

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190028** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.10.29

(22) Дата подачи заявки
2009.11.10

(51) Int. Cl. *A61K 47/28* (2006.01)
A61K 31/01 (2006.01)
A61K 31/015 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
C12N 15/88 (2006.01)

(54) НОВЫЕ ЛИПИДЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

(31) 61/113,179; 61/154,350; 61/171,439;
61/185,438; 61/225,898; 61/234,098

(32) 2008.11.10; 2009.02.20; 2009.04.21;
2009.06.09; 2009.07.15; 2009.08.14

(33) US

(62) 201170554; 2009.11.10

(71) Заявитель:
**АРБУТУС БИОФАРМА
КОРПОРЕЙШН (СА)**

(72) Изобретатель:
**Манохаран Мутиах, Раджив
Каллантоттатил Г., Джаяраман
Мутусами, Батлер Дэвид,
Нараяннаннаир Джаяпракаш К. (US),
Майер Мартин (DE), Элтепу Лаксман
(US)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение представляет липиды, которые успешно используются в липидных частицах для доставки *in vivo* терапевтических средств в клетки. В частности, изобретение представляет

липиды, имеющие следующую структуру $R_3-E-\begin{matrix} R_1 \\ \diagup \\ R_2 \end{matrix}$, где R_1 и R_2 - это каждый самостоятельно для каждого проявления произвольно замещенный C_{10} - C_{30} -алкил, произвольно замещенный C_{10} - C_{30} -алкенил, произвольно замещенный C_{10} - C_{30} -алкинил, произвольно замещенный C_{10} - C_{30} -ацил или линкер-лиганд; R_3 - это H, произвольно замещенный C_1 - C_{10} -алкил, произвольно замещенный C_2 - C_{10} -алкенил, произвольно замещенный C_2 - C_{10} -алкинил, алкилгетероцикл, алкилфосфат, алкилфосфоротиоат, алкилфосфородитионат, алкилфосфонаты, алкиламины, гидроксиалкилы, ω -аминоалкилы, ω -(замещенные)аминоалкилы, ω -фосфоалкилы, ω -тиофосфоалкилы, произвольно замещенный полиэтиленгликоль (ПЭГ, мм 100-40 K), произвольно замещенный мПЭГ (мм 120-40 K), гетероарил, гетероцикл, или линкер-лиганд; E - это O, S, N(Q), C(O), N(Q)C(O), C(O)N(Q), (Q)N(CO)O, O(CO)N(Q), S(O), NS(O)₂N(Q), S(O)₂, N(Q)S(O)₂, SS, O=N, арил, гетероарил, циклический или гетероциклический; и Q - это H, алкил, ω -аминоалкил, ω -(замещенный)аминоалкил, ω -фосфоалкил или ω -тиофосфоалкил.

A1

202190028

202190028

A1

НОВЫЕ ЛИПИДЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

5

ЗАЯВЛЕНИЕ ОБ УСТАНОВЛЕНИИ ПРИОРИТЕТА

Данная заявка претендует на приоритет к U.S. S.N. 61/113,179, поданной 10 ноября 2008 г.; U.S. S.N. 61/154,350, поданной 20 февраля 2009 г.; U.S. S.N. 61/171,439, поданной 21 апреля 2009 г.; U.S. S.N. 61/185,438, поданной 9 июня 2009 г.; U.S. S.N. 61/225,898, поданной 10 15 июля 2009 г.; и U.S. S.N. 61/234,098, поданной 14 августа 2009 г., содержание каждой из которых включено здесь в качестве ссылки в полном объеме.

ПРАВИТЕЛЬСТВЕННАЯ ПОДДЕРЖКА

Описанная здесь работа осуществлялась, по крайней мере частично, за счет средств правительства США по гранту номер NNSN266200600012C, назначенному Национальным 15 институтом аллергии и инфекционных заболеваний. Поэтому правительство может иметь определенные права на изобретение.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Область техники

20 Настоящее изобретение относится к области доставки лекарственного средства с использованием липидных частиц. В частности, настоящее изобретение предоставляет катионные липиды и липидные частицы, составляющие эти липиды, которые обладают преимуществом для доставки нуклеиновых кислот *in vivo*, а также композиции, состоящие из нуклеиновой кислоты и липидных частиц, подходящие для терапевтического использования 25 *in vivo*.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способы изготовления этих композиций, а также способы введения нуклеиновых кислот в клетки с помощью этих композиций, например, для лечения различных болезненных состояний.

Описание существующего уровня техники в области изобретения

Терапевтические нуклеиновые кислоты включают, например, малые интерферирующие РНК (миРНК), микро-РНК (микроРНК), антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы, плазмиды, иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты, антисмысловые, антагомир, антимир, имитаторы микро РНК, супермир, U1 адаптер, и аптамер. Эти нуклеиновые кислоты действуют через различные механизмы. В случае миРНК или микроРНК, данные нуклеиновые кислоты могут снижать внутриклеточные уровни специфических белков через процесс, который называется РНК-интерференция (РНК-и).

После введения миРНК или микроРНК в цитоплазму клеток, эти двухцепочечные РНК-конструкции могут связываться с белком, который называется РИСК (РНКиндуцированный сайленсинг комплекс). Основная цепочка миРНК или микроРНК вытесняется из комплекса РИСК, предоставляя шаблон внутри РИСК, который может распознавать и связывать мРНК с комплементарной последовательностью с такой же в связанных миРНК или микроРНК.

Связав комплементарные мРНК, комплекс РИСК расщепляет мРНК и высвобождает расщепленные цепочки. РНК-и может обеспечить снижение уровня специфичных белков посредством прицельной специфической деструкции соответствующих мРНК, которые кодирует для синтеза белка.

Терапевтическое применение РНК-интерференции чрезвычайно широко, так как конструкции миРНК и микроРНК могут быть синтезированы с любой последовательностью нуклеотидов направленной против целевого белка. На сегодняшний день, конструкции миРНК продемонстрировали способность специфически подавлять уровень белков-мишеней как в моделях *in vitro*, так и *in vivo*. Кроме того, конструкции миРНК в настоящее время оцениваются в клинических исследованиях.

Однако, в настоящее время миРНК или микроРНК конструкции сталкиваются с двумя проблемами: во-первых, это их восприимчивость к перевариванию нуклеазы в плазме и, во-вторых, их ограниченные возможности для получения доступа в отдел внутри клетки, где они могут связывать РИСК при системном введении в виде свободный миРНК или микроРНК. Эти двухцепочечные конструкции могут быть стабилизированы путем включения химически модифицированных нуклеотидных линкеров внутри молекулы, например, фосфотиоатных групп. Несмотря на это, такие химические модификации обеспечивают лишь ограниченную

защиту от переваривания нуклеазы и могут снижать активность конструкции. Внутриклеточной доставке миРНК или микроРНК может помочь использование систем носителей, таких как полимеры, катионные липосомы или использование химической модификации конструкций, например, путем ковалентного присоединения молекул холестерина. Однако, для усовершенствованных систем доставки, необходимо увеличить

5 потенцию молекул миРНК и микроРНК и уменьшить или устранить потребность в химической модификации.

Антисмысловые олигонуклеотиды и рибозимы могут также ингибировать трансляцию мРНК в белок. В случае антисмысловых конструкций, эти одноцепочечные

10 дезоксинуклеиновые кислоты имеют такую же комплементарную последовательность, что и мРНК белка-мишени и могут связываться с мРНК на основе модели спаривания Уотсона-Крика. Это соединение также предотвращает трансляцию целевой мРНК и/или запускает деградацию копий мРНК посредством фермента РНКазы Н. Следовательно, антисмысловые олигонуклеотиды имеют огромный потенциал специфичности действия (т.е. снижение

15 уровня белков, связанных с определенным заболеванием). На сегодняшний день, эти соединения продемонстрировали перспективность в некоторых моделях *in vitro* и *in vivo*, в том числе в моделях воспалительных заболеваний, рака, и ВИЧ (рассматривается в *Agrawal, Trends in Biotech.* 14:376-387 (1996)). Антисмысловые олигонуклеотиды также могут влиять на клеточную активность путем гибридизации непосредственно с хромосомной ДНК. В

20 настоящее время проходит расширенное клиническое оценивание у людей некоторых антисмысловых лекарственных средств. Мишени этих лекарственных средств включают bcl 2 и гены аполипопротеина В, а также продукты мРНК.

Иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты включают дезоксирибонуклеиновые кислоты и рибонуклеиновые кислоты. В случае дезоксирибонуклеиновых кислот,

25 определенные последовательности и мотивы продемонстрировали недопустимую иммунную стимуляцию у млекопитающих. Эти последовательности или мотивы включают CpG-мотивы, последовательности, богатые пиримидинами и повторяющиеся последовательности. Считается, что CpG мотив в дезоксирибонуклеиновых кислотах специфически распознается эндосомальным рецептором, толл-подобным рецептором 9, (ТЛР-9), который затем запускает

30 пути как врожденной, так и приобретенной иммунной стимуляции. Были зарегистрированы также определенные иммуностимулирующие последовательности рибонуклеиновой кислоты.

Считается, что эти последовательности РНК запускают иммунную активации путем связывания с толл-подобными рецепторами 6 и 7 (ТПР-6 и ТПР-7). Кроме того, также сообщается, что двухцепочечные РНК являются иммуностимулирующими и предположительно, активизируются через связывание с ТПР-3.

5 Одна хорошо известная проблема, связанная с использованием терапевтических нуклеиновых кислот, относится к устойчивости фосфодиэфирной межнуклеотидной связи и чувствительности этого линкера к нуклеазам. Присутствие экзонуклеаз и эндонуклеаз в сыворотке крови приводит к быстрому перевариванию нуклеиновых кислот, обладающих фосфодиэфирными линкерами и, следовательно, терапевтические нуклеиновые кислоты в
10 присутствии сыворотки или внутри клеток могут иметь очень короткий период полувыведения (Zelphati, O., *et al.*, *Antisense. Res. Dev.* 3:323-338 (1993); and Thierry, A.R., *et al.*, pp147-161 in *Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA* (Eds. Erickson, RP and Izant, JG; Raven Press, NY (1992)). Из-за этих и других известных проблем, терапевтическая нуклеиновая кислота, которая находится в настоящее время в разработке, не содержит
15 основных фосфодиэфирных химических веществ, обнаруженных в естественных нуклеиновых кислотах.

 Эта проблема была частично преодолена химическими модификациями, которые снижают сывороточную или внутриклеточную деградацию. Модификации были протестированы на межнуклеотидном фосфодиэфирном мосту (например, с использованием
20 фосфоротиоатных, метилфосфонатных или фосфорамидатных связей), на нуклеотидных основаниях (например, 5-пропинил-пиримидины), или на сахарах (например, 2'-модифицированные сахара) (Uhlmann E., *et al.* *Antisense: Chemical Modifications. Encyclopedia of Cancer*, Vol. X., pp 64-81 Academic Press Inc. (1997)). Другие пытались улучшить стабильность с использованием 2'-5' 'связей сахара (см., например, патент США номер
25 5532130). Осуществлялись попытки других изменений. Однако, ни одно из этих решений не оказалось полностью удовлетворительными, и *in vivo* свободные терапевтические нуклеиновые кислоты по-прежнему обладают лишь ограниченной эффективностью.

 Кроме того, как отмечалось выше в отношении миРНК и микроРНК, остаются проблемы, связанные с ограниченными возможностями терапевтических нуклеиновых
30 кислот пересекать клеточные мембраны (см., Vlassov, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1197:95-1082 (1994)) и проблемы, связанные с системной токсичностью, такие, как

комплемент- опосредованная анафилаксия, нарушение коагуляционных свойств, и цитопении (Galbraith, *et al.*, *Antisense Nucl. Acid Drug Des.* 4:201-206 (1994)).

Чтобы попытаться улучшить эффективность, исследователи также использовали транспортные системы на основе липидов для доставки химически модифицированных или немодифицированных терапевтических нуклеиновых кислот. В исследовании Zelphati, O и Szoka, F.C., *J. Contr. Rel.* 41:99-119 (1996), авторы ссылаются на использование анионных (обычных) липосом, pH-чувствительных липосом, иммунолипосом, фузогенных липосом и катионных липидов / антисмысловых агрегатов. Подобным образом, мРНК была введена системно в катионных липосомах, и эти частицы нуклеиновых кислот-липидов, как сообщается, обеспечивают улучшение снижения уровня целевых белков в организме млекопитающих, в том числе нечеловеческих приматов (Zimmermann *et al.*, *Nature* 441: 111-114 (2006)).

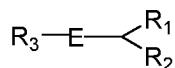
Несмотря на этот прогресс, остается потребность в технологии для улучшения композиций липидно-терапевтических нуклеиновых кислот, которые подходят для общего терапевтического использования. Предпочтительно, чтобы эти композиции инкапсулировали нуклеиновые кислоты с высокой эффективностью, имели высокое соотношение лекарственное средство : липид, защищали инкапсулированную нуклеиновую кислоту от разрушения и клиренса в сыворотке крови, являлись подходящими для системной доставки и обеспечивали внутриклеточную доставку инкапсулированной нуклеиновой кислоты. Кроме того, частицы липидно-нуклеиновой кислоты должны хорошо переноситься пациентами и обеспечивать адекватный терапевтический индекс, такой же, как и при лечении пациентов эффективной дозой нуклеиновой кислоты, не сопровождающееся значительными проявлениями токсичности и/или риска для пациента. Настоящее изобретение предоставляет такие композиции, способы создания композиций, а также способы использования композиций для введения нуклеиновых кислот в клетки, в том числе для лечения заболеваний.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к новым катионным липидам, а также составляющим их липидным частицам. Указанные липидные частицы могут дополнительно

содержать активные вещества и использоваться в соответствии со способами изобретения для доставки активных веществ в клетки.

С одной стороны, изобретение относится к липидам и соответствующим им солям и изомерам, имеющим формулу,



5 XXXIII где:

R_1 и R_2 , каждый самостоятельно для каждого проявления произвольно замещенный C_{10} - C_{30} алкил, произвольно замещенный C_{10} - C_{30} алкенил, произвольно замещенный C_{10} - C_{30} алкинил, произвольно замещенный C_{10} - C_{30} ацил, или линкер-лиганд;

10 R_3 — это H, произвольно замещенный C_1 - C_{10} алкил, произвольно замещенный C_2 - C_{10} алкенил, произвольно замещенный C_2 - C_{10} алкинил, алкилгетероцикл, алкилфосфат, алкилфосфоротиоат, алкилфосфородитионат, алкилфосфонаты, алкиламины, гидроксиалкилы, ω -аминоалкилы, ω - (замещенные) аминоалкилы, ω - фосфоалкилы, ω -тиофосфоалкилы, произвольно замещенный полиэтиленгликоль (ПЭГ, мм 100-40 К), произвольно замещенный мПЭГ (мм 120-40К), гетероарил, гетероцикл, или линкер-лиганд;

15 E является O, S, N(Q), C(O), N(Q)C(O), C(O)N(Q), (Q)N(CO)O, O(CO)N(Q), S(O), NS(O)₂N(Q), S(O)₂, N(Q)S(O)₂, SS, O=N, арилом, гетероарилом, циклическим или гетероциклическим; и,

Q — это H, алкил, ω -аминоалкил, ω -(замещенный)аминоалкил, ω -фосфоалкил или ω -тиофосфоалкил.

20 В другом варианте осуществления, изобретение относится к липидным частицам в составе липидов согласно настоящему изобретению. В определенных вариантах, липидные частицы дополнительно содержат нейтральные липиды и липиды, способные снижать агрегации частиц. В одном варианте, частица липида состоит по существу из (i) по меньшей мере одного липида согласно настоящему изобретению; (ii) нейтрального липида отобранного из ДСФХ, ДПФХ, ПОФХ, ДОФЭ и СМ; (iii) стерина, например холестерина, и (ivIV) ПЭГ-липид, например. ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА, в молярном соотношении около 20-60% катионного липида: 5-25% нейтрального липида: 25-55% стерина; 0,5-15% ПЭГ-липид. В одном из вариантов, липид согласно настоящему изобретению является оптически чистым.

В дополнительных связанных вариантах, настоящее изобретение включает липидные частицы по настоящему изобретению, которые дополнительно содержат терапевтическое средство. В одном из вариантов, терапевтическим средством является нуклеиновая кислота. В одном из вариантов, нуклеиновая кислота является плазмидом, иммуностимулирующим олигонуклеотидом, одноцепочечным олигонуклеотидом, например, антисмысловым олигонуклеотидом, антагомиром; двухцепочечным олигонуклеотидом, например, миРНК; аптамером или рибозимом.

В еще одном связанном варианте, настоящее изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую липидные частицы согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель растворителя.

Настоящее изобретение в других соответствующих вариантах также включает метод модуляции экспрессии гена-мишени в клетке, метод, включающий доставку в клетку липидной частицы или фармацевтической композиции согласно данному изобретению. Геном-мишенью может быть ген дикого типа. В другом варианте, ген-мишень содержит одну или более мутаций. В отдельном варианте метод включает в себя специальные модуляции экспрессии гена-мишени, содержащего одну или более мутаций. В отдельном варианте, липидная частица включает терапевтическое средство, отобранное из иммуностимулирующего олигонуклеотида, одноцепочечного олигонуклеотида, например, антисмыслового олигонуклеотида, антагомира; двухцепочечного олигонуклеотида, например, миРНК, аптамера, рибозима. В одном из вариантов, нуклеиновая кислота — это плазмид, который кодирует миРНК, антисмысловой олигонуклеотид, аптамер или рибозим.

В один из аспектов изобретения, ген-мишень выбран из группы, состоящей из фактора VII, Eg5, PCSK9, TPX2, апоB, SAA, TTR, RSV, PDGF бета-гена, Erb-B гена, Src гена, CRK гена, Grb2 гена, RAS гена, MEKK гена JNK гена, RAF гена, ERK1/2 гена, PCNA (p21) гена, MYB гена, JUN гена, FOS гена, BCL-2 гена, циклин D гена, VEGF гена, EGFR гена, циклин A гена, циклин E гена, WNT-1 гена, бета-катенина гена, C-MET ген, PKC гена, NFkB гена, STAT3 гена, сурвивина гена, HER2/ Neu гена, SORT1 гена, XBP1 гена, топоизомеразы I гена, топоизомеразы II альфа-гена, p73 гена, p21 (WAF1/CIP1) гена, p27 (KIP1) гена, PPM1D, RAS гена, кавеолин I гена, MIB I гена, MTA1 гена, M68 гена, мутации в генах супрессорах опухолей, p53 гена супрессора опухоли и их комбинаций.

В другом варианте, нуклеиновая кислота — это плазмид, который кодирует полипептид или его функциональный вариант или фрагмент, таким образом, что экспрессия полипептида или функционального варианта или его фрагмента увеличивается.

Еще один вариант, связанный с настоящим изобретением, включает в себя способ
5 лечения заболевания или нарушения, характеризующегося чрезмерной экспрессией полипептида у субъекта, включающий обеспечение субъекта липидной частицей или фармацевтической композицией согласно настоящему изобретению, в которых терапевтическое средство отобрано из миРНК, микроРНК, антисмысловых олигонуклеотидов, и плазмиды, способной экспрессировать миРНК, микроРНК, или
10 антисмысловые олигонуклеотиды, и при этом миРНК, микроРНК, или антисмысловая РНК содержат полинуклеотид, который специфически связывается с полинуклеотидом, кодирующим полипептид, или его комплемент.

В другом связанном варианте, настоящее изобретение включает в себя способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, которое характеризуется недостаточной экспрессией
15 полипептида, состоящий из обеспечения субъекта фармацевтической композицией согласно настоящему изобретению, в котором терапевтическое средство является плазмидом, который кодирует полипептид, или его функциональным вариантом или фрагментом.

В следующем варианте, настоящее изобретение включает в себя способ индуцирования иммунного ответа у субъекта, включая обеспечение его фармацевтической
20 композицией согласно настоящему изобретению, в котором терапевтическое средство является иммуностимулирующим олигонуклеотидом. В данной модификации, фармацевтическая композиция предоставляется пациенту в сочетании с вакциной или антигеном.

В связанном варианте, настоящее изобретение включает вакцины, содержащие
25 липидную частицу согласно настоящему изобретению и антиген, ассоциированный с заболеванием или патогенным микроорганизмом. В одном из вариантов, липидная частица содержит иммуностимулирующую нуклеиновую кислоту или олигонуклеотид. В отдельном варианте, антиген является опухолевым антигеном. В другом варианте, антиген является вирусным антигеном, бактериальным антигеном, или паразитарным антигеном.

30 Настоящее изобретение, кроме того, включает способы подготовки липидных частиц и фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению, также как и

комплектов, используемых в приготовлении этих липидных частиц и фармацевтических композиций.

В другом аспекте, изобретение относится к способу оценки композиции, которая включает агент, например терапевтическое средство или диагностическое средство и липид
5 согласно настоящему изобретению.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ НЕКОТОРЫХ ИЗОБРАЖЕНИЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫХ НА ФИГУРАХ

Фигура 1. Схематическое изображение оптически чистого липида с конъюгированными целевыми лигандами.

10 **Фигура 2.** Схематическое изображение характерных особенностей липидов данного изобретения.

Фигура 3. График, иллюстрирующий относительные уровни белка FVII у животных, которым ввели 0,05 или 0,005 мг/кг липидных частиц, содержащих различные катионные липиды.

15 **Фигура 4.** Таблица, отображающая значения EC50 и pKa образцовых липидов, определенных с помощью способа, описанного в примерах.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано, в частности, на открытии катионных липидов, которые обеспечивают преимущества при использовании в липидных частицах для доставки
20 терапевтического средства *in vivo*. В частности, как продемонстрировано сопутствующими примерами, настоящее изобретение обеспечивает композиции нуклеиновая кислота-липидная частица, содержащие катионный липид в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах композиция, описанная здесь, обеспечивает повышенную активность
25 нуклеиновой кислоты и/или улучшение переносимости композиции *in vivo*, что может привести к значительному увеличению терапевтического индекса по сравнению с композициями липид-частица нуклеиновой кислоты, описанными ранее. Кроме того, здесь раскрыты дополнительные композиции и способы использования, которые могут обеспечить
30 уменьшение токсичности, наблюдаемой при применении определенных терапевтических частиц нуклеиновой кислоты-липидов.

В некоторых вариантах, настоящее изобретение особым образом обеспечивает улучшение композиции для доставки молекул миРНК. В данной работе продемонстрировано, что эти композиции являются эффективными в снижении уровней белка и/или уровней мРНК белков-мишеней. Кроме того, продемонстрировано, что активность этих улучшенных композиций зависит от наличия определенных катионных липидов, и что молярное соотношение катионных липидов в формуле может влиять на активность.

Липидные частицы и композиции согласно настоящему изобретению могут быть использованы для различных целей, в том числе для доставки сопутствующих или инкапсулированных терапевтических средств в клетки, как *in vitro*, так и *in vivo*. Соответственно, настоящее изобретение относится к способам лечения заболеваний или нарушений у субъектов, нуждающихся в лечении, путем контакта с субъектом с помощью липидной частицы согласно настоящему изобретению, объединенной с подходящим терапевтическим средством.

