моль с индексом полидисперсности (PDI) 1,05.

Полимер 100А: Состав, определенный методом <sup>1</sup>H-ЯМР, являлся следующим: 56% N-Вос-этоксипропиламинакрилата и 44% пропиламинакрилата. ММ, определенная методом MALS: 64430 с PDI 1,217.

Моноазид: Термин "моноазид" или "моноазидный полимер" указывает, что были проведены стадии D и E вышеописанных процедур, и азидную группу сочетали с α-концевой группой полимера.

vi) Снятие защиты Вос и фильтрация тангенциальным потоком. В круглодонную колбу объемом 100 мл к функционализированному азидом ЕАР-сополимеру (1,67 г, 0,0277 ммоль) добавляли 2 М HCl в уксусной кислоте (28 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Добавляли деионизированную H<sub>2</sub>O (56 мл) и перемешивали в течение 10 мин. Затем раствор немедленно заменяли 10 эквивалентными объемами 5 мМ фосфатно-цитратного буфера (pH 5) с применением модуля фильтров mPES 30 кДа 115 см<sup>2</sup>, оборудованного системой фильтрации тангенциальным потоком (KrosFlo Research). Затем раствор концентрировали с применением аппарата до конечного объема 55 мл. Было зафиксировано значение pH 5,1. Образцы отбирали для определения концентрации методом паровой газовой хроматографии. Аликвоту лиофилизировали, а затем восстанавливали в 33,3% ацетонитриле-d в оксиде дейтерия до концентрации 10 мг/мл для анализа методом <sup>1</sup>H-ЯМР. Рассчитанная теоре-

тическая ММ составила 43026 и 45765 г/моль для 006 и 100А соответственно.

vii) С применением аналогичных методик можно с легкостью получить аналогичные амфипатические мембраноактивные полиамины. В частности, амфипатические мембраноактивные полиамины с молекулярной массой (ММ) 40-120 к (защищенные), от 25 до 85 к (после снятия защиты), с PDI от 1,03 до 1,2 и соотношением мономеров от 35% мономера с амином/65% мономера с гидрофобной группой до 70% мономера с амином/30% мономера с гидрофобной группой.

В) Синтез APN 1095-126 (126).

ММ (защищенные)	Теоретическая ММ (после снятия защиты)	PDI	% Встраивания амина	% Встраивания алкила	% Удаления концевой группы	Азидов на полимер
66670	47606	1,11	56	44	0	4,1

При синтезе APN 1095-126 использовали дитиобензоатный фрагмент RAFT-агента и RAFT-инициатор AIBN вместо тритиокарбонатного фрагмента RAFT-агента и RAFT-инициатора V-65, которые применяли для синтеза 100А и 006. Условия для данной полимеризации требовали отличных температур и времен нагрева. Помимо этого, для данного полимера требовалось фракционное осаждение. Полимер не являлся эндкепированным, но способ добавления азидов являлся таким же, что и в случае 100А и 006.

i) Материалы. Пропилакрилат заказывали в компании Polysciences Inc. N-Вос-этоксипропиламинакрилат получали в компании WuXi Inc. 4-циано-4-(фенилкарбонотиоилтио) пентановую кислоту (CPCPA, RAFT-агент), 2,2'-азобис-(2-метилпропионитрил) (AIBN, инициатор радикальной полимеризации), пентафторфенол, N,N'-дициклогексилкарбодимид и N,N'-диизопропилэтиламин заказывали в компании Sigma Aldrich. O-(2-Аминоэтил)-O'-(2-азидоэтил)триэтиленгликоль (азидо-PEG<sub>4</sub>-амин) заказывали в компании Biomatrik Inc.

ii) RAFT-сополимер N-Вос-этоксипропиламинакрилата и пропилакрилата (EAP). Следующую процедуру повторяли 8 раз с получением в совокупности 4,5513 г фракционированного EAP-сополимера. Готовили растворы AIBN (1,035 мг/мл) и RAFT-агента CPCPA (50,54 мг/мл) в бутилацетате. Молярный состав исходной мономерной смеси являлся следующим: 52% N-Вос-этоксипропиламинакрилата, 48% пропилакрилата. Теоретическая ММ составила 75000. Молярное соотношение RAFT-агента (CPCPA) к инициатору (AIBN) составило 6,67:1.