Как описано в настоящем документе, липидные частицы согласно настоящему изобретению особенно пригодны для доставки нуклеиновых кислот, в том числе, например, молекул миРНК и плазмидов. Таким образом, липидные частицы и композиции согласно настоящему изобретению могут быть использованы для модуляции экспрессии генов-мишеней и белков, как *in vitro*, так и *in vivo*, путем контактирования с клетками липидных частиц согласно настоящему изобретению, связанных с нуклеиновой кислотой, которая уменьшает экспрессию гена-мишени (например, миРНК) или нуклеиновой кислотой, которая может быть использована для увеличения экспрессии заданного белка (например, плазмид, кодирующий заданный белок).

Различные типичные варианты катионных липидов согласно настоящему изобретению, а также липидных частиц и композиций с тем же содержанием и их использование для доставки терапевтических средств и модуляции экспрессии гена и белка описаны более подробно ниже.

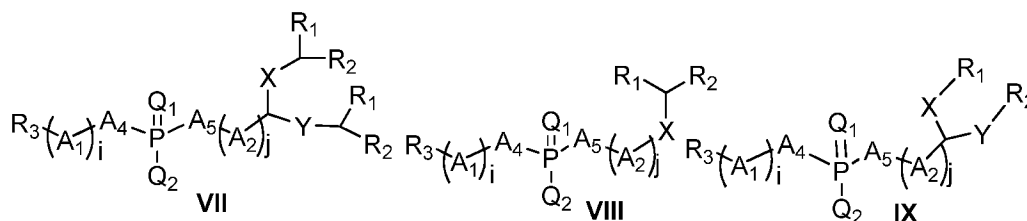
ЛИПИДЫ

Настоящее изобретение относится к новым липидам, имеющим определенные конструктивные особенности. Как показано на фигуре 2, особенности липидной модели включают по крайней мере одно из следующих веществ: главную группу с различной pK_a ,

катионная, 1°, 2° и 3° моноамин, ди-и триамин, олигоамин/полиамин, главную группу с низким рКа — имидазолы и пиридин, гуанидин, анионные, цвиттерионные и гидрофобные хвосты - могут включать в себя симметричные и/или несимметричные цепи, длинные и короткие, насыщенные и ненасыщенные магистральные цепи, включающие в себя основные

5 глицериды и другие ациклические аналоги, циклические, спиро, бициклические и полициклические связи с эфирами, сложными эфирами, фосфаты и их аналоги, сульфаты и аналоги, дисульфиды, pH чувствительные связи, сходные с ацеталями и кеталями, имины и гидразоны, и оксими.

В одном из вариантов, липид имеет одну из следующих формул:



где:

R₁ и R₂, каждый самостоятельно для каждого проявления произвольно замещенный C₁₀-C₃₀ алкил, произвольно замещенный C₁₀-C₃₀ алкенил, произвольно замещенный C₁₀-C₃₀ алкинил, произвольно замещенный C₁₀-C₃₀ ацил, или линкер-лиганд;

R₃ —это самостоятельный для каждого проявления H, произвольно замещенный C₁-C₁₀ алкил, произвольно замещенный C₂-C₁₀ алкенил, произвольно замещенный C₂-C₁₀ алкинил, алкилгетероцикл, алкилфосфат, алкилфосфоротриат, алкилфосфородитионат, алкилфосфонаты, алкиламины, гидроксиалкилы, ω-аминоалкилы, ω - (замещенные) аминоалкилы, ω- фосфоалкилы, ω-тиофосфоалкилы, произвольно замещенный

20 полиэтиленгликоль (ПЭГ, мм 100-40 K), произвольно замещенный мПЭГ (мм 120-40K), гетероарил, гетероцикл, или линкер-лиганд;

X и Y каждый самостоятельно, являются O, S, алкилом или N(Q);

Q₁ — это самостоятельный для каждого проявления O или S;

Q₂ — это самостоятельный для каждого проявления O, S, N(Q), алкил или алкокси;

A₁, A₂, A₄ и A₅ каждый самостоятельно, являются O, S, CH₂, CHF или CF₂; и

i и j равняется 0-10; или

соль или ее изомер.

В одном варианте X и Y могут быть самостоятельно(CO), O(CO), O(CO)N, N(CO)O, (CO)O, O(CO)O, сульфонатом или фосфатом.

Было установлено, что катионные липиды содержащие ненасыщенные алкильные цепи особенно пригодны для формирования частиц липид- нуклеиновой кислоты с повышенной текучестью мембраны. В одном из вариантов, по крайней мере один из R₁ или R₂ включает минимум один, два или три участка ненасыщенности, например, двойную связь или тройную связь.

В одном из вариантов, только один из R₁ или R₂ включает минимум один, два или три участка ненасыщенности.

10 В одном из вариантов, оба, как R₁ так и R₂ включают минимум один, два или три участка ненасыщенности.

В одном из вариантов, R₁ и R₂ включают различное количество участков ненасыщенности, например, один из R₁ и R₂ имеют один участок ненасыщенности, а другой имеет два или три участка ненасыщенности.

15 В одном из вариантов, оба, как R₁ так и R₂ включают одинаковое количество участков ненасыщенности.

В одном из вариантов, R₁ и R₂ включают различные типы ненасыщенности, например, ненасыщенность в одном из R₁ и R₂ является двойной связью, а другие ненасыщенности представляют собой тройную связь.

20 В одном из вариантов, R₁ и R₂ включают одинаковый тип ненасыщенности, например, двойную связь или тройную связь.

В одном из вариантов, по крайней мере один из R₁ или R₂ содержит минимум одну двойную связь и минимум одну тройную связь.

25 В одном из вариантов, только один из R₁ или R₂ содержит по меньшей мере одну двойную связь и по меньшей мере одну тройную связь.

В одном из вариантов, оба, как R₁ так и R₂ содержат как минимум одну двойную и как минимум одну тройную связь.

В одном из вариантов, оба, R₁ и R₂ одинаковые, например, оба и R₁ и R₂ являются линолеилом (C18) или оба, и R₁ и R₂ являются гептадека-9-енилом.

30 В одном из вариантов, R₁ и R₂ отличаются друг от друга.

В одном из вариантов, по крайней мере один из R₁ и R₂ является холестерином.

В одном из вариантов, один из R_1 и R_2 является линкером лиганд.

В одном из вариантов, один из R_1 и R_2 является линкером лиганд, и лиганд является липофильным.

В одном из вариантов, по крайней мере один из R_1 или R_2 содержит, минимум одну CH_2 группу с одним или двумя Н замещенными на F, например, CHF или CF_2 . В одном из вариантов, как R_1 , так и R_2 содержат по меньшей мере одну CH_2 группу с одним или двумя Н замещенными на F, например, CHF или CF_2 .

В одном из вариантов, только один из R_1 или R_2 содержит, минимум одну CH_2 группу с одним или двумя Н замещенными на F.

В одном из вариантов, по крайней мере один из R_1 или R_2 заканчивается CH_2F , CHF_2 или CF_3 . В одном из вариантов, как R_1 , так и R_2 заканчиваются CH_2F , CHF_2 или CF_3 .

В одном из вариантов, по крайней мере один из R_1 или R_2 является $-(CF_2)_y-Z''-(CH_2)_y-CH_3$, где каждый у независимо равняется 1-10 и Z'' является O, S или N(Q).

В одном из вариантов оба, R_1 и R_2 являются $-(CF_2)_y-Z''-(CH_2)_y-CH_3$, где каждый у независимо равняется 1-10 и Z'' является O, S или N(Q).

В одном из вариантов, по крайней мере один из R_1 или R_2 является $-(CH_2)_y-Z''-(CF_2)_y-CF_3$, где каждый у независимо равняется 1-10 и Z'' является O, S или N(Q).

В одном из вариантов, оба, R_1 и R_2 являются $-(CH_2)_y-Z''-(CF_2)_y-CF_3$, где каждый у независимо равняется 1-10 и Z'' является O, S или N(Q).

В одном из вариантов, по крайней мере один из R_1 или R_2 является $-(CF_2)_y-(CF_2)_y-CF_3$, где каждый у независимо равняется 1-10.

В одном из вариантов, оба, R_1 и R_2 являются $-(CF_2)_y-(CF_2)_y-CF_3$, где каждый у независимо равняется 1-10.

В одном из вариантов, R_3 является отобранным из группы, состоящей из метила, этила, полиамина, $-(CH_2)_h$ -гетероарила, $-(CH_2)_h-N(Q)_2$, $-O-N(Q)_2$, $-(CH_2)_h-Z'-(CH_2)_h$ -гетероарила, линкер-лиганд, $-(CH_2)_h$ -гетероцикла, и $-(CH_2)_h-Z''-(CH_2)_h$ -гетероцикла, где каждый h независимо равняется 0-13 и Z'' является O, S или N(Q).

В одном из вариантов, лиганд является фузогенным пептидом.

В одном из вариантов, липид является рацемической смесью.

В одном из вариантов, липид обогащается одним диастереомером, например, липид имеет по меньшей мере 95%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 80% или, по меньшей мере 70% избытка диастереомера.

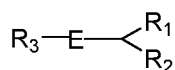
В одном из вариантов, липид обогащается одним энантиомером, например, липид имеет по меньшей мере 95%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 80% или, по меньшей мере 70% избытка энантиомера.

В одном из вариантов, липид является хирально чистым, например, является единственным оптическим изомером.

В одном из вариантов, липид обогащается одним оптическим изомером.

Там, где имеется двойная связь (например, углерод-углеродная двойная связь или углерод-азотная двойная связь), в конфигурации около двойной связи не может быть изомерии (т.е. цис/транс или E/Z изомерии). В случаях, когда конфигурация двойной связи продемонстрирована в химической формуле, понятно, что также может присутствовать соответствующий изомер. Количество имеющихся изомеров может варьироваться в зависимости от относительной стабильности изомеров и энергии, необходимой для преобразования изомеров. Соответственно, некоторые двойные связи для практических целей имеются только в одной конфигурации, тогда как другие (например, те, в которых имеется схожая относительная стабильность и низкая энергия преобразования) могут присутствовать в качестве неотъемлемой равновесной смеси конфигураций.

В одном аспекте, липид является соединением формулы XXXIII,



XXXIII где:

R_1 и R_2 , каждый самостоятельно для каждого проявления произвольно замещенный C_{10} - C_{30} алкил, произвольно замещенный C_{10} - C_{30} алкенил, произвольно замещенный C_{10} - C_{30} алкинил, произвольно замещенный C_{10} - C_{30} ацил, или линкер-лиганд;

R_3 —это H, произвольно замещенный C_1 - C_{10} алкил, произвольно замещенный C_2 - C_{10} алкенил, произвольно замещенный C_2 - C_{10} алкинил, алкилгетероцикл, алкилфосфат, алкилфосфоротиоат, алкилфосфородитионат, алкилфосфонаты, алкиламины, гидроксиалкилы, ω -аминоалкилы, ω - (замещенные) аминоалкилы, ω - фосфоалкилы, ω -тиофосфоалкилы,

произвольно замещенный полиэтиленгликоль (ПЭГ, мм 100-40 К), произвольно замещенный мПЭГ (мм 120-40К), гетероарил, гетероцикл, или линкер-лиганд;

Е — это O, S, N(Q), C(O), N(Q)C(O), C(O)N(Q), (Q)N(CO)O, O(CO)N(Q), S(O), NS(O)₂N(Q), S(O)₂, N(Q)S(O)₂, SS, O=N, арил, гетероарил, циклический или
5 гетероциклический; и

Q — это H, алкил, ω-аминоалкил, ω-(замещенный)аминоалки, ω-фосфоалкил или ω-тиофосфоалкил; или

соль или ее изомер.

В одном из вариантов, R₁ и R₂, каждый самостоятельно для каждого проявления
10 произвольно замещенный C₁₀-C₃₀ алкил, произвольно замещенный C₁₀-C₃₀ алкокси, произвольно замещенный C₁₀-C₃₀ алкенил, произвольно замещенный C₁₀-C₃₀ алкенилокси, произвольно замещенный C₁₀-C₃₀ алкинил, произвольно замещенный C₁₀-C₃₀ алкинилокси, или произвольно замещенный C₁₀-C₃₀ ацил;

В другом варианте, R₃ — это H, произвольно замещенный C₁-C₁₀ алкил, произвольно
15 замещенный C₂-C₁₀ алкенил, произвольно замещенный C₂-C₁₀ алкинил, произвольно замещенный алкилгетероцикл, произвольно замещенный гетероциклалкил, произвольно замещенный алкилфосфат, произвольно замещенный фосфоалкил, произвольно замещенный алкилфосфотриат, произвольно замещенный фосфотриалкил, произвольно замещенный алкилфосфородитионат, произвольно замещенный фосфородитиалкил, произвольно
20 замещенный алкилфосфонат, произвольно замещенный фосфоалкил, произвольно замещенный амино, произвольно замещенный алкиламино, произвольно замещенный ди(алкил)амино, произвольно замещенный аминоалкил, произвольно замещенный алкиламиноалкил, произвольно замещенный ди(алкил)аминоалкил, произвольно замещенный гидроксисалкил, произвольно замещенный полиэтиленгликоль (ПЭГ, мм 100-40 К),
25 произвольно замещенный мПЭГ (мм 120-40К), произвольно замещенный гетероарил, произвольно замещенный гетероцикл, или линкер-лиганд;

В еще одном варианте, E — это-O-, -S-, -N(Q)-, -C(O)-, -N(Q)C(O)-, -C(O)N(Q)-, -N(Q)C(O)O-, -OC(O)N(Q)-, S(O), -N(Q)S(O)₂N(Q)-, -S(O)₂-, -N(Q)S(O)₂-, -SS-, -O-N=, =N-O-, -C(O)-N(Q)-N=, -N(Q)-N=, -N(Q)-O-, -C(O)S-, арилен, гетероарилен, циклалкилен или
30 гетероциклилен; и,

Q — это H, алкил, ω -аминоалкил, ω - (замещенный) аминоалкил, ω - фосфоалкил, ω -тиофосфоалкил.

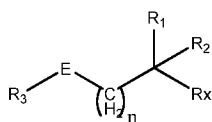
В другом варианте, липид является соединением формулы XXXIII, где

Е — это O, S, N(Q), C(O), N(Q)C(O), C(O)N(Q), (Q)N(CO)O, O(CO)N(Q), S(O),
5 NS(O)₂N(Q), S(O)₂, N(Q)S(O)₂, SS, O=N, арил, гетероарил, циклический или гетероциклический.

В одном из вариантов липид является соединением формулы XXXIII, где, R₃ —это H, произвольно замещенный C₂-C₁₀ алкенил, произвольно замещенный C₂-C₁₀ алкинил, произвольно замещенный алкилгетероцикл, алкилфосфат, алкилфосфоротиоат,
10 алкилфосфородитионат, алкилфосфонаты, алкиламины, гидроксиалкилы, ω -аминоалкилы, ω - (замещенные) аминоалкилы, ω - фосфоалкилы, ω -тиофосфоалкилы, произвольно замещенный полиэтиленгликоль (ПЭГ, мм 100-40 К), произвольно замещенный мПЭГ (мм 120-40К), гетероарил, гетероцикл, или линкер-лиганд.

В еще одном варианте, липид является соединением формулы XXXIII, где R₁ и R₂,
15 каждый самостоятельно для каждого проявления произвольно замещенный C₁₀-C₃₀ алкил, произвольно замещенный C₁₀-C₃₀ алкинил, произвольно замещенный C₁₀-C₃₀ ацил, или линкер-лиганд.

В одном варианте, особенности липида изобретения формулы XXXVIII таковы:



20 **XXXVIII**

где

Е — это O, S, N(Q), C(O), N(Q)C(O), C(O)N(Q), (Q)N(CO)O, O(CO)N(Q), S(O),
NS(O)₂N(Q), S(O)₂, N(Q)S(O)₂, SS, O=N, арил, гетероарил, циклический или гетероциклический;

25 Q — это H, алкил, ω -аминоалкил, ω - (замещенный) аминоалкил, ω - фосфоалкил, ω -тиофосфоалкил;

R₁ и R₂ и R_x каждый самостоятельно для каждого проявления H, произвольно замещенный C₁-C₁₀ алкил, произвольно замещенный C₁₀-C₃₀ алкил, произвольно замещенный C₁₀-C₃₀ алкенил, произвольно замещенный C₁₀-C₃₀ алкинил, произвольно замещенный C₁₀-C₃₀ ацил или линкер лиганд; при условии, что по крайней мере один из R₁, R₂ и R_x не является H;
30

R_3 —это H, произвольно замещенный C_1 - C_{10} алкил, произвольно замещенный C_2 - C_{10} алкенил, произвольно замещенный C_2 - C_{10} алкинил, алкилгетероцикл, алкилфосфат, алкилфосфоротиоат, алкилфосфородитионат, алкилфосфонаты, алкиламины, гидроксиалкилы, ω -аминоалкилы, ω - (замещенные) аминоалкилы, ω - фосфоалкилы, ω -тиофосфоалкилы, произвольно замещенный полиэтиленгликоль (ПЭГ, мм 100-40 К), произвольно замещенный мПЭГ (мм 120-40К), гетероарил, гетероцикл, или линкер-лиганд;

и

n равняется 0, 1, 2, или 3;

или соль или ее изомер.

10 В некоторых вариантах, каждый из R_1 и R_2 , самостоятельно для каждого проявления произвольно замещенный C_{10} - C_{30} алкил, произвольно замещенный C_{10} - C_{30} алкенил, произвольно замещенный C_{10} - C_{30} алкинил, или произвольно замещенный C_{10} - C_{30} ацил или линкер-лигпнд.

В некоторых вариантах R_x — это H, или произвольно замещенный C_1 - C_{10} алкил.

15 В некоторых вариантах R_x — это произвольно замещенный C_{10} - C_{30} алкил, произвольно замещенный C_{10} - C_{30} алкенил, произвольно замещенный C_{10} - C_{30} алкинил, или произвольно замещенный C_{10} - C_{30} ацил или линкер-лигпнд.

В одном из вариантов, R_1 и R_2 , каждый самостоятельно для каждого проявления произвольно замещенный C_{10} - C_{30} алкил, произвольно замещенный C_{10} - C_{30} алкокси, произвольно замещенный C_{10} - C_{30} алкенил, произвольно замещенный C_{10} - C_{30} алкенилокси, произвольно замещенный C_{10} - C_{30} алкинил, произвольно замещенный C_{10} - C_{30} алкинилокси, или произвольно замещенный C_{10} - C_{30} ацил, или линкер-лиганд;

В другом варианте, R_3 —это самостоятельный для каждого проявления H, произвольно замещенный C_1 - C_{10} алкил, произвольно замещенный C_2 - C_{10} алкенил, произвольно замещенный C_2 - C_{10} алкинил, произвольно замещенный алкилгетероцикл, произвольно замещенный гетероциклалкил, произвольно замещенный алкилфосфат, произвольно замещенный фосфоалкил, произвольно замещенный алкилфосфоротиоат, произвольно замещенный фосфоротиоалкил, произвольно замещенный алкилфосфородитионат, произвольно замещенный фосфородитиоалкил, произвольно замещенный алкилфосфонат, произвольно замещенный фосфоалкил, произвольно замещенный амино, произвольно замещенный алкиламино, произвольно замещенный

ди(алкил)амино, произвольно замещенный аминокалкил, произвольно замещенный алкиламиноалкил, произвольно замещенный ди(алкил)аминоалкил, произвольно замещенный гидроксикалкил, произвольно замещенный полиэтиленгликоль (ПЭГ, мм 100-40 К), произвольно замещенный мПЭГ (мм 120-40К), произвольно замещенный гетероарил, или
5 произвольно замещенный гетероцикл, или линкер-лиганд;

В одном варианте, X и Y каждый самостоятельно является -O-, -S-, алкилен, -N(Q)-, -C(O)-, -O(CO)-, -OC(O)N(Q)-, -N(Q)C(O)O-, -C(O)O, -OC(O)O-, -OS(O)(Q₂)O-, или -OP(O)(Q₂)O-.

В одном варианте, Q — это H, алкил, ω-аминоалкил, ω - (замещенный) аминокалкил, ω-
10 фосфоалкил, ω-тиофосфоалкил

В одном варианте, Q₁ самостоятельно для каждого проявления является O от S.

В одном варианте, Q₂ самостоятельно для каждого проявления является O, S, N(Q)(Q), алкил или алкокси,

В одном варианте, A₁, A₂, A₄, и A₅ каждый самостоятельно является -O-, -S-, -CH₂-, -
15 CHR⁵-, -CR⁵R⁵-, -CHF- или -CF₂-.

В одном варианте, E — это -O-, -S-, -N(Q)-, -C(O)-, -C(O)N(Q)-, -N(Q)C(O)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -SS-, -O-N=, =N-O-, арилен, гетероарилен, циклоалкилен или гетероциклилен.

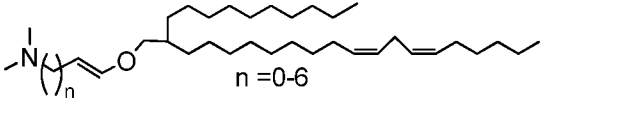
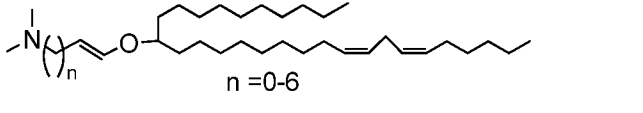
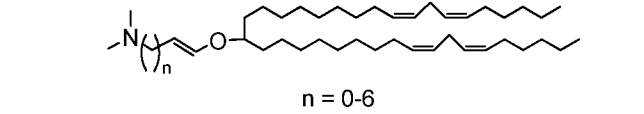
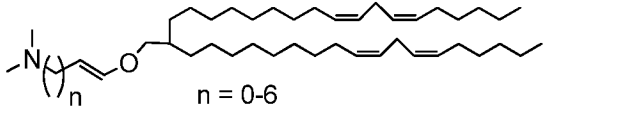
В одном варианте, i и j, каждый независимо равняется 0-10.

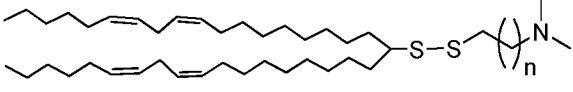
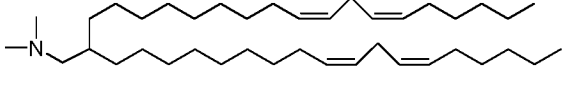
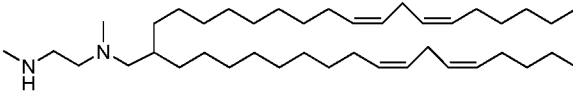
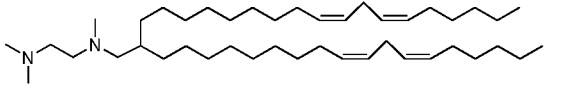
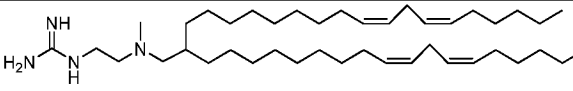
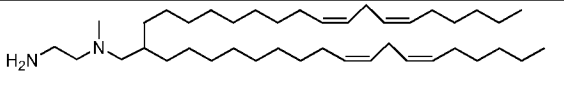
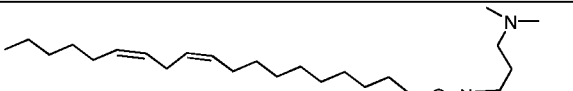
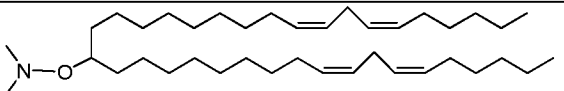
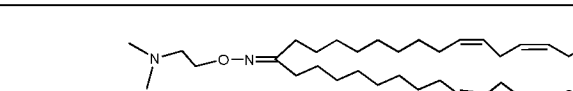
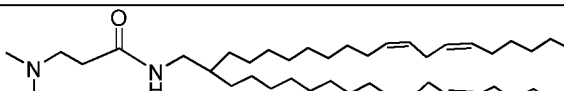
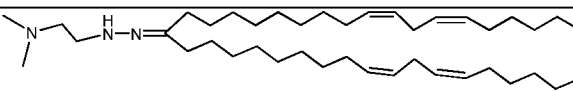
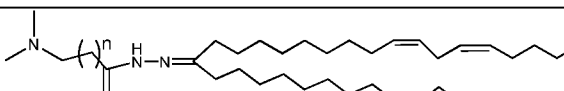
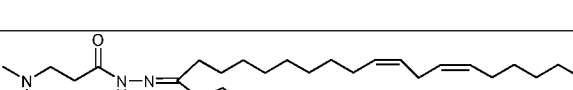
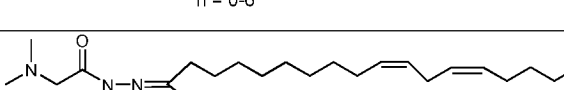
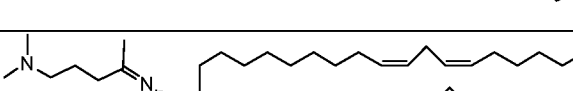
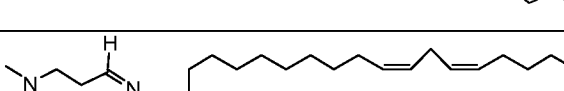
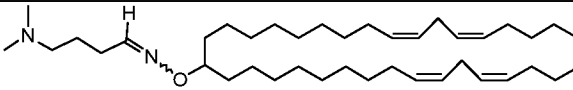
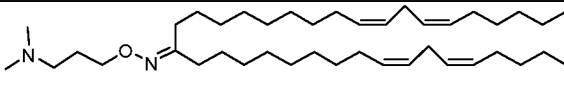
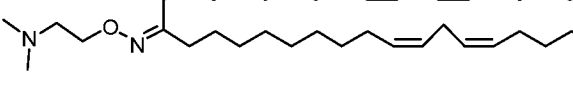
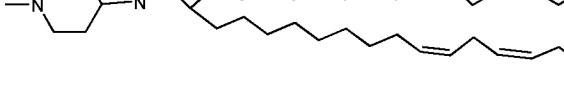
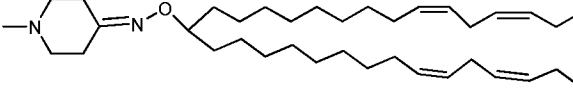
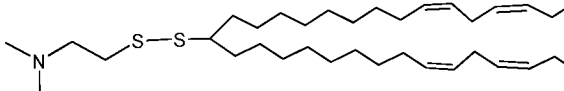
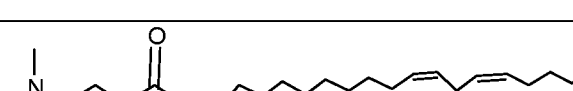
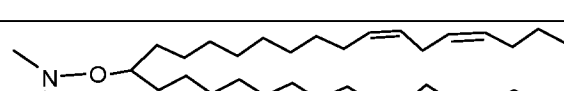
В некоторых случаях, R₃ — это ω-аминоалкил, ω - (замещенный) аминокалкил, ω-
20 фосфоалкил, или ω-тиофосфоалкил, каждый из которых является произвольно замещенным. Примеры ω - (замещенных) аминокалкил групп включают 2-(диметиламино)этил, 3-(диизопропиламино)пропил, или 3-(N-этил-N-изопропиламино)-1-метилпропил.

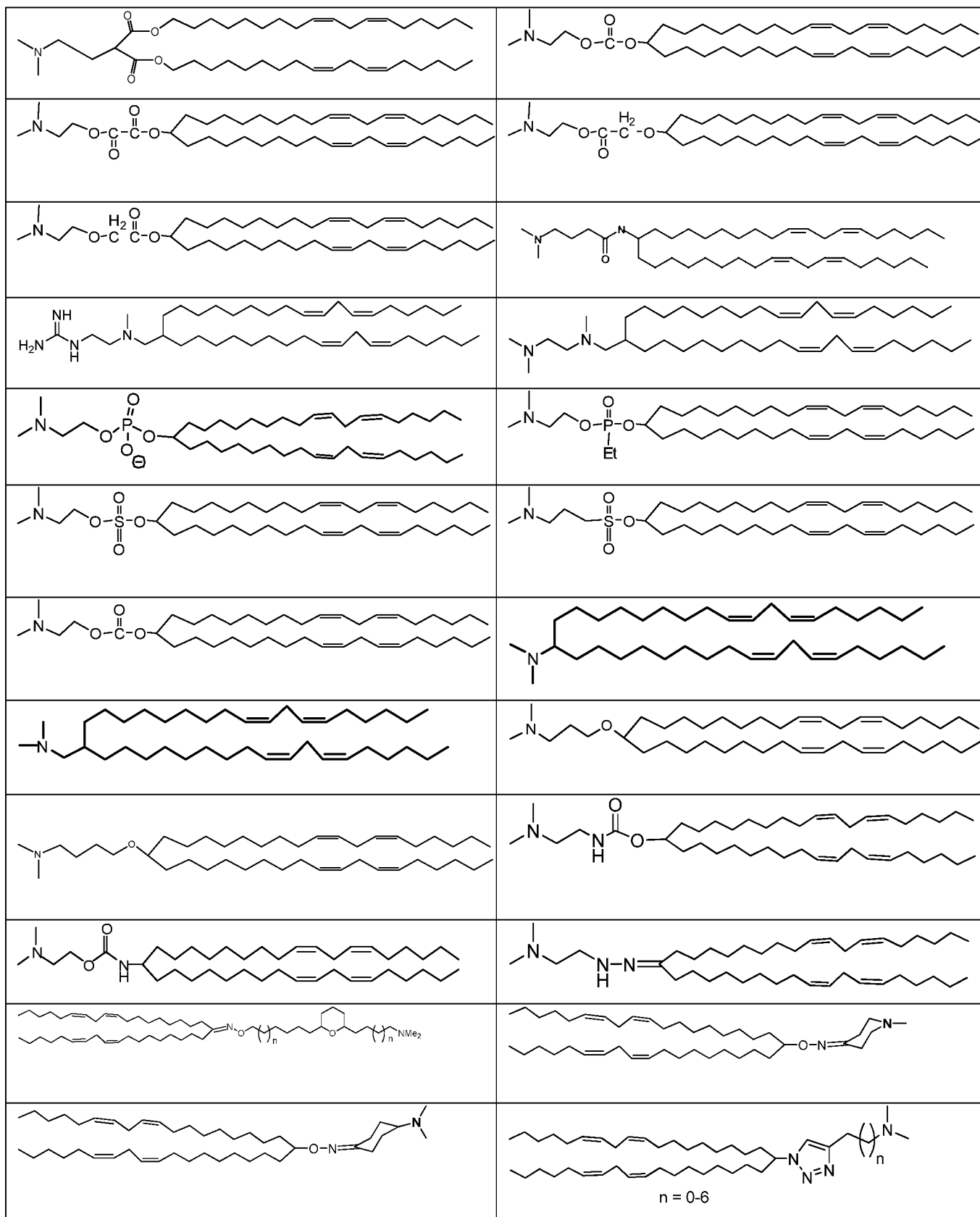
В одном варианте, X и Y могут быть самостоятельно -O-, -S-, алкиленом, или -N(Q)-.

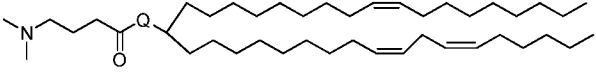
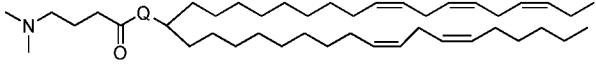
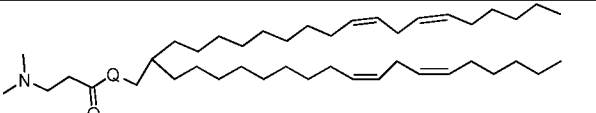
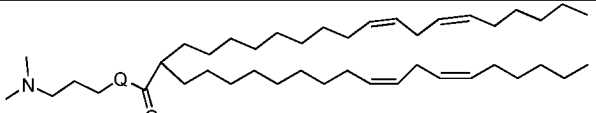
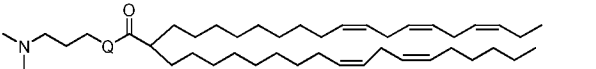
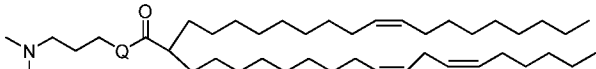
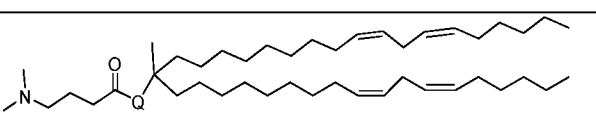
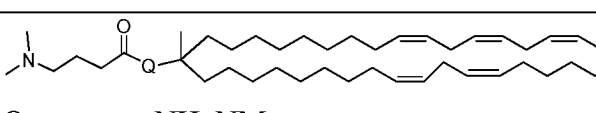
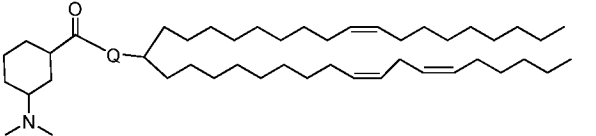
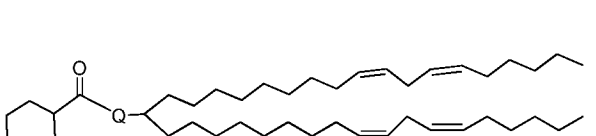
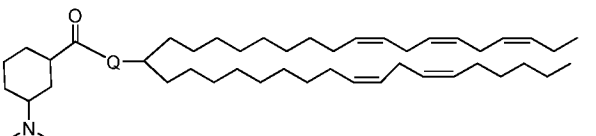
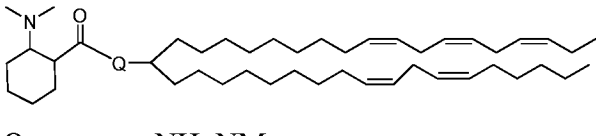
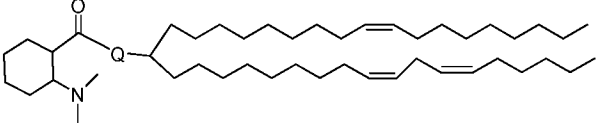
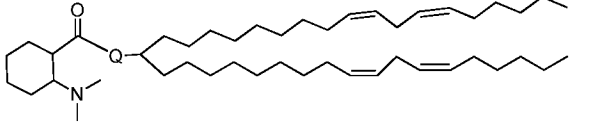
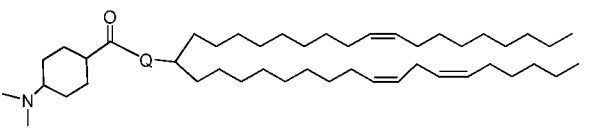
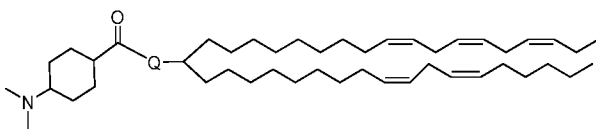
В одном варианте, катионоактивный липид является избранным из группы, состоящей
25 из липидов, продемонстрированных ниже в табл. 1

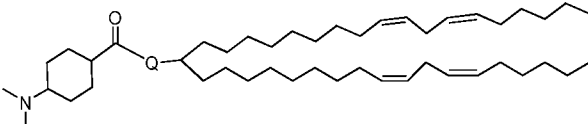
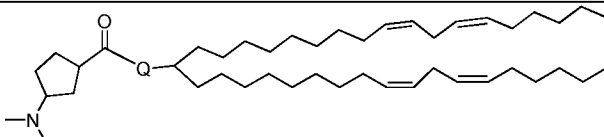
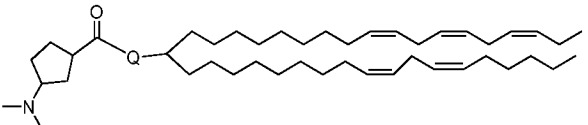
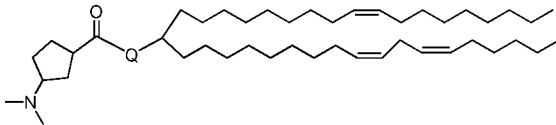
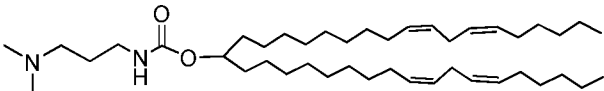
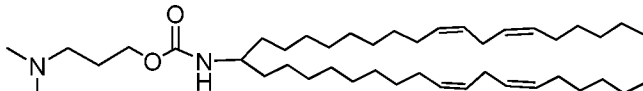
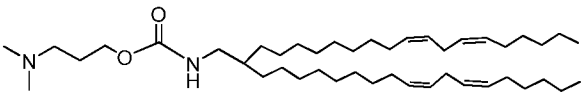
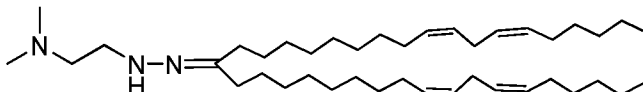
Таблица 1: Некоторые катионоактивные липиды согласно настоящему изобретению.

 n = 0-6	 n = 0-6
 n = 0-6	 n = 0-6

 $n = 0-6$	
	
	
	
	
	 $n = 0-6$
	
	
	
	
	
	



 Q является NH, NMe	 Q является NH, NMe
 Q является NH, NMe	 Q является NH, NMe
 Q является NH, NMe	 Q является NH, NMe
 Q является NH, NMe	 Q является NH, NMe
 Q является NH, NMe	 Q является NH, NMe
 Q является NH, NMe	 Q является NH, NMe
 Q является NH, NMe	 Q является NH, NMe
	

Q является NH, NMe	Q является NH, NMe
 Q является NH, NMe	 Q является NH, NMe
 Q является NH, NMe	 Q является NH, NMe
	
	

Несмотря на то, что продемонстрированы не все диастереомеры для липидов, одним из аспектов настоящего изобретения является обеспечить все диастереомеры и как таковые

5 хирально чистые, и диастереомерно обогащенные липиды, что также является частью этого изобретения.

В одном варианте, R_3 является линкер-лигандом.

В особых вариантах, липиды согласно настоящему изобретению являются катионными липидами. Используемый здесь термин "катионный липид" подразумевает

10 использование этих липидов, имеющих одну или две жирные кислоты или жирные алкильные цепи и главную амино группу (в том числе алкиламино- или диалкиламино-группу), которые могут быть протонированы для формирования катионных липидов при физиологических pH. В некоторых вариантах, катионный липид называется "аминолипид".

Другие катионные липиды будут включать те, которые имеют альтернативные группы

15 жирных кислот и другие диалкиламино группы, в том числе те, в которых алкильные

заместители различны (например, N-этил-N-метиламино-, N-пропил-N-этиламино и подобные). Для тех вариантов, в которых как R_1 , так и R_2 являются длинными цепями алкильных или ацильных групп, они могут быть одинаковыми или разными. В общем, липиды (например, катионные липиды), имеющие менее насыщенные ацильные цепи легче сортируются по размеру, особенно когда комплексы по размеру меньше примерно 0,3 мкм, для целей стерилизации фильтров. Катионные липиды, содержащие ненасыщенные жирные кислоты с длиной углеродной цепи в диапазоне от C_{10} и C_{20} , являются типичными. Другие способы могут также использоваться для отделения амино групп (например, аминогруппа катионных липидов) и жирных кислот или жирных алкиловых частей катионных липидов.

10 Подходящие способы известны для специалистов в данной области.

В некоторых вариантах, катионные липиды согласно настоящему изобретению имеют по крайней мере одну протонную или депротонную группу, такую, что липид является положительно заряженным при уровне pH, равном или ниже уровня физиологических pH (например, pH 7,4), и нейтральным при другом pH, желательном соответствующем уровню, который равен или выше физиологического pH. Такие липиды также относятся к катионным липидам. Конечно, следует понимать, что добавление или удаление протонов в зависимости от pH является равновесным процессом, и что ссылка на заряженные или нейтральные липиды относится к природе преобладающего вида и не требует, чтобы все липиды находились в заряженной или нейтральной форме. Липиды, которые имеют больше чем одну протонную или депротонную группы, или те, которые являются цвиттерионными, не были исключены из использования в изобретении.

В некоторых вариантах, протонные липиды (т.е. катионные липиды) в соответствии с изобретением имеют pK_a протонной группы в диапазоне от 4 до 11. Обычно, липиды будут иметь pK_a приблизительно в диапазоне от 4 до 7, например, приблизительно между 5 и 7, как, например, между приблизительно 5,5 и 6,8, при введении в липидные частицы. Такие липиды будут катионными при низшем уровне pH состава, пока частицы будут в значительной степени (хотя не полностью) поверхностно нейтрализованы в физиологическом pH, приблизительно при pH 7,4. Одним из преимуществ pK_a , лежащего в диапазоне между приблизительно 4 и 7 является то, что по меньшей мере какая-нибудь нуклеиновая кислота, связанная с внешней поверхностью частицы, потеряет свое электростатическое взаимодействие в физиологическом pH и будет удалена простым диализом, таким образом

значительно уменьшая восприимчивость частицы к клиренсу. Измерения рКа липидов в липидных частицах могут быть выполнены, например, с помощью флуоресцентного зонда 2-(p-толуидино)-6-нафталин сульфоновой кислоты (TNS), используя способы, описанные в работе Cullis et al., (1986) *Chem Phys Lipids* 40, 127-144.

5 В одном варианте, технология изобретения, охватывает, по крайней мере, 75%, по крайней мере, 80%, или, по крайней мере, 90%.

В одном варианте формулировки изобретения дополнительно включают аполипопротеин. Используемый здесь термин "аполипопротеин" или "липопротеин" относится к аполипопротеинам, известным специалистам в данной области, и к их вариантам и фрагментам, и к агонистам аполипопротеина, их аналогам или фрагментам, описанным
10 ниже. Подходящие аполипопротеины включают, не ограничиваясь, Апо А-I, Апо А-II, Апо А-IV, Апо А-V и Апо Е, и активные полиморфные формы, изоформы, варианты и мутанты также как и их фрагменты или усеченные формы. В некоторых вариантах, аполипопротеин является тиол содержащим аполипопротеином. "Тиол-содержащий
15 аполипопротеин" относится к аполипопротеину, варианту, фрагменту или изоформе, которые содержат хотя бы один остаток цистеина. Наиболее распространенными тиолсодержащими аполипопротеинами являются Апо А-I Milano (Апо А-Im) и Апо А-I Paris (Апо А-Ip), которые содержат один остаток цистеина (Jia et al., 2002, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 297: 206-13; Bielicki and Oda, 2002, *Biochemistry* 41: 2089-96). Апо А-II, Апо Е2 и Апо Е3 также являются
20 тиолсодержащими аполипопротеинами. Изолированный Апо Е и/или его активные фрагменты и полипептидные аналоги, в том числе его формы, которые производятся рекомбинантно, описаны в патентах США под номерами 5672685; 5525472; 5473039; 5182364; 5177189; 5168045; 5116739; раскрытие которых в настоящем документе включено в качестве ссылки. Апо Е3 раскрыт в работе Weisgraber, et al «Гетерогенность человеческого Е
25 апопротеина: чередование цистеин-аргинина в аминокислотной последовательности изоформ апо-Е,» *J. Biol. Chem.* (1981) 256: 9077-9083; and Rall, et al., « Структурная основа гетерогенности связывания с рецептором аполипопротеина Е типа III у субъектов с гиперлипопротеинемией,» *Proc. Nat. Acad. Sci.* (1982) 79: 4696-4700. См. также GenBank регистрационный номер K00396.

30 В некоторых вариантах, аполипопротеин может быть в своей зрелой форме, в форме своего препроаполипопротеина или в форме своего проаполипопротеина.

Гомо-и гетеродимеры (где это возможно) про-и зрелых Апо А-I (Duverger et al., 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16(12):1424-29), Апо А-I Milano (Klon et al., 2000, *Biophys. J.* 79:(3)1679-87; Franceschini et al., 1985, *J. Biol. Chem.* 260: 1632-35), Апо А-I Paris (Daum et al., 1999, *J. Mol. Med.* 77:614-22), Апо А-II (Shelness et al., 1985, *J. Biol. Chem.* 260(14):8637-46; Shelness et al., 1984, *J. Biol. Chem.* 259(15):9929-35), Апо А-IV (Duverger et al., 1991, *Euro. J. Biochem.* 201(2):373-83), и Апо Е (McLean et al., 1983, *J. Biol. Chem.* 258(14):8993-9000) также могут быть использованы в рамках настоящего изобретения.

В некоторых вариантах, аполипопротеин может быть фрагментом, вариантом или изоформом аполипопротеина. Термин "фрагмент" относится к любому аполипопротеину, у которого аминокислотная последовательность короче, чем у естественного аполипопротеина и фрагмент которого сохраняет активность естественного аполипопротеина, в том числе свойства связывания липида. "Вариант" означает замещения или изменения в аминокислотных последовательностях аполипопротеина, причем такие замещения или изменения, как например, добавление и удаление аминокислотных остатков, не аннулирующих активность естественного аполипопротеина, в том числе свойства связывания липида. Таким образом, вариант может включать белок или пептид, имеющий практически одинаковые с естественным аполипопротеином аминокислотные последовательности при условии, если один или более аминокислотных остатков были консервативно заменены химически подобными аминокислотами. Примеры консервативных замен включают замещения по крайней мере одного гидрофобного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин или метионин, на другой. Кроме того, настоящее изобретение предусматривает, например, замещение по крайней мере одного гидрофильного остатка, как, например, обмен между аргинином и лизином, между глутамином и аспарагином, а также между глицином и серином (см. патент США. Номера: 6004925, 6037323 и 6046166). Термин "изоформа" относится к белку, обладающему такой же, большей или частичной функцией и аналогичной, идентичной или частичной последовательностью, который может быть или не быть продуктом того же гена и, как правило является тканеспецифическим (см Weisgraber 1990, *J. Lipid Res.* 31(8):1503-11; Hixson and Powers 1991, *J. Lipid Res.* 32(9):1529-35; Lackner et al., 1985, *J. Biol. Chem.* 260(2):703-6; Hoeg et al., 1986, *J. Biol. Chem.* 261(9):3911-4; Gordon et al., 1984, *J. Biol. Chem.* 259(1):468-74; Powell et al., 1987, *Cell* 50(6):831-40; Aviram et al., 1998, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18(10):1617-24; Aviram et al., 1998, *J. Clin. Invest.*

101(8):1581-90; Billecke et al., 2000, *Drug Metab. Dispos.* 28(11):1335-42; Draganov et al., 2000, *J. Biol. Chem.* 275(43):33435-42; Steinmetz and Utermann 1985, *J. Biol. Chem.* 260(4):2258-64; Widler et al., 1980, *J. Biol. Chem.* 255(21):10464-71; Dyer et al., 1995, *J. Lipid Res.* 36(1):80-8; Sacre et al., 2003, *FEBS Lett.* 540(1-3):181-7; Weers, et al., 2003, *Biophys. Chem.* 100(1-3):481-92; Gong et al., 2002, *J. Biol. Chem.* 277(33):29919-26; Ohta et al., 1984, *J. Biol. Chem.* 259(23):14888-93 and U.S. Pat. No. 6372886).