N-Вос-этоксипропиламинакрилат (1,7879 г, 6,9 ммоль), пропилакрилат (0,774 мл, 0,7121 г, 6,24 ммоль), раствор CPCPA (0,184 мл, 0,0333 ммоль), раствор AIBN (0,793 мл, 0,005 ммоль) и бутилацетат (11,02 мл) вносили в стеклянную пробирку объемом 20 мл с магнитной мешалкой. Пробирку запечатывали крышкой с диафрагмой, и через раствор барботировали азот с применением длинной иглы со второй иглой в качестве выходного канала в течение 1 ч. Иглы удаляли, и пробирку нагревали до температуры 50°C в течение 24 ч при перемешивании. Раствору позволяли охладиться до комнатной температуры и переносили в центрифужную пробирку объемом 50 мл перед добавлением гексана (35 мл). Раствор центрифугировали в течение 2 мин при 4400 об/мин. Слой супернатанта аккуратно сцеживали, и нижний слой промывали гексаном. Затем нижний слой из каждой пробирки повторно растворяли в дихлорметане (7 мл), преципитировали в гексане (40 мл) и еще раз центрифугировали. Супернатант сцеживали, и нижний слой промывали гексаном перед тем как полимер высушивали под пониженным давлением в течение нескольких часов. Выход неочищенного EAP-сополимера составил 1,734 г. Образцы неочищенного сополимера отбирали для анализа методом многоуглового рассеяния излучения (MALS) и <sup>1</sup>H-ЯМР. Высушенный неочищенный сополимер растворяли в DCM (100 мг/мл). Добавляли гексан до момента достижения точки помутнения. Полученный в результате непрозрачный раствор центрифугировали. Нижний слой экстрагировали и полностью преципитировали в гексане. Фракцию центрифугировали, после чего сополимер выделяли и высушивали в вакууме. Выход выделенной фракции EAP-сополимера составил 0,602 г. Образцы фракционированного сополимера отбирали для анализа методом <sup>1</sup>H-ЯМР и MALS. Состав, определенный методом <sup>1</sup>H-ЯМР, являлся следующим: 56% N-Вос-этоксипропиламинакрилата и 44% пропилакрилата. ММ, определенная методом MALS, составила 62010 г/моль с индексом полидисперсности (PDI) 1,14.

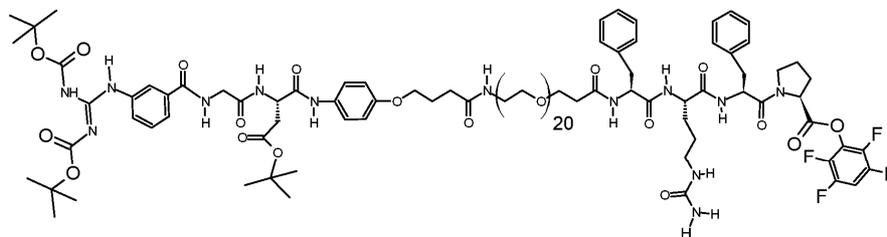
iii) Активация α-концевой группы пентафторфенолом. EAP-полимер (2 г, 0,0347 ммоль), пентафторфенол (63,8 мг, 0,3466 ммоль), N,N'-дициклогексилкарбодимид (71,5 мг, 0,3466 ммоль) и дихлорметан (40 мл) вносили в круглодонную колбу объемом 100 мл с магнитной мешалкой. Колбу закупоривали резиновой мембраной, и через систему продували азот в течение 15 мин. Раствор перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре. Добавляли дополнительный пентафторфенол (63,8 мг, 0,3466 ммоль) и N,N'-дициклогексилкарбодимид (71,5 мг, 0,3466 ммоль), колбу закупоривали резиновой мембраной, и через систему продували азот в течение 15 мин. Раствор перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Полимер преципитировали гексаном (~10× объем), центрифугировали, и растворитель сцеживали. Полимер растворяли в минимальном количестве дихлорметана, преципитировали гексаном (~10× объем), центрифугировали, и растворитель сцеживали. Полимер растворяли в минимальном количестве этилацетата, преципитировали гексаном (~10× объем), центрифугировали, и растворитель сцеживали. Преципитат полимера высушивали в высоком вакууме до тех пор, пока твердое вещество не достигло постоянной массы.

iv) Функционализация  $\alpha$ -концевой группы азидом. В круглодонной колбе объемом 100 мл, оборудованной резиновой мембраной и магнитной мешалкой, полимер с предшествующей стадии (1,9 г, 0,0329 ммоль) растворяли в дихлорметане (38 мл). В колбу при перемешивании добавляли азидо-PEG<sub>4</sub>-амин (86,4 мг, 0,3293 ммоль) и N,N-диизопропил-этиламин (46,8 мг, 63,1 мкл, 0,3622 ммоль). Через систему продували азот в течение 15 мин, и реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение ночи. В колбу добавляли дополнительный азидо-PEG<sub>4</sub>-амин (86,4 мг, 0,3293 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламин (46,8 мг, 63,1 мкл, 0,3622 ммоль), через систему продували газообразный N<sub>2</sub>, и реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Полимер преципитировали гексаном (~10× объем), центрифугировали, и растворитель сцеживали. Полимер растворяли в минимальном количестве дихлорметана, преципитировали гексаном (~10× объем), центрифугировали, и растворитель сцеживали. Преципитат полимера высушивали в высоком вакууме до тех пор, пока твердое вещество не достигло постоянной массы. Выход функционализированного азидом ЕАР составил 1,77 г. Образцы сополимера отбирали для анализа методом многоуглового рассеяния излучения (MALS) и <sup>1</sup>H-ЯМР. Состав, определенный методом <sup>1</sup>H-ЯМР, являлся следующим: 56% N-Вос-этоксизтиламинакрилата и 44% пропилакрилата. ММ, определенная методом MALS, составила 66670 г/моль с индексом полидисперсности (PDI) 1,11.

v) Снятие защиты Вос и фильтрация тангенциальным потоком. В круглодонную колбу объемом 100 мл к функционализированному азидом ЕАР-сополимеру (1,67 г, 0,0277 ммоль) добавляли 2 М HCl в уксусной кислоте (28 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Добавляли деионизированную H<sub>2</sub>O (56 мл) и перемешивали в течение 10 мин. Затем раствор немедленно заменяли 10 эквивалентными объемами 5 мМ фосфатно-цитратного буфера (pH 5) с применением модуля фильтров mPES 30 кДа 115 см<sup>2</sup>, оборудованного системой фильтрации тангенциальным потоком (KrosFlo Research). Затем раствор концентрировали с применением аппарата до конечного объема 55 мл. Было зафиксировано значение pH 5,1. Образцы отбирали для определения концентрации методом парофазной газовой хроматографии. Аликвоту лиофилизировали, а затем восстанавливали в 33,3% ацетонитриле-d в оксиде дейтерия до концентрации 10 мг/мл для анализа методом <sup>1</sup>H-ЯМР. Рассчитанная теоретическая ММ составила 43026 г/моль.