В некоторых вариантах, способы и композиции согласно настоящему изобретению, включают использование химерных конструкций аполипопротеина. Например, химерная конструкция аполипопротеина может состоять из домена аполипопротеина с высокой липид-связывающей емкостью, соединенного с доменом аполипопротеина, обладающего защитными свойствами реперфузии ишемии. Химерной конструкцией аполипопротеина может быть конструкция, которая включает в себя отдельные области внутри одного аполипопротеина (т.е., гомологичная конструкция) или химерной конструкцией может быть конструкция, которая включает в себя отдельные области из различных аполипопротеинов (т.е. гетерологичные конструкции). Композиции, содержащие химерную конструкцию, также могут включать сегменты, которые являются вариантами аполипопротеина или сегменты, предназначенные для обладания определенными свойствами (например, липид-связывающие, рецептор-связывающие, ферментные, активирующие фермент, антиоксиданты или снижающие окислительные свойства) (см. Weisgraber 1990, *J. Lipid Res.* 31(8):1503-11; Hixson and Powers 1991, *J. Lipid Res.* 32(9):1529-35; Lackner et al., 1985, *J. Biol. Chem.* 260(2):703-6; Hoeg et al, 1986, *J. Biol. Chem.* 261(9):3911-4; Gordon et al., 1984, *J. Biol. Chem.* 259(1):468-74; Powell et al., 1987, *Cell* 50(6):831-40; Aviram et al., 1998, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18(10):1617-24; Aviram et al., 1998, *J. Clin. Invest.* 101(8):1581-90; Billecke et al., 2000, *Drug Metab. Dispos.* 28(11):1335-42; Draganov et al., 2000, *J. Biol. Chem.* 275(43):33435-42; Steinmetz and Utermann 1985, *J. Biol. Chem.* 260(4):2258-64; Widler et al., 1980, *J. Biol. Chem.* 255(21):10464-71; Dyer et al., 1995, *J. Lipid Res.* 36(1):80-8; Sorenson et al., 1999, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19(9):2214-25; Palgunachari 1996, *Arterioscler. Throb. Vasc. Biol.* 16(2):328-38; Thurberg et al., *J. Biol. Chem.* 271(11):6062-70; Dyer 1991, *J. Biol. Chem.* 266(23):150009-15; Hill 1998, *J. Biol. Chem.* 273(47):30979-84).

Аполипопротеины, используемые в изобретении, также включают рекомбинантные, синтетические, полусинтетические или очищенные аполипопротеины. Способы получения

аполипопротеинов или их эквивалентов, используемые изобретением, хорошо известная область техники. Например, аполипопротеины могут быть отделены от плазмы или натуральных продуктов посредством центрифугирования в градиенте плотности или посредством иммуноаффинной хроматографии, или произведены синтетическим, полу-
 5 синтетическим путем или с использованием методик, основанных на рекомбинантной ДНК, известных специалистам в этой области техники. (см, например., Mulugeta et al., 1998, J. Chromatogr. 798(1-2): 83-90; Chung et al., 1980, J. Lipid Res. 21(3):284-91; Cheung et al., 1987, J. Lipid Res. 28(8):913-29; Persson, et al., 1998, J. Chromatogr. 711:97-109; U.S. Pat. Nos. 5,059,528, 5,834,596, 5,876,968 and 5,721,114; and PCT Publications WO 86/04920 and WO 87/02062).

10 Аполипопротеины, используемые в изобретении, также включают агонисты аполипопротеина, такие как пептиды и пептидные аналоги, которые имитируют деятельность Апо А-I, Апо А-I Milano (Апо А-Ім), Апо А-I Paris (АпоА-Ір), , Апо А-II, Апо А-IV, и Апо Е. Например, аполипопротеином может быть любой из описанных в патентах США под номерами 6004925, 6037323, 6046166, и 5840688, содержание которых включено здесь в
 15 качестве ссылки во всей их полноте.

Пептиды агониста аполипопротеина или аналоги пептида могут быть синтезированы или произведены с использованием любого способа для синтеза пептидов, известного в области техники, в том числе, например, способов, описанных в патентах США под номерами 6004925, 6037323 и 6046166. Например, пептиды могут быть получены с
 20 использованием твердофазного синтетического способа, первоначально описанного Меррифилдом (1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154). Другие способы синтеза пептидов можно найти в работе Bodanszky et al., Peptide Synthesis, John Wiley & Sons, 2d Ed., (1976) и других материалах доступных для специалистов в данной области. Обзор способов синтеза полипептидов можно найти в работе Stuart and Young, Solid Phase Peptide. Synthesis, Pierce
 25 Chemical Company, Rockford, Ill., (1984). Пептиды также могут быть синтезированы способами решения, как описано в работе The Proteins, Vol. II, 3d Ed., Neurath et. al., Eds., p. 105-237, Academic Press, New York, N.Y. (1976). Соответствующие защитные группы, для использования в различных способах синтеза пептида описаны в вышеупомянутых работах, а также в работе McOmie, Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, New
 30 York, N.Y. (1973). Пептиды согласно настоящему изобретению могут быть также получены

путем химического или ферментативного расщепления от более крупных частей, например, аполипопротеина AI.

В некоторых вариантах, аполипопротеин может быть смесью аполипопротеинов. В одном из вариантов, аполипопротеин может быть гомогенной смесью, то есть одним типом аполипопротеина. В другом варианте, аполипопротеин может быть гетерогенной смесью аполипопротеинов, то есть смесью двух или более различных аполипопротеинов. Варианты гетерогенных смесей аполипопротеинов могут содержать, например, смесь аполипопротеина животного происхождения и аполипопротеина полусинтетического происхождения. В некоторых вариантах, гетерогенные смеси могут содержать, например, смесь Апо А-I и Апо А-I Milano. В некоторых вариантах, гетерогенные смеси могут содержать, например, смесь Апо А-I Milano и Апо А-I Paris. Смеси, подходящие для использования в способах и композициях изобретения будут очевидны для каждого из специалистов в данной области техники.

Если аполипопротеин добывается из природных источников, он может быть получен из растительного или животного источников. Если аполипопротеин добывается из источника животного происхождения, то аполипопротеин может быть получен от любого вида животного. В некоторых вариантах, аполипопротеин может быть получен из источников животного происхождения. В некоторых вариантах, аполипопротеин может быть получен из источников человеческого происхождения. В предпочтительных вариантах изобретения, аполипопротеин получен от того же вида, что и индивид, которому вводится аполипопротеин.

ЛИПИДНЫЕ ЧАСТИЦЫ

Настоящее изобретение также относится к липидным частицам, содержащим один или нескольких катионных липидов, описанных выше. Липидные частицы включают липосомы, но не ограничиваются ими. В данном использовании, липосома является структурой, которая обладает липид-содержащими мембранами, включающими в себя водное внутреннее содержимое. Липосомы могут иметь одну или больше липидных мембран. В изобретении представлены как однослойные липосомы, которые называются униламеллярными, так и многослойные липосомы, которые называют мультламеллярными. В комплексе с нуклеиновыми кислотами, липидные частицы также могут являться липоплексами, которые

состоят из бислоя катионных липидов, зажатою между слоями ДНК, как описано, например в работе Felgner, *Scientific American*.

Липидные частицы согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать один или несколько дополнительных липидов и/или другие компоненты, такие как холестерин. Другие липиды могут быть включены в липосомные композиции настоящего изобретения для различных целей, например, для предотвращения окисления липидов или для прикрепления лигандов на поверхности липосом. Любое количество липидов может находиться в липосомах согласно настоящему изобретению, в том числе амфипатические, нейтральные, катионные и анионные липиды. Такие липиды могут быть использованы одни или в комбинации. Конкретные примеры дополнительных липидных компонентов, которые могут присутствовать в липосомах описаны ниже.

Дополнительные компоненты, которые могут присутствовать в липидной частице согласно настоящему изобретению, включают двухслойные стабилизирующие компоненты, такие как полиамидные олигомеры (см., например, патент США No 6320017), пептиды, белки, детергенты, производные липидов, такие как ПЭГ, спаренный с фосфатидилэтаноламином и ПЭГ соединенный с церамидами (см. патент США No 5885613).

В отдельных вариантах, липидные частицы включают один или несколько второстепенных аминоклипов или катионных липидов, нейтральных липидов, стерола, и липидов, отобранных для снижения агрегации липидных частиц в процессе изготовления, которая может возникнуть в результате стерической стабилизации частиц, которые предотвращают заряд-индуцированную агрегацию в процессе создания.

Примеры липидов, которые уменьшают агрегацию частиц в процессе изготовления включают полиэтиленгликоль (ПЭГ)-модифицированные липиды, моносialogанглиозид Gm1, и полиамидные олигомеры ("ПАО"), такие как (описанные в патенте США No 6320017). Другие соединения с незаряженными, гидрофильными, стерически-барьерными половинами, которые препятствуют агрегации во время изготовления, подобными ПЭГ, Gm1 или Атта, также могут быть спарены с липидами для использования как в способах, так и в композициях изобретения. Атта-липиды, описаны, например, в патенте США No 6320017, и ПЭГ-липидные конъюгаты описаны, например, в патентах США под номерами 5820873, 5534499 и 5885613. Как правило, концентрация липидных компонентов, отобранных для снижения агрегации, составляет от 1 до 15% (по мол. % липидов).

Конкретные образцы ПЭГ-модифицированных липидов (или липид-полиоксиэтилен конъюгатов), которые используются в настоящем изобретении, могут иметь разнообразные "якорные" части липидов для прикрепления ПЭГ-части к поверхности липидных везикул. Образцы подходящих ПЭГ-модифицированных липидов включают ПЭГ-модифицированный

5 фосфатидилэтаноламин и фосфатидную кислоту, ПЭГ-церамидные конъюгаты (например, ПЭГ ЦерК14 или ПЭГ ЦерК20), которые описаны в находящемся на рассмотрении USSN 08/486214, включенным здесь в виде ссылки, ПЭГ-модифицированные диалкиламины и ПЭГ-модифицированные 1,2-диацилоксипропан-3-амины. Наиболее предпочтительными являются ПЭГ-модифицированные диацилглицерины и диалкилглицерины.

10 В вариантах, где пространственно-большая половина, такая как ПЭГ или Атта, является спаренной с липидным якорем, выбор липидного якоря зависит от типа соединения, которое конъюгируется с липидной частицей. Хорошо известно, что мПЭГ (мм2000)-диастеаролфосфатидилэтаноламин (ПЭГ-ДСФЭ) останется связанным с липосомой до времени клиренса частиц из циркуляции, возможно, это вопрос нескольких дней. Другие

15 конъюгаты, такие как ПЭГ-ЦерК20 имеют схожую неизменную емкость. ПЭГ-ЦерК14, однако, быстро обменивается за пределы состава при воздействии сыворотки, в некоторых химических анализах $T_{1/2}$ составляет менее 60 минут. Как показано в заявке на патент США SN 08/486214, по крайней мере три характеристики влияют на скорость обмена: длина ацильных цепей, насыщенность ацильных цепей, и размер стерического барьера главной

20 группы. Соединения, имеющие подходящие варианты этих свойств могут быть пригодными для изобретения. Для некоторых видов терапевтических применений, быстрая потеря ПЭГ-модифицированных липидов частицей нуклеиновая кислота-липид, может быть предпочтительной *in vivo* и, следовательно, ПЭГ-модифицированный липид будет обладать сравнительно коротким липидным якорем. При других видах терапевтического применения,

25 для частицы нуклеиновая кислота-липид может быть предпочтительным проявлять большую продолжительность периода полужизни при циркуляции в плазме и, следовательно, ПЭГ-модифицированный липид будет обладать сравнительно более длинными липидными якорями.

Следует отметить, что соединения предотвращающие агрегацию не обязательно

30 требуют конъюгации липидов для того, чтобы функционировать должным образом. Наличие свободного ПЭГ или свободной Атта в растворе может быть достаточным для

предотвращения агрегации. Если частицы стабильны после приготовления, ПЭГ или АттаТА могут быть удалены при помощи диализа до введения субъекту.

При наличии в липидных частицах нейтральных липидов, последние могут быть представлены любым из множества видов липидов, которые существуют или в незаряженной или в нейтральной цвиттерионной форме при физиологическом pH. Такие липиды включают, например, диацилфосфатидилхолин, диацилфосфатидилэтаноламин, керамид, сфингомиелин, дигидросфингомиелин, кефалин, и цереброзиды. Выбор нейтральных липидов для использования в частицах, описанных в данном документе, как правило, проводится при рассмотрении, например, размера липосомы и стабильности липосом в кровотоке.

Предпочтительно, чтобы нейтральный компонент липида являлся липидом с двумя ацильными группами (т.е. диацилфосфатидилхолин и диацилфосфатидилэтаноламин). Липиды, имеющие различные группы ацильных цепей различной длины цепи и степени насыщения имеются в распоряжении, или могут быть изолированы или синтезированы известными способами. В одной группе вариантов являются предпочтительными липиды, содержащие насыщенные жирные кислоты с длиной углеродной цепочки в диапазоне от C₁₀ до C₂₀. В другой группе вариантов используются липиды с моно- или ди- ненасыщенными жирными кислотами с длиной углеродной цепочки в диапазоне от C₁₀ до C₂₀. Кроме того, могут быть использованы липиды, имеющие смеси насыщенных и ненасыщенных цепей жирных кислот. Предпочтительно, используемые в настоящем изобретении нейтральные липиды — это ДОФЭ, ДСФХ, ПОФХ, ДПФХ или любой липид, родственник фосфатидилхолину. Нейтральные липиды, используемые в настоящем изобретении, могут также состоять из сфингомиелина, дигидросфингомиелина или фосфолипидов с другими главными группами, такие как серин и инозитол.

Стерольным компонентом липидной смеси, если он присутствует, может быть любой из стеролов, которые традиционно используются в сфере приготовления липосомы, липидной везикулы или липидной частицы. Предпочтительным стеролом является холестерин.

Другие катионные липиды, которые несут положительный заряд при показателях pH приблизительно равных физиологическим, в дополнение к тем, которые описанные выше, могут быть также включены в липидные частицы согласно настоящему изобретению. Такие катионные липиды включают, но не ограничены, N,N-диолеил-N,N-диметиламмония хлорид ("ДОДАХ"); N-(2,3-диолеилокси)пропил-N,N,N-триэтиламмония хлорид ("ДОТМА"); N,N-

дистеарил-N,N-диметиламмония бромид ("ДДАБ"); N-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония хлорид ("ДОТАП"); 1,2-диолеилокси-3-триметиламинопропана хлоридная соль ("ДОТАП.СГ"); 3-(N-(N',N'-диметиламиноэтан)-карбамоил) холестерин ("ДК-Хол"), N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N-2-(спермин карбоксамидо)этил)-N,N-диметиламмония трифторацетат ("ДОСПА"), диоктадециламидоглицил карбоксиспермин ("ДОГС"), 1,2-диолеоил -sn-3-фосфоэтаноламин ("ДОФЭ"), 1,2-диолеоил -3-диметиламмония пропан ("ДОДАП"), N, N-диметил-2,3-диолеилокси) пропиламин ("ДОДМА"), и N-(1,2-димиристилоксипропил-3)-N,N-диметил-N-гидроксиэтил аммония бромид ("ДМРИЭ"). Кроме того, ряд коммерческих препаратов катионных липидов может быть использован, как, например, ЛИПОФЕКТИН (содержащий ДОТМА и ДОФЭ, поставляется компанией GIBCO/BRL), и ЛИПОФЕКТАМИН (содержащий ДОСПА и ДОФЭ, поставляется компанией GIBCO / BRL). В отдельных вариантах, катионные липиды являются аминолипидами.

Анионные липиды, подходящие для использования в липидных частицах согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваясь, фосфатидилглицерин, кардиолипин, диацилфосфатидилсерин, диацилфосфатидная кислота, N-додеканоил фосфатидилэтанолamina, N-сукцинил фосфатидилэтанолamina, N-глутарил фосфатидилэтанолamina, лизилфосфатидилглицерин, и другие анионные модифицированные группы, объединенные с нейтральными липидами.

В многочисленных вариантах, амфипатические липиды включены в липидные частицы согласно настоящему изобретению. "Амфипатические липиды" относятся к любому подходящему материалу, в котором гидрофобная часть липидного материала ориентирована в сторону гидрофобной фазы, в то время как гидрофильная часть ориентированы в направлении водной фазы. Такие соединения включают, но не ограничиваясь, фосфолипиды, аминолипиды, и сфинголипиды. Представители фосфолипидов включают сфингомиелин, фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидную кислоту, пальмитоил олеоил, фосфатдилхолин, лизофосфатидилхолин, лизофосфатидилэтаноламин, дипальмитоилфосфатидилхолин, диолеоилфосфатидилхолин, дистеароилфосфатидилхолин или дилинолеоилфосфатидилхолин. Также могут быть использованы другие бесфосфорные соединения, такие как семейства сфинголипидов, гликосфинголипидов, диацилглицерины, и δ -ацилоксикислоты. Кроме того, такие

амфипатические липиды легко смешиваются с другими липидами, такими как триглицериды и стерины.

Также подходящими для включения в липидные частицы согласно настоящему изобретению являются липиды с программируемым слиянием. Такие липидные частицы имеют незначительную тенденцию сливаться с клеточными мембранами и доставлять им полезный груз до проявления определенного сигнального события. Это позволяет липидным частицам до начала их слияния с клетками более равномерно распределяться после введения в виде инъекции в организм или область заболевания. Сигнальным событием может быть, например, изменение pH, температуры, ионной среды, или времени. В последнем случае задерживающий слияние или "маскирующий" компонент, такой как АТТА-липидный конъюгат или ПЭГ-липидный конъюгат, могут просто высвободиться из мембраны липидной частицы с течением времени. К тому времени, липидная частица соответственно распределяется в организме, теряет достаточное количество маскирующего агента, чтобы стать сливающейся. Что касается другого сигнального события, желательно выбрать сигнал, связанный с локализацией болезни или клетки-мишени, такой как повышение температуры в месте воспаления.

В некоторых вариантах, желательно, сориентировать липидные частицы этого изобретения с использованием нацеливающих фрагментов, которые являются специфичными для типа клеток или тканей. Ориентация липидных частиц с использованием различных нацеливающих фрагментов, таких как лиганды, рецепторы клеточной поверхности, гликопротеины, витамины (например, рибофлавин) и моноклональные антитела, была описана ранее (см., например, патенты США под номерами 4957773 и 4603044). Нацеливающие фрагменты могут содержать весь белок или его части. Механизмы ориентации обычно требуют, чтобы нацеливающие агенты были расположены на поверхности липидных частиц таким образом, чтобы нацеливающий фрагмент был доступен для взаимодействия с мишенью, например, рецептором клеточной поверхности. Множество различных нацеливающих агентов и способов известны и доступны в данной области техники, включая те, которые описаны например, в работе Sapra, P. and Allen, TM, *Prog. Lipid Res.* 42(5):439-62 (2003); and Abra, RM *et al.*, *J. Liposome Res.* 12:1-3, (2002).

Использование липидных частиц, т. е., липосом, с покрытием поверхности гидрофильных полимерных цепей, таких как цепи полиэтиленгликоля (ПЭГ), для ориентации

было предложено (Allen, *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1237: 99-108 (1995); DeFrees, *et al.*, *Journal of the American Chemistry Society* 118: 6101-6104 (1996); Blume, *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1149: 180-184 (1993); Klibanov, *et al.*, *Journal of Liposome Research* 2: 321-334 (1992); Патент США No. 5013556; Zalipsky, *Bioconjugate Chemistry* 4: 296-299 (1993); Zalipsky, *FEBS Letters* 353: 71-74 (1994); Zalipsky, in *Stealth Liposomes* Chapter 9 (Lasic and Martin, Eds) CRC Press, Boca Raton Fl (1995). В одном подходе, лиганд, такой как антитело, для нацеливания липидных частиц является связанным с полярной главной группой липидов, формирующих липидную частицу. В другом подходе, нацеливающий лиганд прикреплен к дистальному концу цепей ПЭГ, формирующих гидрофильное полимерное покрытие (Klibanov, *et al.*, *Journal of Liposome Research* 2: 321-334 (1992); Kirpotin *et al.*, *FEBS Letters* 388: 115-118 (1996)).

Для соединения нацеливающих агентов могут быть использованы стандартные способы. Например, может быть использован фосфатидилэтаноламин, который может быть активирован для прикрепления нацеливающих агентов, или производных липофильных соединений, таких как производное липида — блеомицин. Антитело-ориентированные липосомы можно сконструировать, используя, например, липосомы, включающие в себя белок A (*see*, Renneisen, *et al.*, *J. Bio. Chem.*, 265:16337-16342 (1990) and Leonetti, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 87:2448-2451 (1990). Другие примеры конъюгации антител раскрыты в патенте США No 6027726, идеи которого включены здесь в виде ссылки. Примеры нацеливающих фрагментов могут также включать другие белки, характерные для клеточных компонентов, в том числе антигены, связанные с новообразованиями или опухолями. Белки, используемые как нацеливающие фрагменты, могут быть прикреплены к липосомам с помощью ковалентных связей (см., Heath, *Covalent Attachment of Proteins to Liposomes*, 149 *Methods in Enzymology* 111-119 (Academic Press, Inc. 1987)). Другие ориентационные способы включают систему биотин-авидин.

В одном типичном варианте, липидная частица содержит смесь катионных липидов согласно настоящему изобретению, нейтральных липидов (кроме катионных липидов), стирола (например, холестерина) и ПЭГ-модифицированного липида (например, ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА). В некоторых вариантах, липидная смесь состоит исключительно, или в основном из катионного липида согласно настоящему изобретению, нейтрального липида, холестерина и PEG-модифицированного липида. В дальнейшем предпочтительны варианты,

в которых липидная частица состоит исключительно, или в основном из вышеупомянутой смеси липидов в молярном соотношении примерно 20-70% аминолипида : 5-45% нейтрального липида : 20-55% холестерина : 0,5-15% ПЭГ модифицированного липида.

В одном из вариантов, липидная частица содержит, по меньшей мере два липида, описанных в данном документе. Например, смесь катионных липидов может быть использована в липидной частице таким образом, чтобы смесь содержала 20-60% от общего содержания липидов на молярной основе.

В отдельном варианте, липидная частица состоит из, или состоит в основном из катионных липидов выбранных из таблицы 1, ДСФХ, Холестерина, и либо ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА, например, в молярном соотношении равным примерно 20-60% катионных липидов : 5-25% ДСФХ : 25-55% Холестерина : 0,5-15% ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА. В отдельном варианте, молярное липидное соотношение составляет приблизительно 40/10/40/10 (моль% катионный липид/ДСФХ/Холестерин/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА), 35/15/40/10 (моль% катионный липид/ДСФХ/Холестерин/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА) или 52/13/30/5 (моль% катионный липид/ДСФХ/Холестерин/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА). В другой группе вариантов, нейтральный липид, ДСФХ, в этих композициях замещается на ПОФХ, ДПФХ, ДОФЭ или СМ.