С) Синтез агентов RGD-PEG<sub>n</sub>-FCitFP-TFP и PEG<sub>n</sub>-FCitFP-TFP. Предшественник модифицирующего агента (di-Boc)RGD(OtBu)-APBA-PEG<sub>n</sub>-FCitFP-COOH получали с применением твердофазного синтеза на основе общей химии Fmoc с применением смолы 2-Cl-Trt, предварительно нагруженной Fmoc-пролин-ОН. К смоле-Pro-Fmoc последовательно добавляли (после снятия защиты Fmoc на каждой стадии): Fmoc-Phe-ОН, Fmoc-Cit-ОН, Fmoc-Phe-ОН, Fmoc-NH-PEG<sub>n</sub>-COOH, 4-(N-Fmoc-п-аминофенокси)-масляную кислоту (APBA), Fmoc-Asp(OtBu)-ОН, Fmoc-Gly-ОН и diboc-m-гуанидино бензойную кислоту.

(diboc)RGD(OtBu)-APBA-PEG<sub>n</sub>-FCitFP-COOH (458 мг, 0,200 ммоль) и TFP (66,5 мг, 0,400 ммоль) растворяли в безводном DCM (5,0 мл) и охлаждали до температуры 0°C на ледяной бане при перемешивании в атмосфере аргона. Добавляли EDC (77 мг, 0,400 ммоль), и реакционную смесь перемешивали на ледяной бане при температуре 0°C в течение 30 мин, прохождение реакции контролировали методом ТСХ (тонкослойной хроматографии, 8,5:1,5 CHCl<sub>3</sub>:MeOH); реакция была завершена через 90 мин, причем какое-либо исходное вещество не обнаруживалось методом ТСХ. Реакционную смесь разводили DCM до общего объема 100 мл, промывали 3×40 мл DI H<sub>2</sub>O (pH 5) и промывали 1×40 мл водного насыщенного раствора NaCl. Затем органический слой высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и концентрировали посредством ротационного выпаривания с получением 448 мг (выход 92%) коричнево-оранжевой пены. Структуру подтверждали методом <sup>1</sup>H-ЯМР и МС-ИЭР (масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением, реакция показана выше для PEG<sub>20</sub> (n=20)).

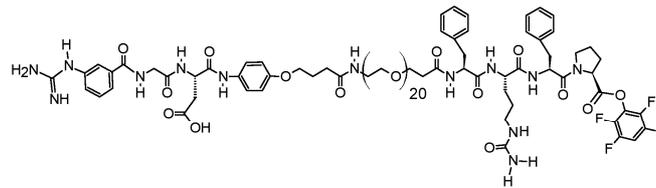


(diboc)RGD(OtBu)-APBA-PEG<sub>n</sub>-FCitFP-TFP

(показано для n = 20)

(diboc)RGD(OtBu)-PEG<sub>n</sub>-FCitFP-TFP (497 мг, 0,204 ммоль) растворяли в смеси [9,25:0,75:0,50] TFA:H<sub>2</sub>O:тиоанизол (5,0 мл) и перемешивали при комнатной температуре в закрытой колбе в течение 45 мин. Завершение реакции подтверждали методом МС, масс-спектрометрии (ИЭР, ионизация электрораспылением, отрицательное сканирование, 300-3000); наблюдаемые массы, относящиеся к исходному ве-

шеству или промежуточным продуктам с частично снятой защитой, отсутствовали. Затем реакционную смесь преципитировали в 45 мл диэтилового эфира, центрифугировали, супернатант сливали, промывали 2×10 мл диэтилового эфира и высушивали в высоком вакууме в течение ночи. Конечный продукт очищали методом препаративной ВЭЖХ с применением полупрепаративной колонки Thermo Aquasil C18 5 мкм с подвижными фазами 0,1% TFA в H<sub>2</sub>O и ACN. Каждая инъекция представляла собой 50 мг неочищенного вещества, растворенного в 3,0 мл 0,1% TFA в [61:39] H<sub>2</sub>O:ACN, которую анализировали при градиенте (указан в %B) 39-(5)-39-(35)-43-(5)-95-(10)-95-(2)-39-(5)-39. Каждый образец для инъекции готовили (растворяли) в течение 15 мин перед инъектированием, и положительные фракции объединяли в одной колбе и хранили охлажденными в морозильной камере до тех пор, пока не была выполнена последняя инъекция в день. Затем положительные фракции концентрировали на ротационном испарителе при температуре бани 32°C досуха, затем прогоняли 2× ACN/толуол, затем 3× ACN, после чего высушивали в высоком вакууме в течение ночи. Из инъектированных 257 мг неочищенного вещества в виде чистого вещества выделяли 180 мг (70%) (реакция показана выше для PEG<sub>20</sub> (n=20)).

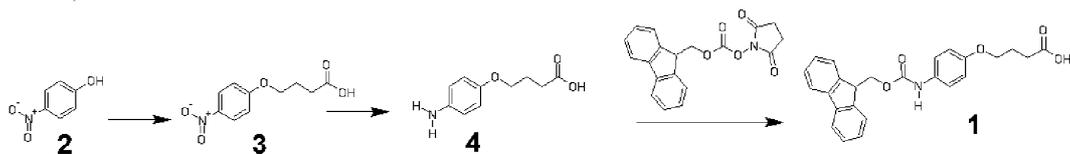
RGD-PEG<sub>n</sub>-FCitFP-TFP

(показано для n = 20)

Синтез 4-(N-Фмос-п-аминофенокси)-масляной кислоты 1. п-нитрофенол (2) (7,5 г, 53,9 ммоль) объединяли с этил-4-бромбутиратом (8,45 мл, 59 ммоль) и K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7,5 г, 54 ммоль) в DMF (75 мл). Смесь перемешивали в течение 2 ч при температуре 100°C. DMF удаляли, и неочищенный продукт разводили в смеси в соотношении 3:1 2 н. NaOH и метанола и перемешивали в течение 4 ч при к.т. Реакционную смесь подкисляли 6 М HCl. Белый преципитат собирали с получением 4-(п-нитрофенилокси)-масляной кислоты 3: (10,9 г, выход 90%).

4-(п-нитрофенилокси)-масляную кислоту 3 (37,1 г, 165 ммоль) растворяли в MeOH (1 л) с формиатом аммония (35 г, 555 ммоль) и добавляли 10% Pd/C (типа Дегусса) (3,5 г). Смесь нагревали в обратном холодильнике при температуре 65°C в течение ночи. Реакционную смесь фильтровали через целит с получением красновато-коричневого твердого вещества продукта 4-(п-аминофенилокси)-масляной кислоты 4 (30,5 г, выход 95%).

4-(п-аминофенилокси)-масляную кислоту 4 (5,1 г, 26 ммоль) растворяли в смеси в соотношении 6:4 водного насыщенного NaHCO<sub>3</sub> (3,36 г, 40 ммоль) в H<sub>2</sub>O (450 мл) и THF (300 мл) с получением белой густой суспензии. Добавляли Фмос-OSu (8,82 г, 26,1 ммоль), и реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч. Ацетон удаляли, реакцию подкисляли (HCl), и белый с металлическим оттенком преципитат собирали и растирали в 1 н. HCl с получением 9,6 г продукта 4-(N-Фмос-п-аминофенокси)-масляной кислоты 1 (выход 88%).



diBoc-m-гуанидино-бензойную кислоту 5 синтезировали согласно публикации Riches AG et al., Tetrahedron (2012) 68, p. 9448-9455.

Модифицирующие агенты PEG<sub>n</sub>-FCitFP получали с применением аналогичной химии.