Терапевтическая агент-липидная частица. Композиции и составы

Настоящее изобретение включает композиции, содержащие липидные частицы согласно настоящему изобретению и активное вещество, где активное вещество связано с липидной частицей. В отдельных вариантах активное вещество является терапевтическим веществом. В отдельных вариантах активное вещество инкапсулировано в водное содержимое липидной частицы. В других вариантах, активное вещество присутствует в одном или нескольких липидных слоях липидной частицы. В других вариантах, активное вещество связано с внешней или внутренней липидной поверхностью липидной частицы.

Обозначение "полностью инкапсулированные", используемое здесь, означает, что нуклеиновые кислоты в частицах существенно не разрушились после тестирования воздействием сыворотки или нуклеазы, которые существенно разрушают свободные нуклеиновые кислоты. В полностью инкапсулированной системе, предпочтительно чтобы менее 25% частиц нуклеиновой кислоты разлагалось при процедурах, при которых обычно разлагается 100% свободных нуклеиновых кислот, более предпочтительно, если разрушаются

меньше чем 10% и наиболее предпочтительно если разрушаются меньше 5% частиц нуклеиновой кислоты. Кроме того, полное инкапсулирование может быть определено с помощью анализов Oligreen®. Oligreen® является ультра-чувствительным флуоресцентным красителем нуклеиновой кислоты для количественного определения олигонуклеотидов и

5 одноцепочечных ДНК в растворе (поставляется *Invitrogen Corporation*, Карлсбад, Калифорния). Полная инкапсуляция также предполагает, что частицы являются стабильными в сыворотке крови, то есть, что они быстро не распадаются на составляющие части при введении *in vivo*.

Активные вещества, используемый здесь, включают любую молекулу или соединение,

10 способное оказывать желаемое воздействие на клетку, ткань, орган, или субъект. Такие эффекты могут быть биологические, физиологические, или косметические, например. Активными веществами могут быть любые типы молекулы или соединения, включая, например, нуклеиновые кислоты, пептиды и полипептиды, в том числе, например, антитела, такие как, например, поликлональные антитела, моноклональные антитела, фрагменты

15 антител; гуманизированные антитела, рекомбинантные антитела, рекомбинантные человеческие антитела, и «приматизированные»™ антитела, цитокины, факторы роста, факторы апоптоза, факторы, индуцирующие дифференциацию, рецепторы клеточной поверхности и их лиганды; гормоны и малые молекулы, в том числе малые органические молекулы или соединения

20 В одном из вариантов активное вещество является терапевтическим веществом, или его солью или производным. Производные терапевтического вещества могут быть терапевтически активными сами или они могут быть пролекарствами, которые становятся активными при дальнейшей модификации. Таким образом, в одном варианте, производное терапевтического вещества сохраняет все или некоторые виды терапевтической активности

25 по сравнению с неизмененным веществом, в то время как в другом варианте, производное терапевтического вещества теряет терапевтическую активность.

В различных вариантах, терапевтические вещества включают любое терапевтически эффективное средство или лекарственное средство, такие как противовоспалительные соединения, антидепрессанты, стимуляторы, анальгетики, антибиотики, противозачаточные

30 средства, жаропонижающие средства, вазодилататоры, антиангинальные средства,

цитоваскулярные средства, ингибиторы передачи сигнала, сердечно-сосудистые препараты, например, антиаритмические средства, вазоконстрикторы, гормоны и стероиды.

В некоторых вариантах, терапевтическое вещество является онкологическим лекарственным средством, которое может относиться к противоопухолевому лекарственному средству, противораковому лекарственному средству, опухолевому лекарственному средству, 5 антинеопластическому лекарственному средству или аналогичным. Примеры онкологических лекарственных средств, которые могут быть использованы в соответствии с изобретением включают, не ограничиваясь, адриамицин, алкеран, аллопуринол, альтертамин, амифостин, анастрозол, *Ara C*, триоксид мышьяка, азатиоприн, бексаротен, БиКНУ, 10 блеомицин, бусульфан для внутривенного введения, бусульфан для перорального введения, капецитабин (Кселода), карбоплатин, кармустин, ЦЦНУ, целекоксиб, хлорамбуцил, цисплатин, кладрибин, циклоспорин А, цитарабин, цитозинарабинозид, даунорубицин, цитоксан, даунорубицин, дексаметазон, дексразоксан, додетаксел, доксорубицин, доксорубицин, дакарбазин, эпирубицин, эстрамустин, этопозид фосфат, этопозид и VP-16, 15 экземестан, FK506, флударабин, фторурацил, 5-ФУ, гемцитабин (Гемзар), гемтузумаб-озогамицин, госерелина ацетат, гидреа, гидроксимочевину, идарубицин, ифосфамид, иматиниба мезилат, интерферон, иринотекан (Камптостар, КИТ-111), летрозол, лейковорин, леустатин, лейпролид, левамизол, литретиноин, мегестрол, мелфалан, L-РАМ, месну, метотрексат, метоксален, митрамицин, митомицин, митоксантрон, азотистый иприт, 20 паклитаксел, памидронат, Пегадемаз, пентостатин, порфимер натрия, преднизолон, ритуксан, стрептозоцин, STI-571, тамоксифен, таксотер, темозоламид, тенипозид, VM-26, топотекан (Гикамтин), торемифен, третиноин, АТРА, вальрубицин, вельбан, винбластин, винкристин, VP16, и винорельбин. Другими примерами онкологических лекарственных средств, которые могут быть использованы в соответствии с изобретением, являются 25 эллиптицин и аналоги или производные эллиптицина, эпотилоны, внутриклеточные ингибиторы киназы и камптотецины.

Частицы нуклеиновая кислота-липид.

В некоторых вариантах, липидные частицы согласно настоящему изобретению 30 являются связанными с нуклеиновой кислотой, в результате чего образуется частица нуклеиновая кислота-липид. В отдельных вариантах, нуклеиновая кислота полностью

инкапсулируется в липидную частицу. Используемый здесь термин "нуклеиновая кислота" означает включение любого олигонуклеотида или полинуклеотида. Фрагменты, содержащие до 50 нуклеотидов, как правило, называются олигонуклеотидами, более длинные фрагменты называются полинуклеотидами. В некоторых вариантах, олигонуклеотиды согласно
5 настоящему изобретению — это такие, длина которых составляет 15-50 нуклеотидов.

В контексте данного изобретения, термины "полинуклеотид" и "олигонуклеотид" относятся к полимеру или олигомеру нуклеотидных или нуклеозидных мономеров, состоящему из основания естественного происхождения, сахаров и связей между сахарами (скелет). Термины "полинуклеотид" и "олигонуклеотид" также относятся к полимерам или
10 олигомерам, содержащим мономеры не естественного происхождения, или их части, которые функционируют аналогично. Такие модифицированные или замещенные олигонуклеотиды часто предпочтительнее, чем формы естественного происхождения, благодаря таким свойствам, как, например, усиленное клеточное поглощение и повышенная стабильность в присутствии нуклеаз.

Нуклеиновая кислота, которая присутствует в частице липид-нуклеиновая кислота в соответствии с настоящим изобретением включает в себя любые известные формы нуклеиновых кислот. Используемые здесь нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечные ДНК или РНК, или двухцепочечные ДНК или РНК, или ДНК-РНК гибриды. Примеры двухцепочечной ДНК включают структурные гены, гены, включающие контрольные и
20 терминальные области и самовоспроизводящиеся системы, такие как вирусная или плазмидная ДНК. Примеры двухцепочечной РНК включают миРНК и другие реагенты РНК-интерференции. Одноцепочечные нуклеиновые кислоты включают, например, антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы, микроРНК, и триплекс-олигонуклеотиды. Нуклеиновая кислота, которая находится в частице липид-нуклеиновая кислота этого
25 изобретения может включать одну или несколько модификаций олигонуклеотида, описанных ниже.

Нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению могут быть различной длины, как правило, зависящей от конкретной формы нуклеиновых кислот. Например, в отдельных вариантах, плазмиды или гены могут быть длиной примерно от 1000 до 100000
30 нуклеотидных остатков. В отдельных вариантах, олигонуклеотиды могут колебаться в пределах от 10 до 100 нуклеотидов в длину. В различных связанных вариантах,

одноцепочечные, двухцепочечные, и трехцепочечные олигонуклеотиды, могут варьировать в длину от приблизительно 10 до приблизительно 50 нуклеотидов, от приблизительно 20 до приблизительно 50 нуклеотидов, от приблизительно 15 до приблизительно 30 нуклеотидов, от приблизительно 20 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину.

5 В отдельных вариантах, олигонуклеотид (или его цепочка) согласно настоящему изобретению специфически гибридизируется с целевым полинуклеотидом или является комплементарным целевому полинуклеотиду. "Специфически гибридизируемый" и "комплементарный" — термины, которые используются для обозначения достаточной степени взаимодополняемости, такой, при которой происходит стабильное и специфическое
10 связывания между ДНК или РНК-мишенями и олигонуклеотидами. Понятно, что олигонуклеотиду не нужно быть на 100% комплементарным к последовательности целевой нуклеиновой кислоты, чтобы быть специфически гибридизируемым. Олигонуклеотид является специфически гибридизируемым, когда связывание олигонуклеотида с мишенью мешает нормальной функции молекулы-мишени, что вызывает потерю ее свойств или
15 экспрессии, и существует достаточная степень комплементарности, чтобы избежать неспецифического связывания олигонуклеотида с нецелевыми последовательностями в условиях, когда желательно специфическое связывание, т.е. в физиологических условиях в случае исследований *in vivo* или при проведении лечения, или в случае исследований *in vitro*, в условиях, при которых эти исследования проводятся. Таким образом, в других вариантах,
20 этот олигонуклеотид включает в себя 1, 2, или 3 базовые замены, например, несоответствие, по сравнению с областью гена или последовательностью мРНК, которая является целевой или к которой олигонуклеотид специфически гибридизируется.

РНК-интерференция нуклеиновых кислот

25 В отдельных вариантах, частицы нуклеиновая кислота-липид согласно настоящему изобретению связаны с РНК-интерференцией (РНК-и) молекул. Способы РНК-интерференции с использованием молекулы РНК-и могут быть использованы для того, чтобы нарушить экспрессию интересующего гена или полинуклеотида. Малые интерферирующие РНК (миРНК), по сути заменили антисмысловые олигонуклеотиды (ОДН) и рибозимы,
30 поскольку следующее поколение лекарственных средств целевого олигонуклеотида находится в стадии разработки.

МиРНК являются РНК дуплексами, обычно длиной 16-30 нуклеотидов, которые могут связываться с цитоплазматическим мультибелковым комплексом, известным как комплекс сайленсинга, индуцированный РНК-и (РИСК). РИСК, наполненный миРНК опосредует деградацию гомологичных копий мРНК, поэтому могут быть разработаны миРНК, чтобы разрушить экспрессию белков с высокой специфичностью. В отличие от других антисмысловых технологий, миРНК функционирует через естественный механизм, развившийся для контроля экспрессии генов через некодирующие РНК. Это, как правило, считается причиной того, почему их активность *in vitro* и *in vivo* является более мощной, чем у любого антисмыслового ОДН или рибозимов. Многообразие различных реагентов РНК-интерференции, в том числе миРНК, нацеливающая на клинически значимые мишени, в настоящее время находится в стадии фармацевтического развития, как описано, например, в работе de Fougerolles, A. *et al.*, Nature Reviews 6:443-453 (2007).

В то время, как первые описанные молекулы РНК-и были РНК : РНК гибриды, включающие в себя как смысловые цепи РНК, так и антисмысловые цепи РНК, в настоящее время продемонстрировано, что смысловые ДНК : антисмысловые РНК гибриды, смысловые РНК : антисмысловые ДНК гибриды и ДНК: ДНК гибриды способны быть медиаторами РНК-и (Lamberton, J.S. and Christian, A.T., (2003) Molecular Biotechnology 24:111-119). Таким образом, изобретение включает использование молекул РНК-интерференции, содержащие любой из этих различных типов двухцепочечных молекул. Кроме того, подразумевается, что молекулы РНК-и могут быть использована и введены в клетки в различных формах. Таким образом, используемые здесь молекулы РНК-и, охватывают любые (и все) молекулы, способные вызывать реакции РНК-интерференции в клетках, включая, но не ограничиваясь, двухцепочечный олигонуклеотид, состоящий из двух отдельных цепей, то есть из смысловой цепи и антисмысловой цепи, например, малые интерферирующие РНК (миРНК); двухцепочечный олигонуклеотид, состоящий из двух отдельных цепей, которые связаны друг с другом ненуклеотидным линкером; олигонуклеотиды, содержащие петлю комплементарных последовательностей шпильки, которые образуют двухцепочечную область, например, малые РНК-и молекулы, образующие шпильки, и векторы экспрессии, которые экспрессируют один или несколько полинуклеотидов, которые способны образовывать двухцепочечный полинуклеотид отдельно или в сочетании с другим полинуклеотидом.

"Одноцепочечное соединение миРНК ", как используется здесь, является миРНК соединением, которое состоит из одной молекулы. Оно может включать дуплексную область, сформированную внутрицепочечным спариванием, например, это может быть, или это может включать, шпильку или структуру ручки сквороды. Одноцепочечные соединения миРНК
5 могут быть антисмысловыми в отношении молекулы-мишени.

Одноцепочечное соединение миРНК может быть достаточно длинным, так, что оно может проникать в *РИСК* и участвовать в *РИСК*-опосредованном расщеплении целевой мРНК. Длина одноцепочечного соединения миРНК составляет по меньшей мере 14 нуклеотидов, а в других вариантах длина составляет по меньшей мере 15, 20, 25, 29, 35, 40,
10 или 50 нуклеотидов. В некоторых вариантах, оно меньше, чем 200, 100, или 60 нуклеотидов в длину.

Шпилька соединений миРНК будет иметь дуплексную область, равную по длине или состоящую, по крайней мере из 17, 18, 19, 29, 21, 22, 23, 24 или 25 пар нуклеотидов. Дуплексная область по длине может быть равна или меньше 200, 100, или 50 нуклеотидов. В
15 некоторых вариантах, диапазоны для дуплексной области равняются 15-30, 17-23, 19-23, и 19-21 парам нуклеотидов в длину. Шпилька может иметь одноцепочечный выступ или конечный неспаренный участок. В некоторых вариантах, выступы составляют 2-3 нуклеотида в длину. В некоторых вариантах, выступ находится на смысловой стороне шпильки, а в некоторых вариантах на антисмысловой стороне шпильки.

20 "Двухцепочечное соединение миРНК ", как используется здесь, является миРНК соединением, которое состоит из более чем одной и в некоторых случаях двух цепей в которых межцепочечная гибридизация может формировать область дуплексной структуры.

Антисмысловая цепочка двухцепочечного соединения миРНК может быть равна по длине или состоящей, по крайней мере из 14, 15, 16 17, 18, 19, 25, 29, 40, или 60 нуклеотидов.
25 По длине она может быть равна или быть меньше 200, 100, или 50 нуклеотидов. Диапазоны могут быть равными 17-25, 19-23, и 19-21 нуклеотидов в длину. Используемый здесь термин "антисмысловая цепочка" означает цепочка соединения миРНК, которая в достаточной мере комплементарна молекуле-мишени, например, РНК-мишени.

Смысловая цепочка двухцепочечного соединения миРНК может быть равна по длине
30 или состоящей, по крайней мере, из 14, 15, 16 17, 18, 19, 25, 29, 40, или 60 нуклеотидов. По

длине она может быть равна или быть меньше 200, 100, или 50 нуклеотидов. Диапазоны могут быть равными 17–25, 19–23, и 19–21 нуклеотидов в длину.

Двухцепочечная часть двухцепочечного соединения миРНК может быть равна по длине или состоять, по крайней мере из 14, 15, 16 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 29, 40, или 5 60 нуклеотидных пар. По длине она может быть равна или быть меньше 200, 100, или 50 нуклеотидных пар. Диапазоны могут быть равны 15-30, 17-23, 19–23, и 19–21 нуклеотидных пар в длину.

Во многих вариантах соединение миРНК достаточно велико, так, что оно может быть расщепленным на эндогенные молекулы, например, ферментом дайсером (Dicer), чтобы 10 произвести меньшие соединения миРНК, например, ми РНК агенты.

Смысловые и антисмысловые цепочки могут быть выбраны так, что соединения двухцепочечной миРНК включают в себя одну цепочку или непарную область на одном или 15 обоих концах молекулы. Таким образом, соединение двухцепочечной миРНК может содержать смысловые и антисмысловые нити, спаренные, чтобы содержать выступ, например, один или два 5' и 3' выступа, или 3' выступ из 1 - 3 нуклеотидов. Выступы могут быть результатом того, что одна нить является больше, чем другая, или результатом того, что две нити одинаковой длины смещены. Некоторые варианты будут иметь по крайней мере один 3' выступ. В одном из вариантов, оба конца молекулы миРНК будут иметь 3' выступ. В некоторых вариантах, выступ является 2 нуклеотидами.

20 В некоторых вариантах длина дуплексной области находится между 15 и 30 нуклеотидами, или составляет 18, 19, 20, 21, 22 и 23 нуклеотидов в длину, например, о диапазоне длин в соединении клейкой миРНК (кмиРНК) говорилось выше. Соединения клейкой миРНК могут быть похожими по длине и структуре на естественные продукты, переработанные дайсером из длинных дмиРНК.

25 Варианты, в которых две цепочки соединения кмиРНК связаны, например, ковалентно связаны, также включены. Шпилька, или другие одноцепочечные структуры, которые обеспечивают необходимую двухцепочечную область и 3'выступ также находятся в рамках изобретения.

30 Соединения миРНК описанные в данном документе, в том числе двухцепочечные соединения миРНК и одноцепочечные соединения миРНК могут выступать медиаторами

сайленсинга (молчания) РНК-мишени, например, мРНК, например, транскрипта гена, который кодирует белок. Для удобства, такие мРНК также упоминаются в этом документе, как мРНК выключения. Такой ген, также упоминается в качестве гена-мишени. В общем, РНК выключения является эндогенным геном или патогенным геном. Кроме того, другие

5 РНК, отличные от мРНК, например, тРНК, и вирусные РНК, также могут быть нацелены.

Фраза "выступать медиатором РНК-и" относится к способности выключать, специфическим образом в соответствии с последовательностью, РНК-мишени. Не углубляясь в теорию, считается, что сайленсинг использует механизм РНК-и или процесс и РНК-проводники, например, клейкие миРНК соединения из 21–23 нуклеотидов.

10 В одном из вариантов, соединение миРНК является "достаточно комплементарным" РНК-мишени, например, целевой мРНК таким образом, что, соединения миРНК выключают производство белка, кодируемого целевой мРНК. В другом варианте, соединение миРНК является "точно комплементарным" РНК-мишени, например, отжигу соединения миРНК и целевой мРНК, например, для формирования гибрида, сделанного исключительно из пар

15 оснований Уотсона-Крика в области точной комплементарности. "Достаточно комплементарная" РНК-мишень может включать внутреннюю область (например, не менее 10 нуклеотидов), которая является точно комплементарной РНК-мишени. Кроме того, в некоторых вариантах, соединение миРНК специфически различает однонуклеотидное различие. В этом случае, соединение миРНК опосредует медиацию РНК-и только если

20 обнаруживается точная комплементарность в области (например, в рамках 7 нуклеотидов) однонуклеотидное различие.

МикроРНК

Микро-РНК (микроРНК) являются высоко консервативным классом малых молекул

25 РНК, которые воспроизводятся с ДНК в геномах растений и животных, но не транслируются в белок. Обработанные микроРНК являются одноцепочечными молекулами РНК, состоящими из ~ 17-25 нуклеотидов (нт), которые встраиваются в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (*РИСК*) и были определены в качестве ключевых регуляторов развития, пролиферации клеток, апоптоза и дифференциации. Полагают, что они играют роль

30 в регуляции экспрессии генов, связываясь с 3'-нетранслируемой областью специфических

мРНК. РИСК опосредует снижение экспрессии генов через трансляционное ингибирование, расщепления транскрипта, или оба этих процесса. РИСК также участвует в транскрипционном сайленсинге в ядрах широкого спектра эукариотов.

Количество последовательностей миРНК, выявленное на сегодняшний день, является большим и растущим, наглядные примеры можно найти, например, в работе: “*miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature*” Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. NAR, 2006, 34, Database Issue, D140-D144; “*The microRNA Registry*” Griffiths-Jones S. NAR, 2004, 32, Database Issue, D109-D111; а также на сайте <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>.

Антисмысловые олигонуклеотиды

В одном варианте, нуклеиновая кислота — это антисмысловый олигонуклеотид, направленный против полинуклеотида-мишени. Термин "антисмысловый олигонуклеотид" или просто "антисмысловой" предназначен для обозначения олигонуклеотидов, которые комплементарны к полинуклеотидной последовательности-мишени. Антисмысловые олигонуклеотиды являются одинарными цепочками ДНК или РНК, которые являются комплементарными к выбранной последовательности, например, к гену-мишени мРНК. Принято считать, что антисмысловые олигонуклеотиды ингибируют экспрессию генов за счет связывания с комплементарной мРНК. Связывание с мРНК-мишенью может вести к угнетению экспрессии генов либо посредством предотвращения трансляции комплементарных цепочек мРНК посредством связывания с ними, либо приводя к деградации мРНК-мишени. Антисмысловая ДНК может быть использована для того, чтобы достичь специфическую, комплементарную (кодирующую или некодирующую) РНК. Если происходит связывание, то данный ДНК/РНК гибрид может быть расщеплен ферментом РНКазы Н. В отдельных случаях, антисмысловые олигонуклеотиды содержат приблизительно от 10 до 50 нуклеотидов, более предпочтительны приблизительно от 15 до 30 нуклеотидов. Этот термин охватывает также антисмысловые олигонуклеотиды, которые могут быть не точно комплементарны по отношению к желаемому гену-мишени. Таким образом, изобретение может быть использовано в тех случаях, когда антисмысловые демонстрируют не узко специфическую активность, либо когда антисмысловые последовательности,

содержат одно или более несоответствий в отношении последовательности-мишени, что является наиболее предпочтительным в практическом применении.

Антисмысловые олигонуклеотиды продемонстрировали эффективность и проявили себя как избирательные целевые ингибиторы синтеза белка, и, следовательно, могут быть использованы для избирательного ингибирования синтеза белка посредством воздействия на ген-мишень. Эффективность антисмысловых олигонуклеотидов в отношении ингибирования синтеза белка достоверно установлена. Например, синтез полигалактаураназы и мускариновых рецепторов к ацетилхолину 2-го типа подавляются антисмысловыми олигонуклеотидами, направленными на соответствующие им мРНК последовательности (патент США No 5739119 и патент США No5759829). Кроме того, примеры антисмыслового ингибирования были продемонстрированы в отношении нуклеарного белка циклина, гена, определяющего полирезистентность к лекарственным средствам (MDG1), ICAM-1, E-селектина, STK-1, стриального альфа-рецептора ГАМК и человеческого EGF ((Jaskulski *et al* ., *Science*. 1988 Jun 10;240(4858):1544-6; Vasanthakumar and Ahmed, *Cancer Commun*. 1989;1(4):225-32 ; Peris *et al* ., *Brain Res Mol Brain Res*. 1998 Jun 15;57(2):310-20; патент США No5801154; патент США No5789573; патент США No 5718709 и патент США No5610288). Более того, описано что антисмысловые конструкции ингибируют и могут быть использованы для лечения различных аномальных клеточных пролифераций, например, рака (патент США No5747470; патент США No5591317 и патент США No5783683).