Д) Маскировка (модификация) полимера. Проводили реакцию моноазидного полимера с RGD-агентом, расщепляемым протеазой (RGD-PEG<sub>8</sub>-ACit-PNP, RDG-PEG<sub>8</sub>-FCitFP-TFP, RGD-PEG<sub>15</sub>-FCitFP-TFP, RGD-PEG<sub>19</sub>-FCitFP-TFP или RGD-PEG<sub>20</sub>-FCitFP-TFP), при массовых соотношениях, составляющих 1:0,125, 1:0,25, 1:0,5, 1:1, 1:1,5, 1:2 (полимер:RGD), в 50 мМ буфере HEPES, pH 8,5 в течение 4 ч при к.т. Затем проводили реакцию модифицированного полимера с RGD-агентом, расщепляемым протеазой (PEG<sub>6</sub>-ACit-PABC-PNP, PEG<sub>12</sub>-ACit-PABC-PNP, PEG<sub>12</sub>-FCit-PABC-PNP, PEG<sub>12</sub>-FCitFP-TFP), при массовом соотношении 1:8 (полимер:PEG) в 50 мМ буфере HEPES, pH 8,5 в течение 2 ч при к.т. К модифицированному полимеру в 100 мМ буферном растворе ацетата натрия-уксусной кислоты, pH 5,0 добавляли алкин-триггер РНКи при массовом соотношении 1:0,3 (полимер:алкин-триггер РНКи) в течение 5 дней при к.т. Полный конъюгат очищали с помощью TFF и определяли эффективность конъюгации.

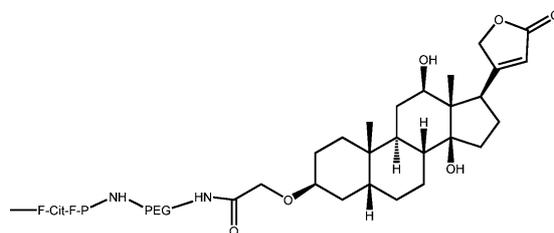
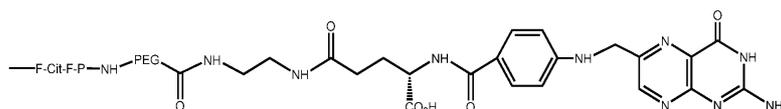
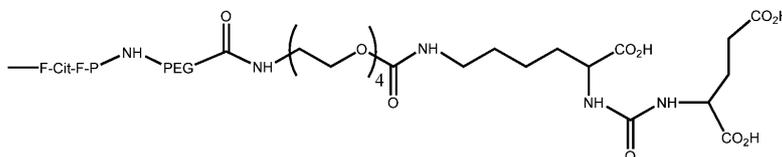
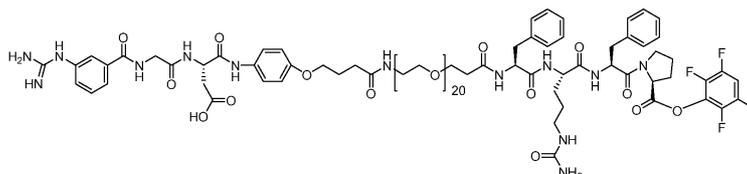
Е) Оценка доставки *in vivo* с применением полимеров для доставки на основе DPC, модифицированного тетрапептидом. Мышей, несущих опухоль RCC почки, лечили одной инъекцией в хвостовую вену изотоничной глюкозы (G1) или указанного Hif2α-ITG-DPC (Hif2α-ITG-DPC=конъюгат триггера РНКи Hif2α и полимера для доставки). Полимер для доставки являлся модифицированным лигандом

RGD и модифицирующими агентами PEG). Мышам проводили эвтаназию через 72 ч после инъекции, и суммарную РНК получали из опухоли почки с применением реактива Trizol согласно рекомендациям производителя. Относительные уровни мРНК *HiF2 $\alpha$*  определяли методом РВ-кПЦР (количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией), как описано ниже, и сравнивали с мышами, получавшими лечение исключительно буфером для доставки (изотоничной глюкозой) (табл. 8).