Способы получения антисмысловых олигонуклеотидов известны в данной области техники и могут быть легко адаптированы для производства антисмысловых олигонуклеотидов, которые нацелены на любые последовательности полинуклеотида. Выбор антисмысловых олигонуклеотидных последовательностей, специфичных для данной последовательности-мишени, основан на анализе выбранной последовательности-мишени и определении вторичной структуры, T_m , связывающей энергии, и относительной стабильности. Антисмысловые олигонуклеотиды могут быть отобраны на основе их относительной неспособности образовывать димеры, шпильки, или другие вторичные структуры, которые могут уменьшать или не допускать специфическое связывание с мРНК-мишенью в клетке хозяина. Наиболее предпочтительные области-мишени мРНК включают соответствующие зоны в области или вблизи кодона, иницирующего AUG трансляции, и соответствующие последовательности, которые в значительной степени комплиментарны

5'областям мРНК. Рекомендации относительно анализа вторичных структур и выбора целевой области могут подготавливаться, например, с помощью программного обеспечения *OLIGO primer analysis*, v.4 (Molecular Biology Insights) и/или программного обеспечения *BLASTN 2.0.5* алгоритма (Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 1997, 25(17):3389-402).

5 Антагомиры

Антагомиры это РНК-подобные олигонуклеотиды, которые включают различные модификации для защиты РНКазы и фармакологических эффектов, таких, как тканевое разрастание и клеточное поглощение. Они отличаются от обычных РНК, например, полным 2'-О- метилированием сахара, фосфоротиоатным каркасом и, например, фрагментом холестерина на 3'-конце. Антагомиры могут быть использованы для эффективного выключения экспрессии генов (сайленсинга) эндогенных микроРНК путем формирования дуплексов, состоящих из антагомира и эндогенной микроРНК. Тем самым предотвращается микроРНК-индуцированный сайленсинг генов. Примером антагомир-опосредованного микроРНК сайленсинга является подавление экспрессии генов микроР-122, описанное в работе Krutzfeldt *et al*, Nature, 2005, 438: 685-689, которая включена здесь в качестве ссылки в полном объеме. Антагомир РНК может быть синтезирован с помощью стандартного протокола твердофазного способа синтеза олигонуклеотидов. См. Заявка на патент США сер. номера 11/502158 и 11/657341 (предоставленная информация включена в настоящий документ в качестве ссылки).

Антагомир может включать лиганд-конъюгированные мономерные субъединицы и мономеры для синтеза олигонуклеотидов. Типичные мономеры описаны в заявке США No 10/916185 поданной 10 августа 2004 г. Антагомир может иметь ZXY структуру, как описано в заявке PCT No. PCT/US2004/07070, поданной 8 марта 2004 г. Антагомир может быть представлен в виде комплекса с амфипатическими частицами. Типичные амфипатические фрагменты для использования с олигонуклеотидами описаны в заявке PCT No. PCT/US2004/07070, поданной 8 марта 2004 г.

Аптамеры

Аптамеры являются молекулами нуклеиновой кислоты или пептидные молекулы, которые с высокой степенью сродства и специфичности связываются с определенной интересующей молекулой (Tuerk and Gold, *Science* 249:505 (1990); Ellington and Szostak,

Nature 346:818 (1990)). Имеется успешный опыт получения ДНК или РНК аптамеров, которые способны связываться с различными веществами, от крупных белков до небольших органических молекул. См. работу Eaton, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1:10-16 (1997), Famulok, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9:324-9(1999), и Hermann and Patel, *Science* 287:820-5 (2000).

- 5 Аптамеры могут основываться на структурах РНК или ДНК, а также могут включать *рибосвич*. Рибосвич это часть молекулы мРНК, которая может непосредственно связывать малые молекулы-мишени, и связанное состояние которых влияет на активность генов. Таким образом, мРНК, которая содержит рибосвич, принимает непосредственное участие в регулировании своей собственной деятельности, в зависимости от наличия или отсутствия ее
- 10 молекулы-мишени. Как правило, аптамеры разработаны путем многократных туров селекции *in vitro* или, что эквивалентно, СЭЛЭО (систематическая эволюция лигандов экспоненциальным обогащением) для связывания с различными молекулами-мишенями, такими как малые молекулы, белки, нуклеиновые кислоты, и даже клетки, ткани и организмы. Аптамер может быть получен любым известным способом, в том числе
- 15 синтетическим, рекомбинантным, а также методом очистки, и может быть использован самостоятельно или в сочетании с другими аптамерами, специфическими к той же мишени. Кроме того, как далее описано более полно в настоящем документе, термин "аптамер" включает, в частности "вторичные аптамеры", содержащие консенсусную последовательность, производную от двух или более сравниваемых известных аптамеров к
- 20 данной мишени.

Рибозимы

- Согласно другому варианту изобретения, частицы нуклеиновая кислота-липид связаны с рибозимами. Рибозимы являются комплексами РНК молекул, которые имеют
- 25 специфические каталитические домены, обладающие эндонуклеазной активностью (Kim и Cech, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Dec;84(24):8788-92; Forster and Symons, *Cell.* 1987 Apr 24;49(2):211-20). К примеру, многие рибозимы ускоряют реакции переноса фосфорных эфиров с высокой степенью специфичности, часто отщепляя только один из нескольких фосфорных эфиров в олигонуклеотидном субстрате (Cech et al. , *Cell.* 1981 Dec;27(3 Pt 2):487-
- 30 96 ; Michel and Westhof, *J Mol Biol.* 1990 Dec 5;216(3):585-610 ; Reinhold-Hurek and Shub, *Nature.* 1992 May 14;357(6374):173-6). Эта специфичность отражает требования, согласно

которым связанность субстрата через взаимодействия, основанные на принципе избирательного спаривании оснований, с внутренней ведущей последовательностью ("IGS") рибозима является приоритетной в химической реакции.

В настоящее время известно по крайней мере шесть основных вариантов ферментативных РНК природного происхождения. Каждый вариант может катализировать гидролиз фосфодиэфирных связей РНК *in trans* (и таким образом могут расщеплять другие молекулы РНК) в физиологических условиях. Обычно ферментативные нуклеиновые кислоты действуют посредством первичного связывания с РНК-мишенью. Такое связывание происходит через связывающие участки-мишени ферментативных нуклеиновых кислот, располагающихся в непосредственной близости к ферментативному участку молекулы, которая воздействует на РНК-мишень путем расщепления. Таким образом, ферментативная нуклеиновая кислота изначально распознает, а затем связывается с РНК-мишенью посредством комплементарного спаривания оснований, и в случае связывания с необходимым участком, воздействует ферментативно и вырезает РНК-мишени. Стратегическое расщепление таких РНК-мишеней разрушает их способность непосредственно к синтезу закодированного белка. После того как ферментативная нуклеиновая кислота связалась и расщепила свою РНК-мишень, она освобождается от данной РНК в поисках следующей мишени и может повторно связываться и расщеплять новую мишень.

Молекула ферментативной нуклеиновой кислоты может образовываться в мотивах «головки молотка», «шпильки», вируса гепатита δ группы I интрон или РН-аза Р РНК (в ассоциации с РНК ведущей последовательностью) или Нейроспоры ВС РНК, для примера. Конкретные примеры мотива «головки молотка» описываются в работе Rossi *et al.* Nucleic Acids Res. 1992 Sep 11;20(17):4559-65. Примеры мотивов «шпильки» описываются в работе Hampel *et al.* (Eur. Pat. Appl. Publ. No. EP 0360257), Hampel and Tritz, Biochemistry 1989 Jun 13;28(12):4929-33; Hampel *et al.*, Nucleic Acids Res. 1990 Jan 25;18(2):299-304 и патенте США No 5631359. Пример мотива вируса гепатита Δ описывается в работе Perrotta and Been, Biochemistry. 1992 Dec 1;31(47):11843-52; пример мотива Рназы Р описан в работе Guerrier-Takada *et al.*, Cell. 1983 Dec;35(3 Pt 2):849-57; мотив Нейроспора ВС РНК рибозима описывается в работе Collins (Saville and Collins, Cell. 1990 May 18;61(4):685-96; Saville and Collins, Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Oct 1;88(19):8826-30; Collins and Olive, Biochemistry.

1993 Mar 23;32(11):2795-9); а пример Группы I-интрон описан в патенте США No 4987071. Важными характеристиками молекул ферментативной нуклеиновой кислоты, которые используются в данном изобретении, являются их избирательное связывание с участком субстрата, который является комплементарным к одному или нескольким участкам генов-мишеней ДНК или РНК, а также то, что они имеют нуклеотидные последовательности в пределах или рядом с участком, связывающим субстрат, за счет которых молекула приобретает способность расщеплять РНК. Таким образом использование рибозимных конструкций не должно быть ограничено конкретными мотивами, упомянутыми в данном документе.

10 Способы получения рибозимов нацеленных на любую полинуклеотидную последовательность, известны в данной области техники. Рибозим может быть разработан, как описано в публикации международной заявки на патент No WO 93/23569 и в публикации международной заявки на патент No WO 94/02595, каждая из которых специально включен здесь в качестве, и синтезирован, чтобы быть протестированным *in vitro* и *in vivo* согласно 15 указанным выше документам.

Активность рибозимов может быть оптимизирована за счет изменения длины связывающего плеча рибозима либо за счет химического синтеза рибозимов с модификациями, которые препятствуют их разрушению сывороточными рибонуклеазами (см., например, публикацию международной заявки на патент No WO 92/07065; публикацию 20 международной заявки на патент No. WO 93/15187; публикацию международной заявки на патент No. WO 91/03162; публикацию европейской заявки на патент No 92110298.4; Патент США No 5334711; и публикацию международной заявки на патент No. WO 94/13688, которые описывают различные химические модификации, которые могут быть произведены в фрагментах сахара ферментативных РНК молекул); с модификациями, которые повышают 25 их эффективность в клетках, и с удаленными стволовыми основаниями II, что сокращает время синтеза РНК и уменьшает химические требования.

Иммуностимулирующие олигонуклеотиды

Нуклеиновые кислоты, связанные с липидными частицами согласно настоящему 30 изобретению могут быть иммуностимулирующими, включающими иммуностимулирующие олигонуклеотиды (ИСЦ; одно-или двухцепочечные), способные вызывать иммунную

реакцию при введении субъекту, который может быть млекопитающим или другим пациентом. ИСЦ включают, например, определенные палиндромы, ведущие к вторичным структурам шпильки (см. Yamamoto S., *et al.* (1992) J. Immunol. 148: 4072-4076)), или CpG мотивам, а также другие известные свойства ИСЦ (такие, как мульти G-домены см. WO 96/11266).

Иммунный ответ может быть врожденным или адаптивным иммунным ответом. Иммунная система разделяется на большую — врожденную иммунную систему, и приобретенную адаптивную иммунную систему позвоночных животных, последняя из которых делится на гуморальные и клеточные компоненты. В отдельных вариантах, может
10 иметься иммунный ответ слизистой оболочки.

В отдельных вариантах, иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты являются иммуностимулирующими только при введении в сочетании с липидной частицей, и не являются иммуностимулирующими при введении в своей "свободной форме". В соответствии с настоящим изобретением, такой олигонуклеотид считается
15 иммуностимулирующим.

Считается, что иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты не являются специфичными по последовательности, если не требуется, чтобы они специфически связывались с целевым полинуклеотидом и снижали его экспрессию, чтобы спровоцировать иммунный ответ. Таким образом, определенные иммуностимулирующие нуклеиновые
20 кислоты могут включать последовательность, соответствующую области естественного нахождения в гене или мРНК, но они могут по-прежнему считаться не специфичными по последовательности иммуностимулирующими нуклеиновыми кислотами.

В одном из вариантов, иммуностимулирующая нуклеиновая кислота или олигонуклеотид содержит, по меньшей мере один CpG динуклеотид. Олигонуклеотид или
25 CpG динуклеотид может быть метилированным или метилированным. В другом варианте, иммуностимулирующая нуклеиновая кислота содержит, по меньшей мере один CpG динуклеотид с метилированным цитозином. В одном из вариантов, нуклеиновая кислота содержит единственный динуклеотид CpG, где цитозин в вышеупомянутом CpG динуклеотиде является метилированным. В особом варианте, нуклеиновая кислота состоит из
30 последовательности 5' TAACGTTGAGGGGCAT 3'. В альтернативном варианте, нуклеиновая кислота, содержит, по меньшей мере два CpG динуклеотида, где по меньшей мере один

цитозин в динуклеотидах CpG является метилированным. В другом варианте, каждый цитозин в CpG динуклеотидах, присутствующий в последовательности, является метилированным. В другом варианте, нуклеиновая кислота содержит множество динуклеотидов CpG, где по меньшей мере один из указанных CpG динуклеотидов включает метилированный цитозин.

В одном особом варианте, нуклеиновая кислота состоит из последовательности 5' TTCCATGACGTTCCCTGACGT 3'. В другом конкретном варианте, нуклеиновая кислота состоит из последовательности, 5' TCCATGACGTTCCCTGACGT 3' в котором два цитозина, выделенные жирным шрифтом, метилированы. В отдельных вариантах, ОДН выбран из группы, состоящей из ОДНов ОДН № 1, ОДН № 2, ОДН № 3, ОДН № 4, ОДН № 5, ОДН № 6, ОДН № 7, ОДН № 8, и ОДН № 9, как продемонстрировано ниже.

Таблица3. Примеры иммуностимулирующих олигонуклеотидов (ОДН)

ОДН Название	Идентификатор последовательности	Последовательность ОДН (5'-3') .
ОДН 1 человеческий с-трус	1	5'-TAACGTTGAGGGGCAT-3
* ОДН 1m		5'-TAAZGTTGAGGGGCAT-3
ОДН 2		5'-TCCATGACGTTCCCTGACGTT-3
* ОДН 2m		5'-TCCATGAZGTTCCCTGAZGTT-3
ОДН 3		5'-TAAGCATAACGGGGTGT-3
ОДН 5		5'-AACGTT-3
ОДН 6		5'-GATGCTGTGTCTCGGGTCTCCGGGC-3'
ОДН 7		5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3'
ОДН 7m		5'-TZGTZGTTTTGTZGTTTTGTZGTT-3'
ОДН 8		5'-TCCAGGACTTCTCTCAGGTT-3'
ОДН 9		5'-TCTCCCAGCGTGCGCCAT-3'
ОДН 10 мышьяная молекула межклеточной адгезии -1		5'-TGCATCCCCCAGGCCACCAT-3
ОДН 11 человеческая молекула межклеточной адгезии -1		5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3'
ОДН 12 человеческая молекула межклеточной адгезии -1		5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3'

ОДН Название	Идентификатор последовательности	Последовательность ОДН (5'-3') .
ОДН 13 человеческий egb-B-2		5'-GGT GCTCACTGC GGC-3'
ОДН 14 человеческий с-тус		5'-AACC GTT GAG GGG CAT-3'
ОДН 15 человеческий с-тус		5'-TAT GCT GTG CCG GGG TCT TCG GGC-3'
ОДН 16		5'-GTGCCG GGGTCTTCGGGC-3'
ОДН 17 Рецептор человеческого инсулинового фактора роста 1 -		5'-GGACCCTCCTCCGGAGCC-3'
ОДН 18 Рецептор человеческого инсулинового фактора роста 1		5'-TCC TCC GGA GCC AGA CTT-3'
ОДН 19 Рецептор человеческого эпидермального фактора роста		5'-AAC GTT GAG GGG CAT-3'
ОДН 20 Рецептор эпидермального фактора роста		5'-CCGTGGTCA TGCTCC-3'
ОДН 21 человеческий Сосудистый эндотелиальный фактор роста		5'-CAG CCTGGCTCACCG CCTTGG-3'
ОДН 22 мышинный Фосфокиназа С - альфа		5'-CAG CCA TGG TTC CCC CCA AC-3'
ОДН 23		5'-GTT CTC GCT GGT GAG TTT CA-3'
ОДН 24 человеческий Bcl-2		5'-TCT CCCAGCGTGCGCCAT-3'
ОДН 25 человеческий C-Raf-s		5'-GTG CTC CAT TGA TGC-3'
ОДН № 26 человеческий Сосудистый эндотелиальный фактор роста Рецептор-1		5'-GAGUUCUGAUGAGGCCGAAAGG-CCGAAAGUCUG-3'
ОДН № 27		5'-RRCGYY-3'
ОДН № 28		5'-AACGTTGAGGGGCAT-3'
ОДН № 29		5'-CAACGTTATGGGGAGA-3'

ОДН Название	Идентификатор последовательности	Последовательность ОДН (5'-3') .
ОДН № 30 человеческий с-тис		5'-TAACGTTGAGGGGCAT-3'

5 Z" представляет метилированный остаток цитозина. ОДН 14 является 15- мер олигонуклеотид и ОДН 1 совпадает с олигонуклеотидом, владеющим тимидином добавленным на 5 'конец, превращая ОДН 1 в 16- мер. Не было зарегистрировано различий в биологической активности между ОДН 14 и ОДН 1 и оба демонстрируют схожую иммуностимулирующую активность (Mui *et al.*, 2001)

10 Дополнительные специфические последовательности нуклеиновых кислот олигонуклеотидов (ОДН), пригодные для использования в композиции, и способы изобретения описаны в работе Raney *et al.*, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 298:1185-1192 (2001). В некоторых вариантах, ОДН использованные в композициях и способах согласно настоящему изобретению имеют фосфодиэфирный ("PO") скелет или фосфоротиоатный ("PS") скелет, и/или по крайней мере один метилированный
15 остаток цитозина в CpG мотиве.

Олигонуклеотиды-ловушки

Поскольку факторы транскрипции распознают свои относительно короткие
20 связывающие последовательности, даже в отсутствие окружающей геномной ДНК, короткие олигонуклеотиды переносщие согласованные связывающие последовательности специфического фактора транскрипции, могут быть использованы в качестве инструментов для управления экспрессией генов в живых клетках. Эта стратегия вовлекает во внутриклеточную доставку так называемые "олигонуклеотиды ловушки ", которые затем
25 распознаются и связываются целевым фактором. Захват ловушкой транскрипционных факторов ДНК-связывающего участка, делает фактор транскрипции неспособным последовательно связываться с регионами-промоутерами генов-мишеней. Ловушки могут быть использованы в качестве терапевтических средств, либо для подавления экспрессии генов, которые активизируются фактором транскрипции, или регулирующих генов, которые

супрессированы связыванием транскрипционного фактора. Примеры использования олигонуклеотидов-ловушек могут быть найдены в работе Mann *et al.*, J. Clin. Invest., 2000, 106: 1071-1075, которая в точности включена здесь в качестве ссылки, в полном объеме.

5 Супермир

Супермир относится к одноцепочечному, двухцепочечному или частично двухцепочечному олигомеру или полимеру рибонуклеиновой кислоты (РНК) или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или к обоим, или к их модификациям, который имеет нуклеотидную последовательность, практически идентичную микроРНК, и является

10 антисмысловым по отношению к своим целям. Этот термин включает олигонуклеотиды, состоящие из природных нуклеиновых оснований, сахаров и ковалентных межнуклеозидных (скелетных) связей, которые содержат хотя бы одну часть не природного происхождения, которая функционирует подобным образом. Олигонуклеотиды, измененные или замещенные

15 таким образом, предпочтительнее естественной формы, благодаря наличию желаемых свойств, таких, как, например, увеличенное клеточное поглощение, повышение сродства к целевой нуклеиновой кислоте и повышенная стабильность в присутствии нуклеаз. В предпочтительном варианте супермир не включает смысловой нити, а в другом предпочтительном варианте супермир в значительной степени не само-гибридизируется. Супермир характерный для изобретения может иметь вторичную структуру, но главным

20 образом, в физиологических условиях он является одноцепочечным. Супермир, который является большей частью одноцепочечным есть одноцепочечным в пределах менее 50% (например, менее 40%, 30%, 20%, 10%, или 5%) супермира, спаренного с собой (дуплексного). Супермир может включать сегмент шпильку, например, последовательность, преимущественно на конце 3', может самогибридизироваться и формировать дуплексную

25 область, например, дуплексную область из, по крайней мере 1, 2, 3 или 4 и преимущественно менее чем из 8, 7, 6, или n нуклеотидов, например, 5 нуклеотидов. Дуплексная область может быть связана линкером, например, нуклеотидным линкером, например, 3, 4, 5, или 6 dTs, например, модифицированным dTs В другом варианте супермир является спаренным с более коротким олиго, например, состоящим из 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов в длину,

30 например, с одним или двумя 3' и 5' концами или с одним концом в не-терминальной части или в середине супермира.

Имитаторы микроРНК

Имитаторы микроРНК представляют собой класс молекул, которые могут быть использованы для имитации способности сайленсинга генов одной или нескольких микроРНК. Таким образом, термин "имитатор микроРНК" относится к синтетическим некодирующим РНК (т.е. микроРНК, не полученная посредством очистки от ресурса эндогенной микроРНК), которые способны проникать в пути метаболизма РНК-и и регулирования генной экспрессии. Имитаторы микроРНК могут быть разработана как зрелые молекулы (например, одноцепочечные) или имитировать предшественников (например, в при- или пре- микроРНК). Имитаторы микроРНК могут состоять из нуклеиновой кислоты (модифицированных или немодифицированных нуклеиновых кислот) в том числе содержащей олигонуклеотиды, без ограничений, РНК, модифицированной РНК, ДНК, модифицированной ДНК, заблокированных нуклеиновых кислот, или 2'-О, 4'-С-этиленового мостика нуклеиновых кислот (ЭНК), или любой комбинации из выше упомянутых (в том числе ДНК-РНК-гибридов). Кроме того, имитаторы микроРНК могут содержать конъюгаты, что может влиять на доставку, внутриклеточную компартментализацию, устойчивость, специфичность, функциональность, использование цепочек, и/или потенцию. В одной модели, имитаторы микроРНК являются двухцепочечными молекулами (например, с дуплексной областью, длиной приблизительно в пределах 16 и 31 нуклеотидов) и содержат одну или несколько последовательностей, которые идентичны зрелой цепи данной микроРНК. Модификации могут включать 2' модификации (в том числе 2'-О метил модификации и 2' F модификации) на одной или обеих цепочках молекулы и межнуклеотидные модификации (например, фосфориотатные модификации), которые повышают стабильность нуклеиновых кислот и/или специфичность. Кроме того, имитаторы микроРНК могут включать выступы. Выступы могут состоять из 1-6 нуклеотидов на любом 3' и 5' конце любой цепочки и могут быть модифицированы в целях повышения стабильности и функциональности. В одном из вариантов, имитатор микроРНК включает дуплексную область в пределах 16-31 нуклеотидов и один или более из следующих образцов химической модификации: смысловая цепочка, содержащая 2'-О-метил модификации нуклеотидов 1 и 2 (считая с 5' конца смыслового олигонуклеотида), и все Ц и У; модификации антисмысловой цепочки могут включать 2' F

модификацию всех Ц и У, фосфорилирование 5' конца олигонуклеотида, и стабилизированные межнуклеотидные связи, ассоциированные с 2-нуклеотид 3' выступом.