Таблица 8

Идентиф. номер	мкг	мкг полимера	Агент RGD			Агент PEG	Относит. экспрессия, день 4		
			Природа	Уровень модиф.	RGD/полимер		средн.	Низкая вероятность ошибок	Высокая вероятность ошибок
-							1,000	0,060	0,064
AD01031	80	280	RGD-PEG8-HyNic			PEG12-AC-PABC	0,300	0,074	0,098
AD01031	80	280	RGD-PEG8-AC-PABC	0,4 $\times$		PEG6-AC-PABC	0,311	0,055	0,067
AD01214	80	280	RGD-PEG8-HyNic			PEG12-FC-PABC	0,489	0,022	0,023
AD01214	80	280	RGD-PEG8-HyNic			PEG12-FCFP-TFP	0,210	0,032	0,038
AD01214	80	280	RGD-PEG-AC-PABC			PEG6-AC-PABC	0,360	0,019	0,021
AD01214	80	280	RGD-PEG8-ACFP	1 $\times$		PEG6-AC-PABC	0,288	0,005	0,005
AD01214	115	375	RGD-PEG8-HyNic			PEG12-FCFP-TFP	0,258	0,033	0,038
AD01214	112,5	375	RGD-PEG15-FCFP-TFP	0,5 $\times$	10,8	PEG12-AC-PABC	0,193	0,046	0,061
AD01214	112,5	375	RGD-PEG15-FCFP-TFP	1 $\times$	16,1	PEG12-AC-PABC	0,182	0,007	0,008
AD01214	112,5	375	RGD-PEG15-FCFP-TFP	2 $\times$	29,0	PEG12-AC-PABC	0,182	0,031	0,038
AD01214	112,5	375	RGD-PEG19-FCFP-TFP	0,5 $\times$	10,7	PEG12-AC-PABC	0,163	0,023	0,027
AD01214	112,5	375	RGD-PEG19-FCFP-TFP	1 $\times$	18,5	PEG12-AC-PABC	0,114	0,011	0,012
AD01214	112,5	375	RGD-PEG19-FCFP-TFP	2 $\times$	31,1	PEG12-AC-PABC	0,182	0,047	0,063
AD01214	112,5	375	RGD-PEG15-FCFP-TFP	1 $\times$		PEG12-FCFP-TFP	0,148	0,079	0,169
AD01214	112,5	375	RGD-PEG19-FCFP-TFP	1 $\times$		PEG12-FCFP-TFP	0,188	0,026	0,030
AD01214	112,5	300	RGD-PEG8-HyNic			PEG12-AC-PABC	0,357	0,069	0,086
AD01214	112,5	375	RGD-PEG20-FCFP-TFP	0,125 $\times$	1,9	PEG12-AC-PABC	0,169	0,052	0,075
AD01214	112,5	375	RGD-PEG20-FCFP-TFP	0,25 $\times$	3,4	PEG12-AC-PABC	0,168	0,029	0,035
AD01214	112,5	375	RGD-PEG20-FCFP-TFP	0,5 $\times$	6,6	PEG12-AC-PABC	0,130	0,004	0,005
AD01214	112,5	375	RGD-PEG20-FCFP-TFP	1 $\times$	13	PEG12-AC-PABC	0,121	0,016	0,018
AD01214	112,5	375	RGD-PEG20-FCFP-TFP	1,5 $\times$	20	PEG12-AC-PABC	0,135	0,018	0,020

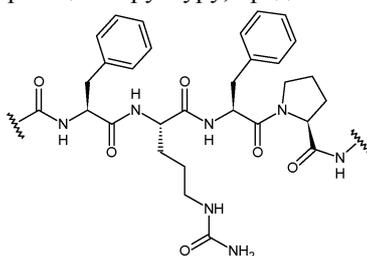
Пример 9. Дополнительные структуры, иллюстрирующие практическую ценность описанных тетрапептидных линкеров.