Антимир или ингибитор микро РНК

5 Термины "антимир", "микроРНК ингибитор", "миР ингибитор", или "ингибитор" являются синонимами и относятся к олигонуклеотидам или модифицированным олигонуклеотидам, которые влияют на возможности специфических микроРНК. В общем, ингибиторы являются по своей природе нуклеиновой кислотой или модифицированными нуклеиновыми кислотами включая олигонуклеотиды, содержащие РНК, модифицированную РНК, ДНК, модифицированную ДНК, заблокированные нуклеиновые кислоты (ЗНК), или 10 любую комбинацию выше упомянутых. Модификации включают 2' модификации (в том числе 2'-О алкил модификации и 2' F модификации) и межнуклеотидные модификации (например, фосфоротиоатные модификации), что может влиять на доставку, устойчивость, специфичность, внутриклеточную компартментализацию, или потенцию. Ингибиторы могут 15 принимать различные конфигурации в том числе одноцепочечную, двухцепочечную (РНК/РНК или РНК/ДНК-дуплексов), и конструкции шпильки, в общем, ингибиторы микроРНК содержат одну или несколько последовательностей или частей последовательности, которые являются комплементарными или частично комплементарными зрелой цепочке (или цепочкам) из микроРНК, являющейся целевой, кроме того, ингибитор 20 микроРНК может также содержать дополнительные последовательности, расположенные в 5' и 3' по отношению к последовательности, которая является обратным комплементом зрелой миРНК. Дополнительные последовательности могут быть обратными комплементами к последовательностям, которые примыкают к зрелой микроРНК в при-микроРНК, из которых зрелая микроРНК получена, или дополнительные последовательности могут быть 25 случайными последовательностями (имеющими смесь из А, Г, Ц или У). В некоторых вариантах, одна или обе дополнительных последовательности являются случайными последовательностями, способными образовывать шпильки. Таким образом, в некоторых вариантах, последовательности, являющиеся обратным комплементом микроРНК защищены с боков на стороне 5', и на стороне 3' структурами шпильки. Когда ингибиторы микро-РНК 30 двухцепочечные, они могут включать несоответствия между нуклеотидами на противоположных цепочках. Кроме того, ингибиторы микро-РНК, могут быть связаны со

спаренными фрагментами в целях содействия поглощению ингибитора в клетку. Так, например, ингибитор микро-РНК может быть связан с холестерином 5-(бис(4-метоксифенил)(фенил) метокси)-3-гидроксипентилкарбамат), который позволяет пассивное поглощение ингибитора микро-РНК в клетку. Ингибиторы микро-РНК, в том числе ингибиторы шпильки микроРНК подробно описаны в работах. Vermeulen *et al.*, "Double-Stranded Regions Are Essential Design Components Of Potent Inhibitors of P1CK Function," RNA 13: 723-730 (2007) и в WO2007/095387 и WO 2008/036825 каждая из которых включена здесь в качестве ссылки в полном объеме. Обычный специалист в данной области техники может выбрать последовательность из базы данных для желаемого микроРНК и сконструировать ингибитор, пригодный для способов, описанных здесь.

U1 адаптер

U1 адаптер ингибирует поли А сайты и является бифункциональными олигонуклеотидами с целевой комплементарностью домена к сайту в терминальном экзоне гена-мишени и "U1 домене", который связывается с U1 малым ядерным компонентом РНК U1 малого ядерного рибонуклеопротеина (мяРНП) (работа Goraczniak, *et al.*, 2008, Nature Biotechnology, 27(3), 257-263, которая в точности включена здесь в качестве ссылки, в полном объеме). U1 мяРНП является рибонуклеопротеиновым комплексом, который функционирует в основном, чтобы направлять первые шаги в формировании сплайсосомы путем связывания с пре-мРНК экзон-интронной границей (Brown and Simpson, 1998, Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 49:77-95). Нуклеотиды 2-11 5' конца U1 мяРНК пары оснований связываются с 5'ss пре-мРНК. В одном из вариантов, олигонуклеотиды изобретения являются U1 адаптерами. В одном из вариантов, U1 адаптер может быть введен в сочетании, по крайней мере, с одним другим иРНК агентом.

Модификации олигонуклеотидов

Немодифицированные олигонуклеотиды могут быть меньше, чем оптимальные в некоторых приложениях, например, немодифицированные олигонуклеотиды могут быть склонны к деградации например, клеточными нуклеазами. Нуклеазы могут гидролизовать фосфодиэфирные связи нуклеиновых кислот. Однако, химические модификации

олигонуклеотидов могут придавать улучшенные свойства, и, например, могут помогать олигонуклеотидам быть более устойчивыми к нуклеазам.

Поскольку олигонуклеотиды являются полимерами подразделений или мономерами, многие из модификаций, описанных ниже происходят в положении, которое повторяется в рамках олигонуклеотида, например, модификация основания, сахара, фосфатного фрагмента, или немостикового кислорода фосфатного фрагмента. Нет необходимости для всех позиций данного олигонуклеотида быть однообразно модифицированными, а на самом деле больше, чем одна из вышеупомянутых модификаций могут быть включены в единственный олигонуклеотид или даже в единственный нуклеозид в олигонуклеотиде.

В некоторых случаях модификация будет происходить на всех позициях субъектов в олигонуклеотиде, но во многих, и фактически в большинстве случаев модификации не будет. К примеру, модификация может произойти только на 3' и 5' терминальной позиции, может происходить только во внутренней области, может произойти только в терминальных регионах, например, в положении на терминальном нуклеотиде или в последних 2, 3, 4, 5, или 10 нуклеотидах олигонуклеотида. Модификация может произойти в области двойной цепочки, области одинарной цепочки, или в обеих областях. Модификация может произойти только в области двойной цепочки двухцепочечного олигонуклеотида или может произойти только в области одинарной цепочки двухцепочечного олигонуклеотида. Например, фосфоротиоатная модификация на немостиковой позиции кислорода может происходить только на одном или обоих концах, может происходить только в терминальной области, например, в позиции на терминальном нуклеотиде или в последних 2, 3, 4, 5, или 10 нуклеотидах цепочки, или может произойти в областях двойной и одинарной цепочек, особенно на концах. 5' конец или концы могут быть фосфорилированы.

Модификация описанная здесь, может быть единственной модификацией, или единственным типом модификации, включенным в несколько нуклеотидов, или модификация может быть объединена с одной или несколькими другими модификациями описанными здесь. Модификации, описанные здесь, могут быть объединены в олигонуклеотид, например, различные нуклеотиды олигонуклеотидов имеют различные модификации, описанные здесь.

В некоторых вариантах особенно предпочтительно, например, повысить стабильность, включить особые нуклеиновые основы в выступ, или включить модифицированные нуклеотиды или нуклеотидные заместители, в одиночную цепочку выступов, например, в 5

'или 3' выступ, или в оба. Например, может быть желательно включить пуриновые нуклеотиды в выступы. В некоторых вариантах все или некоторые из оснований в 3 'и 5' выступе будут модифицированы, например, с помощью модификации, описанной здесь. Модификации могут включать, например, использование модификаций на 2 'ОН группе

5 рибозы сахара, например, использование дезоксирибонуклеотидов, например, дезокситимидина, вместо рибонуклеотидов, и модификации в фосфатной группе, например, фосфотиоатные модификации. Выступы не должны быть гомологичными с целевой последовательностью.

Специфические модификации обсуждаются более подробно ниже.

10

Фосфатная группа

Фосфатная группа является отрицательно заряженной частицей. Заряд распределен равномерно на два немостиковых атома кислорода. Однако, фосфатная группа может быть модифицирована заменой одного из атомов кислорода различными заместителями. Одним

15 из результатов этой модификации для фосфатного скелета РНК может быть повышенная устойчивость олигорибонуклеотидов к нуклеолитическому пробою. Таким образом, не углубляясь в теорию, может быть желательным в некоторых вариантах вносить изменения, которые приводят к незаряженному линкеру или заряженному линкеру с ассиметричным распределением заряда.

20

Примеры модифицированных фосфатных групп включают фосфотриоат, фосфороселенаты, боранофосфаты, боранофосфатные эфиры, фосфонаты водорода, фосфороамидаты, фосфонаты и фосфотриэфиры алкила или арила. В некоторых вариантах, один из немостиковых атомов фосфата кислорода в фосфатных фрагментах скелета можно заменить на любое из следующих: S, Se, BR₃ (R представляет собой водород, алкил, арил), C

25 (т.е. алкильная группа, арильная группа, и т.д. ...), H, NR₂ (R представляет собой водород, алкил, арил) или OR (R представляет собой алкил или арил). Атом фосфора в немодифицированной фосфатной группе является ахиральным. Тем не менее, замена одного из немостиковых кислородных атомов одним из выше названных атомов или групп атомов, превращает атом фосфора в хиральной, другими словами, атом фосфора в фосфатной группе,

30 модифицированный таким образом является стереогенным центром. Стереогенный атом

фосфора может обладать либо "R" конфигурацией (далее Rp) или "S" конфигурацией (далее Sp).

Фосфородитиоаты имеют оба немостиковых кислорода, замещенными серой. Фосфорный центр в фосфородитиоатах является ахиральным, что исключает образование
 5 диастереомеров олигорибонуклеотидов. Таким образом, не углубляясь в теорию, модификации обоих немостиковых атомов кислорода, которые исключают хиральный центр, например, образование фосфородитиоата, могут быть желательным потому, что они не могут производить смеси диастереомеров. Таким образом, немостиковыми атомами кислорода может быть независимо любой из S, Se, B, C, H, N, или OR (R представляет собой алкил или
 10 арил).

Фосфатный линкер также может быть изменен путем замены мостикового кислорода (т. е. кислорода, который связывает фосфат с нуклеозидом), азотом (соединенные мостом фосфоамидаты), серой (соединенные мостом фосфотиоаты) и углеродом (соединенные мостом метилефосфонаты). Замена может произойти в любом связывающем атоме
 15 кислорода или в обоих связывающих атомах кислорода. Когда мостиковый кислород является 3'-кислородом нуклеозида, замещение углеродом является предпочтительным. Когда мостиковый кислород является 5'-кислородом нуклеозида, замещение азотом является предпочтительным.

20 Замещение фосфатной группы

Фосфатная группа может быть замещена коннекторами, не содержащими фосфор. Не углубляясь в теорию, считается, что, поскольку заряженная фосфодиэфирная группа является
 25 реакционным центром в нуклеолитической деградации, замена ее нейтральными структурными имитаторами должна способствовать усилению стабильности нуклеазы. Опять же, не углубляясь в теорию, может быть желательным в некоторых вариантах внести изменения, в которых заряженная фосфатная группа замещена нейтральным фрагментом.

Примеры фрагментов, которые могут заменить фосфатную группу включают метилфосфонат, гидроксиламино, силоксан, карбонат, карбоксиметил, карбамат, амид, тиоэфир, линкер окиси этилена, сульфат, сульфонамид, тиоформацетал, формацетал, оксим,
 30 метиленимино, метилениметилено, метиленигидразо, метиленидиметилгидразо и

метиленоксиметиламино. Предпочтительные замены включают метиленкарбониламино и метиленметиламино группы.

Модифицированные фосфатные связи, где по крайней мере один из атомов кислорода связан с фосфатом был заменен или фосфатная группа была заменена безфосфорной группой, также рассматриваются как "не фосфодиэфирная скелетная связь".

Замещение рибофосфатного скелета

Имитирующие олигонуклеотид каркасы могут быть сконструированы там, где фосфатный линкер и сахар рибозы заменен нуклеозидом, устойчивым к нуклеазе или нуклеотидными заместителями. Не углубляясь в теорию, считается, что отсутствие периодически повторяющейся зарядки скелета снижает связывание с белками, которые распознают полианионы (например, нуклеазы). Снова не углубляясь в теорию, может быть желательно в некоторых вариантах внести изменения, в которых базы привязаны к нейтральному суррогатному скелету. Примеры включают мофилино, циклобутил, пирролидин и нуклеозидные заместители пептидо-нуклеиновую кислоту (ПНК). Предпочтительный заместитель — это заместитель ПНК.

Модификации сахара

Модифицированная РНК может включать модификацию всех или некоторых из групп сахара рибонуклеиновой кислоты. Например, 2'-гидроксильные группы (ОН) могут быть изменены или заменены множеством различных "окси" или "дезоксид" заместителей. Не углубляясь в теорию, ожидается увеличение стабильности, поскольку гидроксил больше не может быть депротонированным, чтобы сформировать ион 2'-алкоксида. 2'-алкоксид может катализировать деградацию путем внутримолекулярной нуклеофильной атаки на атом фосфора линкера. Опять же, не углубляясь в теорию, может быть желательно для некоторых вариантов, вносить изменения, в которых формирование алкоксида в 2' позиции не представляется возможным.

Примеры модификаций "окси" -2' гидроксильной группы включают алкокси или арилокси (OR, например, R = H, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар); полиэтиленгликоли (ПЭГ), O (CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OR; "заблокированные" нуклеиновые кислоты (ЗНК), в которых 2' гидроксил связан, например, метиленовым мостиком с 4' углеродом сахара той же рибозы; О-АМИН (АМИН = NH₂; алкиламино, диалкиламино,

гетероцикл, ариламино, диариламино, гетероариламино, или дигетероариламино, этилендиамин, полиамино) и аминоксигруппы, $O(CH_2)_n$ АМИН, (например, АМИН = NH_2 ; алкиламино, диалкиламино, гетероцикл, ариламино, диариламино, гетероариламино, или дигетероариламино, этилендиамин, полиамино). Следует отметить, что олигонуклеотиды, содержащие только метоксиэтил группы (МОЭ), $(OCH_2CH_2OCH_3)_n$, производные ПЭГ), демонстрируют стабильность нуклеазы сравнимую со стабильностью, модифицированной при помощи надежной фосфоротиоатной модификации.

"Дезокси" модификации включают водород (т.е. сахара дезоксирибозы, которые имеют особое значение для частей выступа частично двухцепочечной РНК); гало (например, фтор), амино (например, NH_2 ; алкиламино, диалкиламино, гетероцикл, ариламино, диариламино, гетероариламино, дигетероариламино-, или аминокислота); $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2$ -АМИН (АМИН = NH_2 ; алкиламино, диалкиламино, гетероцикл, ариламино, диариламино, гетероариламино, или дигетероариламино), $-NHC(O)R$ (R = алкил, циклоалкил, арил, алкил, гетероарил или сахара), циано; меркапто; алкил-тио-алкил; тиазоксигруппы и алкил, циклоалкил, арил, алкенил и алкинил, который может быть необязательно замещен например, амино функциональностью. Предпочтительными заместителями являются 2'-метоксиэтил, 2'- OCH_3 , 2'-О-аллил, 2'-С-аллил, и 2'-фтор.

Группа сахара может также содержать один или несколько атомов углерода, которые обладают противоположной стереохимической конфигурацией по отношению к соответствующему углероду в рибозе. Таким образом, олигонуклеотид может включать нуклеотиды содержащие, например, арабинозу, в качестве сахара. Мономер может иметь альфа-связь в позиции 1' сахаров, например, альфа-нуклеозидов. Олигонуклеотиды могут также включать "абазические" сахара, с отсутствием нуклеотических оснований на С-1'. Эти абазические сахара могут еще содержать модификации в одной или нескольких составляющих атомов сахара. Олигонуклеотиды могут также содержать один или более сахаров, которые находятся в L-форме, например, L-нуклеозиды.

Терминальные модификации

3' и 5' концы олигонуклеотида могут быть модифицированы. Такие модификации могут находиться в 3' конце, 5' конце или обоих концах молекулы. Они могут включать модификацию или замену полного терминального фосфата или одного или больше атомов

фосфатной группы. Например, 3' и 5' концы олигонуклеотида могут быть конъюгированы к другим функциональным молекулярным объектам, таким как меченые фрагменты, например, флуорофоры (например, пирен, TAMRA, флуоресцеин, Cy3 или Cy5 красители) или защитные группы (на основе, например, серы, кремния, бора или эфира). Функциональные молекулярные объекты могут быть присоединены к сахару через фосфатную группу и/или линкер. Терминальный атом линкера может соединять или замещать соединяющий атом фосфатной группы или C-3' или C-5' O, N, S или C группы сахара. Кроме того, линкер может соединять или замещать терминальный атом нуклеотидных заменителей (например, ПНК).

Когда набор линкер/фосфат-функциональный молекулярный объект-линкер/фосфат помещен между двумя нитями дцРНК, этот набор может заменить петлю шпильки РНК в агенте типа шпильки РНК.

Терминальные модификации, пригодные для модулирования активности, включают модификацию на 5' конце с фосфатом или фосфатными аналогами. Например, в предпочтительных вариантах антисмысловыми нитями дцРНК, являются 5' фосфорилированные или включающие фосфорильный аналог на 5' начальном крае. 5'-фосфатные модификации включают те, которые совместимы с *РИСК*-опосредованным сайленсингом гена. Подходящие модификации включают: 5'- монофосфат ((HO)₂(O)P-O-5'); 5'-дифосфат ((HO)₂(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-трифосфат ((HO)₂(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-гуанозин кэп (7- метилированный или неметилированный) (7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-аденозин кэп (A_{ppp}), и любая модифицированная или немодифицированная нуклеотидная кэп формула (N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'- монотиофосфат (фосфоротиоат; (HO)₂(S)P-O-5'); 5'-монодитиофосфат (фосфородитиоат; (HO)(HS)(S)P-O-5'), 5'-фосфоротиолат ((HO)₂(O)P-S-5'); любая дополнительная комбинация кислорода/серы замещенная монофосфаом, дифосфатом и трифосфатами (*e.g.* 5'-альфа-тиотрифосфат, 5'-гамма-тиотрифосфат, и т.д.), 5'-амидофосфаты ((HO)₂(O)P-NH-5', (HO)(NH₂)(O)P-O-5'), 5'-алкилфосфонаты (R=алкил=метил, этил, изопропил, пропил, и т.д., *например*. RP(OH)(O)-O-5'-, (OH)₂(O)P-5'-CH₂-), 5'-алкилэфирфосфонаты (R=алкилэфир=метоксиметил (MeOCH₂-), этоксиметил, и т.д., *например*. RP(OH)(O)-O-5'-).

Терминальные модификации также могут быть пригодными для мониторинга распределения, и в таких случаях предпочтительные группы для присоединения включают

флуорофоры, например, флуоресцин или краситель *Alexa*, например, *Alexa 488*. Терминальные модификации также могут быть пригодными для повышения поглощения, пригодные для этого модификации включают холестерин. Терминальные модификации также могут быть пригодными для сшивки агента РНК с другим фрагментом; пригодные для этого модификации включают митомицин С.

Нуклеиновые основания

Аденин, гуанин, цитозин и урацил являются наиболее распространенными основаниями, обнаруженными в РНК. Эти основания могут быть модифицированы или заменены, чтобы придать РНК улучшенные свойства. Например, олигорибонуклеотиды, устойчивые к действию нуклеазы, могут быть составлены из этих оснований или из синтетических и природных нуклеиновых оснований (например, инозина, тимина, ксантина, гипоксантина, нубуларина, изогуанизина или туберцидина) и любой из вышеуказанных модификаций. Кроме того, могут быть использованы замещенные или модифицированные аналоги любого из выше названных оснований, например, "редкие основания", "модифицированные основания", "основания неприродного происхождения" и "универсальные основания", описанные здесь. Примеры включают, без ограничений 2-аминоаденин, 6-метил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 5-галоурацил и цитозин, 5-пропинил урацил и цитозин, 6-азо урацил, цитозинн и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 5-галоурацил, 5-(2-аминопропил) урацил, 5-амино-аллил урацил, 8-гало, amino, тиол, тиоалкил, гидроксил и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-трифторметил и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин, 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и O-6 замещенные пурины, в том числе 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин, дигидроурацил, 3-деаза-5-азацитозин, 2-аминопурин, 5-алкилурацил, 7-алкилгуанин, 5-алкилцитозин, 7-деазааденин, N6, N6-диметиладенин, 2,6-диаминопурин, 5-амино-аллил-урацил, N3-метилурацил, замещенные 1,2,4-триазолы, 2-пиридион, 5-нитроиндол, 3-нитропиррол, 5-метоксиурацил, урацил-5-оксиуксусная кислота, 5-метоксикарбонилметилурацил, 5-метил-2-тиоурацил, 5-метоксикарбонилметил-2-тиоурацил, 5-метиламинометил-2-тиоурацил, 3-(3-амино-3карбоксиипропил)урацил, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N⁴-ацетилцитозин, 2-тиоцитозин,

5 N6-метиладенин, N6-изопентиладенин, 2-метилтио-N6-изопентениладенин, N-метилгуанины, или O-алкилированные основания. Кроме того пурины и пиримидины включают описанные в патенте США No 3687808, описанные в Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, и те, которые раскрыты в работе Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613.

Катионные группы

Модификации в олигонуклеотидах могут также включать присоединение одной или нескольких катионных групп к сахарам, основанию, и/или атому фосфора из фосфата или модифицированному фрагменту фосфатного скелета. Катионная группа может быть присоединена к любому атому на природном, необычном или универсальном основании, способному к замещению. Предпочтительной позицией является та, которая не мешает гибридизации, т. е. не мешает взаимодействиям водородных связей, необходимым для спаривания оснований. Катионная группа может быть присоединена, например, через

10 позицию C2' сахара или аналогичную позицию в циклических или ациклических заместителях сахара. Катионные группы могут включать, например, протонированные аминогруппы, полученные, например, из O-АМИНА (АМИН = NH_2 ; алкиламино, диалкиламино, гетероцикл, ариламино, диариламино, гетероариламино, или дигетероариламино, этилендиамин, полиамино); аминоалкокси, например, $\text{O}(\text{CH}_2)_n$ АМИН,

20 (например, АМИН = NH_2 ; алкиламино, диалкиламино, гетероцикл, ариламино, диариламино, гетероариламино, или дигетероариламино, этилендиамин, полиамино); amino (например, NH_2 ; алкиламино, диалкиламино, гетероцикл, ариламино, диариламино, гетероариламино, или дигетероариламино, или аминокислота); или $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_n\text{CH}_2\text{CH}_2$ -АМИН (АМИН = NH_2 алкиламино, диалкиламино, гетероцикл, ариламино, диариламино,

25 гетероариламино, или дигетероариламино).

Размещение в олигонуклеотиде

Некоторые модификации могут быть предпочтительно включены в олигонуклеотидах в определенном месте, например, на внутреннем месторасположении цепочки, или по 5' или 3'

30 концу олигонуклеотида. Предпочтительное расположение модификации в олигонуклеотидах, может предоставлять предпочтительные свойства агенту. Например, предпочтительные

локализации отдельных модификаций могут предоставлять оптимальные свойства сайленсинга генов, или повышенную устойчивость к эндонуклеазной или экзонуклеазной активности.

Один или несколько нуклеотидов олигонуклеотида, могут иметь, 2'-5' связь. Один или несколько нуклеотидов олигонуклеотида, могут иметь обратные (инвертированные) связи, например, 3'-3', 5'-5', 2'-2' или 2'-3' связи.