R<sup>5</sup>-FcItFP - дигоксин (молекула лекарственного средства)R<sup>5</sup>-FcItFP - фолат (лиганд рецептора клетки)R<sup>5</sup>-FcItFP - PSMA

RGD-FcItFP - реакционноспособная группа TFT (рецептор клетки (модифицирующий агент, содержащий миметик RGD)).

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Тетрапептидный линкер, содержащий структуру, представленную формулой:



где указанный тетрапептидный линкер соединен с:

- первым соединением, которое содержит нацеливающую группу, содержащую пептид, и
- вторым соединением, содержащим полинуклеотид.

2. Тетрапептидный линкер по п.1, характеризующийся тем, что указанный тетрапептидный линкер соединен с первым соединением и/или со вторым соединением амидной связью.

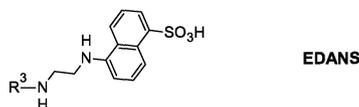
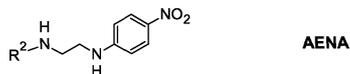
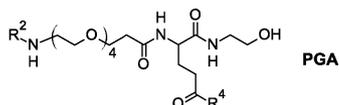
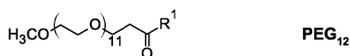
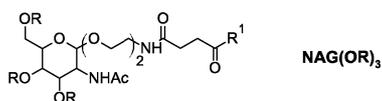
3. Тетрапептидный линкер по п.1, характеризующийся тем, что указанный пептид содержит лиганд рецептора клетки, обладающий аффинностью к интегрину.

4. Тетрапептидный линкер по п.3, характеризующийся тем, что интегрин представляет собой интегрин  $\alpha\beta3$ .

5. Тетрапептидный линкер по п.3, характеризующийся тем, что интегрин представляет собой интегрин  $\alpha\beta6$ .

6. Тетрапептидный линкер по п.3, характеризующийся тем, что лиганд рецептора клетки, обладающий аффинностью к интегрину, содержит RGD-содержащий пептид.

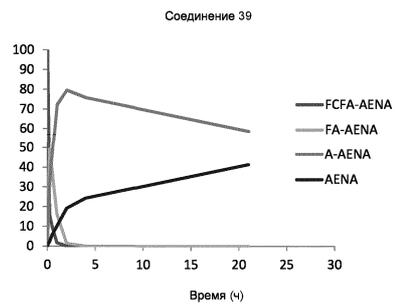
7. Тетрапептидный линкер по п.1, характеризующийся тем, что полинуклеотид представляет собой триггер РНКи.



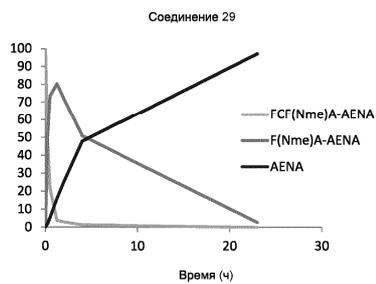
R = ацетил или H,  
 R<sup>1</sup> = A<sup>4</sup> или A<sup>3</sup> или A<sup>3-4</sup>  
 R<sup>2</sup> = A<sup>1</sup>  
 R<sup>3</sup> = PGA или PABC  
 R<sup>4</sup> = EDANS

Фиг. 1

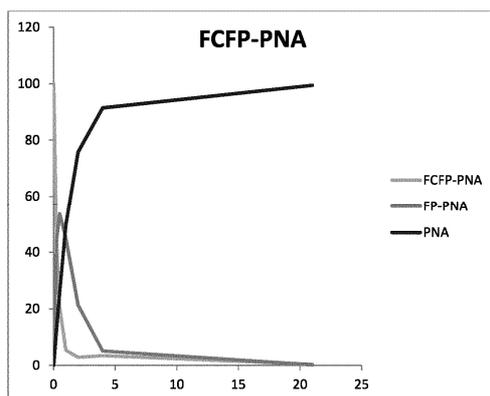
A.



B.



Фиг. 2



Фиг. 3