Двухцепочечный олигонуклеотид может включать, по меньшей мере один 5'-уридин-аденин-3' (5'-УА-3' динуклеотид), где уридин является 2'-модифицированным нуклеотидом, или терминальный 5'-уридин-гуанин-3' (5'-УГ-3') динуклеотид, где 5'-уридин является 2'-модифицированным нуклеотидом, или терминальный 5'-цитидин-аденин-3' (5'-ЦА-3' динуклеотид), где 5'-цитидин является 2'-модифицированным нуклеотидом, или терминальный 5'-уридин-уридин-3' (5'-УУ-3') динуклеотид, где 5'-уридин является 2'-модифицированным нуклеотидом, или терминальный 5'-цитидин-цитидин-3' (5'-ЦЦ-3') динуклеотид, где 5'-цитидин является 2'-модифицированным нуклеотидом, или терминальный 5'-цитидин-уридин-3' (5'-ЦУ-3') динуклеотид, где 5'-цитидин является 2'-модифицированным нуклеотидом, или терминальный 5'-уридин-цитидин-3' (5'-УЦ-3') динуклеотид, в котором 5'-уридин является 2'-модифицированным нуклеотидом. Двухцепочечные олигонуклеотиды, в том числе с этими модификациями особенно стабильны против активности эндонуклеазы.

Общий список источников

Олигорибонуклеотиды и олигорибонуклеозиды используемые в соответствии с настоящим изобретением могут быть синтезированы с помощью твердофазного синтеза, см., например работу "*Oligonucleotide synthesis, a practical approach*", Ed. M. J. Gait, IRL Press, 1984; "*Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach*", Ed. F. Eckstein, IRL Press, 1991 (см. особенно главу 1, Современные автоматизированные методы синтеза олигодезоксирибонуклеотидов; главу 2, Синтез олигорибонуклеотидов, главу 3, 2'-О-Метил-олигорибонуклеотид-5': синтез и использование, главу 4 Фосфоротиоатные олигонуклеотиды, главу 5 Синтез олигонуклеотидных фосфородитиоатов, главу 6, синтез олиго-2'-дезоксирибонуклеозид метилфосфонатов, и главу 7, Олигодезоксинуклеотиды, содержащие модифицированные основания). Другие особенно пригодные синтетические

процедуры, реагенты, блокирующие группы и условия реакции, описанные в работе Martin, P., *Helv. Chim. Acta*, **1995**, 78, 486-504; Beaucage, S. L. и Iyer, R. P., *Tetrahedron*, **1992**, 48, 2223-2311 and Beaucage, S. L. and Iyer, R. P., *Tetrahedron*, **1993**, 49, 6123-6194, или ссылках, упомянутых здесь. Модификация, описанная в WO 00/44895, WO01/75164, или WO02/44321
 5 может быть использована здесь. Раскрытие всех публикаций, патентов и опубликованных патентных заявок, перечисленных здесь, включено здесь в качестве ссылки.

Список источников, относящихся к фосфатной группе

Приготовление фосфинатных олигорибонуклеотидов описано в патенте США No
 10 5508270. Приготовление алкил фосфонатных олигорибонуклеотидов описано в патенте США No 4469863. Приготовление фосфорамидитных олигорибонуклеотидов описано в патенте США No 5256775 или патенте США No 5366878. Приготовление фосфотриэфирных олигорибонуклеотидов описано в патенте США No 5023243. Приготовление боранофосфатных олигорибонуклеотидов описано в патенте США под номерами 5130302 и
 15 5177198. Приготовление 3'-дезоксиг-3'-амино фосфорамидатных олигорибонуклеотидов описано в патенте США No 5476925. 3'-дезоксиг-3'-метиленфосфонатные олигорибонуклеотиды описаны в работе An, H, *et al. J. Org. Chem.* **2001**, 66, 2789-2801. Приготовление нуклеотидов с серным мостиком описывается в работе Sproat *et al. Nucleosides Nucleotides* **1988**, 7,651 и Crosstick *et al. Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 4693.

20

Список источников, относящихся к группе сахара

Изменения в 2' модификациях можно найти в работе Verma, S. *et al. Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 99-134 и всех ссылках этой работы. Специфические модификации в рибозе могут быть найдены в следующих источниках: 2'-фторо (Kawasaki *et. al., J. Med. Chem.*, **1993**,
 25 36, 831-841), 2'-МОЭ (Martin, P. *Helv. Chim. Acta* **1996**, 79, 1930-1938), "LNA" (Wengel, J. *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 301-310).

Список источников, относящихся к замещению фосфатной группы

Метиленметилямино связанные олигорибонуклеозиды, идентифицированные здесь
 30 как ММИ связанные олигорибонуклеозиды, метилендиметилгидразо связанные олигорибонуклеозиды, идентифицированные в здесь как ММГ связанные

олигорибонуклеозиды, и метиленкарбомиламино связанные олигорибонуклеозиды, также идентифицированные здесь как, как амид-3 связанные олигорибонуклеозиды, и метиленаминокарбонил связанные олигорибонуклеозиды, также идентифицированные здесь как, как амид-4 связанные олигорибонуклеозиды, также как и смешанные скелетные соединения, имеющие, например, перемежающиеся ММИ РО или PS связи могут быть получены как это описано в патентах США под номерами 5378825 пп, 5386023, 5489677 и в опубликованных заявках по процедуре РСТ РСТ/US92/04294 и РСТ/US92/04305 (опубликованные как WO 92/20822 и WO 92/20823, соответственно). Формацитал и тиоформацитал связанные олигорибонуклеозиды могут быть получены как это описано в патентах США под номерами. 5264562 и 5264564. Этиленоксид связанные олигорибонуклеозиды могут быть получены как это описано в патенте США No. 5223618. Силоксановые замещения описаны в работе Cormier, J.F. *et al. Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 4583. Карбонатные замещения описаны в работе Tittensor, J.R. *J. Chem. Soc. C* **1971**, 1933. Карбоксиметильные замещения описаны в работе Edge, M.D. *et al. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1972**, 1991 Карбаматные замещения описаны в работе Stirchak, E.P. *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 6129.

Список источников, относящихся к замещению фосфат-рибозного скелета

Циклобутильные соединения заменителей сахара могут быть получены как это описано в патенте США No 5359044. Пирролидиновый суррогат сахара может быть получен как это описано в патенте США No 5519134. Морфолиновые суррогаты сахара могут быть получены как это описано в патентах США NoNo5142047 и 5235033 а также других соответствующих раскрытиях патента. Пептидонуклеиновые кислоты (ПНК) известны сами по себе и могут быть получены в соответствии с любой из различных процедур, относящихся к пептидонуклеиновым кислотам (ПНК): синтез, свойства и возможности применения, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1996, *4*, 5-23. Они также могут быть получены в соответствии с патентом США No 5539083.

Список источников, относящихся к терминальной модификации

Терминальные модификации описаны в работе Manoharan, M. *et al. Antisense and Nucleic Acid Drug Development* *12*, 103-128 (2002) и в ссылках этой работы.

Список источников, относящихся к нуклеотидным основаниям

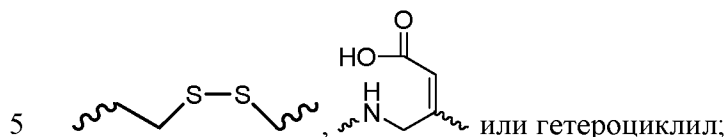
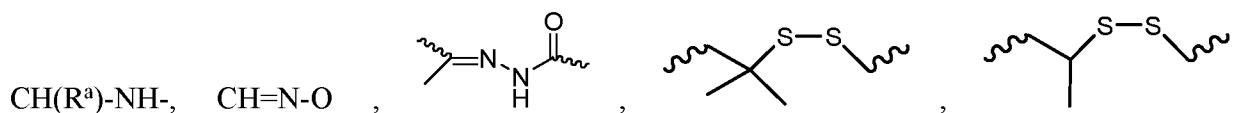
N-2 замещенные пуриновые нуклеозидные амидиты могут быть получены как это описано в патенте США No 5459255. 3-деза пуриновые нуклеозидные амидиты могут быть
 5 получены как это описано в патенте США No 5457191. 5,6-замещенные пиримидиновые нуклеозидные амидиты могут быть получены как это описано в патенте США No 5614617. 5-пропинил пиримидиновые нуклеозидные амидиты могут быть получены, как это описано в патенте США No 5484908.

10 Линкеры

Термин "линкер" означает органическую частицу, которая связывает две части соединения. Линкеры обычно содержат прямую связь или атом, такой как кислород или сера, элемент, такой как NR^1 , $C(O)$, $C(O)H$, SO , SO_2 , SO_2NH или цепочку атомов, таких как замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкенил,
 15 замещенный или незамещенный алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклилалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкениларилалкил, алкениларилалкенил, алкениларилалкинил, алкинилалкил, алкинилалкенил, алкинилалкинил,
 20 алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкенилгетероарилалкил, алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил,
 25 алкенилгетероциклилалкинил, алкинилгетероциклилалкил, алкинилгетероциклилалкенил, алкинилгетероциклилалкинил, алкиларил, алкениларил, алкиниларил, алкилгетероарил, алкенилгетероарил, алкинилгетероарил, где один или несколько метиленов могут быть прерваны или ограничены O, S, $S(O)$, SO_2 , $N(R^1)_2$, $C(O)$, расщепляемой связывающей группой, замещенным или незамещенным арилом, замещенным или незамещенным
 30 гетероарилом, замещенным или незамещенным гетероциклическим соединением; где R^1 представляет собой водород, ацил, алифатическое или замещенное алифатические соединения.

В одном варианте линкер является $-(P-Q-R)_q-X-(P'-Q'-R')_{q'}]_{q''}-T-$, где:

P, R, T, P', R' и T, являются каждый самостоятельно для каждого проявления отсутствующий, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH, CH₂O; NHCH(R^a)C(O), -C(O)-



Q и Q' являются каждый самостоятельно для каждого проявления отсутствующий, - (CH₂)_n-, -C(R¹)(R²)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nC(R¹)(R²)-, -(CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂-, or - (CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂NH-;

X является отсутствующим или расщепляемой связывающей группой;

10 R^a является H или боковой цепью аминокислоты;

R¹ и R² являются каждый самостоятельно для каждого проявления H, CH₃, OH, SH или N(R^N)₂;

R^N является самостоятельно для каждого проявления H, метил, этил, пропил, изопропил, бутил или бензил;

15 q, q' и q'' каждый самостоятельно для каждого проявления равняются 0-20 и где повторяющийся элемент может быть одинаковым или отличным.

n самостоятельно для каждого проявления равняется 1-20; и

m самостоятельно для каждого проявления равняется 0-50.

20 В одном варианте, линкер содержит по меньшей мере одну расщепляемую связывающую группу.

В некоторых вариантах, линкер является разветвленным линкером. Точка ветвления разветвленного линкера может быть по меньшей мере трехвалентным, но может быть четырехвалентным, пяти-или шестивалентным атомом или группой, представляющей валентности, кратные названным. В некоторых вариантах точка ответвления представляет собой -N, -N(Q)-C, -O-C, -S-C, -SS-C, -C(O)N(Q)-C, -OC(O)N(Q)-C, -N(Q)C(O)-C, или - N(Q)C(O)O-C; где Q является самостоятельно для каждого проявления H или факультативно замещенным алкилом. В другом варианте, точка ветвления является глицеролом или производным глицерола.

Расщепляемые связывающие группы

Расщепляемая связывающая группа — это та, которая является достаточно стабильной вне клетки, но после вхождения в клетки-мишени расщепляется, чтобы высвободить две
 5 части, которые линкер держит вместе. В предпочтительном варианте расщепляемая связывающая группа расщепляется как минимум в 10 раз быстрее или более, предпочтительно по меньшей мере в 100 раз быстрее в клетке-мишени или при первом обусловленном состоянии (которое может, например, быть выбрано, чтобы имитировать или
 10 представить внутриклеточную среду), чем в крови субъекта, или при втором обусловленном состоянии (которое может, например, быть выбрано, чтобы имитировать или представить условия, обнаруживаемые в крови или сыворотке). Расщепляемые связывающие группы чувствительны к расщепляющим факторам, например, pH, окислительно-восстановительному потенциалу и наличию деградационных молекул. Как правило, расщепляющие факторы более распространены или обнаруживаются на более высоких уровнях или активности внутри
 15 клеток, чем в сыворотке или крови. Примеры таких деградационных факторов включают: окислительно-восстановительные факторы, которые отобраны для определенных субстратов или которые не имеют субстратной специфичности, в том числе, например, окислительные или восстановительные ферменты или редукирующие средства, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут привести к уменьшению редокс расщепляемой
 20 связывающей группы путем восстановления; эстеразы; эндосомы или вещества, которые могут создать кислую среду, например, те, которые приводят к уровню pH, равному пяти или меньше; ферменты, которые могут гидролизовать или разлагать кислото-расщепляемую связывающую группу, выступая в качестве обычной кислоты, пептидазы (которые могут быть субстрат специфичными), и фосфатазы.

25 Расщепляемая связывающая группа, такая как дисульфидная связь, может быть чувствительной к pH. pH сыворотки крови человека составляет 7,4, в то время как средняя внутриклеточная pH несколько ниже, находится в пределах примерно 7,1–7,3. Эндосомы имеют более кислую pH в диапазоне 5,5–6,0, и лизосомы имеют еще более кислую pH около 5,0. Некоторые линкеры будут иметь расщепляемую связывающую группу, которая
 30 расщепляется при предпочтительном значении pH, тем самым высвобождая катионный липид из лиганда внутри клетки, или в желаемый отсек клетки.

Линкер может включать расщепляемую связывающую группу, которая расщепляется конкретным ферментом. Тип расщепляемой связывающей группы встроенной в линкер может зависеть от клетки, являющейся целевой. Например, таргетинговые (нацеливающие) лиганды печени могут быть соединены с катионными липидами через линкер, который включает эфирную группу. Клетки печени богаты эстеразами, и поэтому линкер будет расщеплен в клетках печени более эффективно, чем в типах клеток, которые не являются богатыми эстеразой. Другие типы клеток, богатые эстеразами, включают клетки легких, коркового вещества почек, и яичка.

Линкеры, содержащие пептидные связи могут быть использованы когда целевые типы клеток богаты пептидазами, как клетки печени и синовиоциты.

В общем, пригодность кандидатуры расщепляемой связывающей группы может быть оценена тестированием способности деградационного агента (или состояния) расщеплять кандидатуру связывающей группы. Также будет желательно проверить кандидатуру расщепляемой связывающей группы и на способность противостоять расщеплению в крови или при контакте с другими нецелевыми тканями. Таким образом, можно определить относительную восприимчивость к расщеплению между первым и вторым обусловленным состоянием, где первое выбрано в качестве ориентировочного для расщепления в клетке-мишени, а второе выбрано в качестве ориентировочного для расщепления в других тканях или биологических жидкостях, например, в крови или сыворотке. Оценка может быть осуществлена в бесклеточных системах, в клетках, в клеточной культуре, в культуре органа или ткани, или в целом организме животных. Может быть полезно провести начальную оценку в бесклеточных условиях или в культуральных условиях и подтвердить дальнейшими оценками в организме животных. В предпочтительных вариантах, пригодные соединения-кандидаты расщеплялись по крайней мере в 2, 4, 10 или 100 раз быстрее в клетке (или *in vitro* в условиях, подобранных для имитации внутриклеточной среды) по сравнению с кровью или сывороткой (или *in vitro* в условиях, подобранных для имитации внеклеточной среды).

Редокс расщепляемые связывающие группы

Одним классом расщепляемых связывающих групп являются редокс расщепляемые связывающие группы, которые расщепляются при восстановлении или окислении. Примером восстановительно расщепляемой связывающей группы является дисульфидная связывающая группа (-S-S-). Чтобы определить, является ли кандидатура расщепляемой связывающей

группы подходящей "восстановительно расщепляемой связывающей группой", или, например, подходящей для использования с определенным иРНК фрагментом и определенным целевым агентом, можно посмотреть на способы, описанные в настоящем документе. Например, кандидат может быть оценен путем инкубации с дитиотрептолом (ДТТ), или другим восстановителем с использованием реагентов, известных в технике, которые имитируют уровень расщепления, который будет наблюдаться в клетке, например, клетке-мишени. Кандидаты могут также быть оценены в условиях, которые подобраны для имитации условий крови или сыворотки. В предпочтительном варианте, соединения-кандидаты расщеплялись не более чем на 10% в крови. В предпочтительных вариантах, пригодные соединения-кандидаты расщеплялись по крайней мере в 2, 4, 10 или 100 раз быстрее в клетке (или *in vitro* в условиях, подобранных для имитации внутриклеточной среды) по сравнению с кровью или сывороткой (или *in vitro* в условиях, подобранных для имитации внеклеточной среды). Скорость расщепления соединений-кандидатов может быть определена с использованием стандартных кинетических анализов ферментативных реакций в условиях подобранных для имитации внутриклеточной среды по сравнению с условиями, подобранными для имитации внеклеточной среды.

Расщепляемые связывающие группы на основе фосфата

Расщепляемые связывающие группы на основе фосфата расщепляются средствами, которые разлагают или гидролизуют фосфатную группу. Примером средства, которое расщепляет фосфатные группы в клетках являются ферменты, такие как фосфатазы в клетках. Примерами расщепляемых связывающих групп на основе фосфата являются -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-S-, -O-P(S)(Rk)-S-. Предпочтительными вариантами являются: -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S-, -O-P(S)(H)-S-. Предпочтительным вариантом является -O-P(O)(OH)-O-. Эти кандидаты могут быть оценены с использованием способов, аналогичных описанным выше.

Кислото-расщепляемые связывающие группы

Кислото-расщепляемые связывающие группы — это связывающие группы, которые расщепляются в кислой среде. В предпочтительных вариантах, кислото-расщепляемые связывающие группы расщепляются в кислой среде с уровнем pH равным приблизительно 6,5 или ниже (например, около 6,0, 5,5, 5,0, или ниже), или средствами, такими как ферменты, которые могут вести себя как обычная кислота. В клетке, особые органеллы с низким уровнем pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечить условия для расщепления кислото- расщепляемых связывающих групп. Примеры кислото- расщепляемых связывающих групп включают, не ограничиваясь гидразоны, эфиры и эфиры аминокислот. Кислото-расщепляемые связывающие группы могут иметь общую формулу $-C=NN-$, $C(O)O-$, или $-OC(O)-$. Предпочтительным вариантом является такой, когда углерод прикреплен к кислороду эфира (алкокси группа), арил группа, замещенная алкил группа, или третичная алкил группа, такая как диметил пентил или трет-бутил. Эти кандидаты могут быть оценены с использованием способов, аналогичных описанным выше.

15 Расщепляемые связывающие группы на основе эфира

Расщепляемые связывающие группы на основе эфира расщепляются в клетках ферментами, такими как эстеразы или амидазы. Примеры расщепляемых связывающих групп на основе эфира включают, не ограничиваясь эфиры групп алкилена, алкенилена и алкинилена. Расщепляемые связывающие группы на основе эфира имеют общую формулу $C(O)O-$, или $-OC(O)-$. Эти кандидаты могут быть оценены с использованием способов, аналогичных описанным выше.

Расщепляемые связывающие группы на основе пептидов

Расщепляемые связывающие группы на основе пептидов расщепляются в клетках ферментами, такими как пептидазы и протеазы. Расщепляемые связывающие группы на основе пептидов являются пептидными связями, образованными между аминокислотами образующими олигопептиды (например, дипептиды, трипептиды и т.д.) и полипептиды. Расщепляемые связывающие группы на основе пептидов не включают амидную группу ($-C(O)NH-$). Амидная группа может быть сформирована между любым алкиленом, алкениленом или алкиниленом. Пептидная связь является особым видом амидной связи образованной между аминокислотами для получения пептидов и белков. Расщепляемые

связывающие группы на основе пептидов, как правило, ограничиваются пептидной связью (т. е. амидной связью), сформированной между аминокислотами, образующими пептиды и белки, и не включают в себя всю амидную функциональную группу. Расщепляемые связывающие группы на основе пептидов имеют общую формулу

5 $\text{NHCHR}^{\text{A}}\text{C}(\text{O})\text{NHCHR}^{\text{B}}\text{C}(\text{O})-$, где R^{A} и R^{B} являются R группами двух смежных аминокислот. Эти кандидаты могут быть оценены с использованием способов, аналогичных описанным выше.

Лиганды

10 С олигонуклеотидами и липидами согласно настоящему изобретению может быть связано большое разнообразие объектов. Предпочтительными фрагментами являются лиганды, которые связаны, желательно ковалентно, либо непосредственно, либо косвенно через промежуточный трос.

В предпочтительных вариантах, лиганд изменяет распределение, нацеливание или

15 продолжительность жизни молекулы, в которую он встроен. В предпочтительных вариантах лиганд обеспечивает увеличение сродства к выбранной цели, например, молекуле, клетке или типу клетки, отделу, например, отделу клетки или органа, ткани, органу или области тела, как, например, по сравнению с видами у которых лиганды отсутствуют. Лиганды, обеспечивающие увеличенное сродство к выбранной цели, еще называют таргетинг

20 (нацеливающими) лигандами.

Некоторые лиганды могут обладать эндосомолитическими свойствами. Эндосомолитические лиганды способствуют лизису эндосомы и/или транспортировке композиции изобретения, или его компонентов из эндосомы в цитоплазму клетки. Эндосомолитический лиганд может быть полианионным пептидом или пептидомиметиком,

25 который демонстрирует pH-зависимую мембранную активность и фузогенность. В некоторых вариантах, эндосомолитический лиганд обретает свою активную конформацию при эндосомальной pH. "Активная" конформация, это такая конформация, в которой эндосомолитический лиганд способствует лизису эндосомы и/или транспортировке композиции изобретения или его компонентов из эндосомы в цитоплазму клетки. Типичные

30 эндосомолитические лиганды включают GALA пептид (Subbarao et al., Biochemistry, 1987, 26: 2964-2972), EALA пептид (Vogel et al., J. Am. Chem. Soc., 1996, 118: 1581-1586), и их

производные (Turk et al., Biochem. Biophys. Acta, 2002, 1559: 56-68). В некоторых вариантах, эндосомолитический компонент может содержать химическую группу (например, аминокислоту), которая в ответ на изменение уровня pH, будет проходить замену заряда или протонирование. Эндосомолитический компонент может быть прямолинейным или разветвленным. Типичные первичные последовательности эндосомолитических лигандов на основе пептидов приведены в таблице 4.

Таблица 4: Перечень пептидов с эндосомолитической активностью

Название	Последовательность (отN до C)	Ссылка.
GALA	AALEALAEALAEALAEALAEAAAAGGC	1
EALA	AALAEALAEALAEALAEALAEALAAAAGGC	2
	ALEALAEALAEALAEA	3
INF-7	GLFEAIEGFIENGWEGMIWDYG	4
Inf HA-2	GLFGAIAFGFIENGWEGMIDGWYG	5
diINF-7	GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGWYGC GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGWYGC	5
diINF3	GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGGC GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGGC	6
GLF	GLFGALAEALAEALAEHLAEALAEALAEALAAGGSC	6
GALA-INF3	GLFEAIEGFIENGWEGLAELAEALAEALAEALAAGGSC	6
INF-5	GLF EAI EGFI ENGW EGnI DG K GLF EAI EGFI ENGW EGnI DG	4

n, норлейцин

Ссылки

1. Subbarao et al., Biochemistry, 1987, 26: 2964-2972.
2. Vogel et al., J. Am. Chem. Soc., 1996, 118: 1581-1586
3. Turk, M. J., Reddy, J. A. et al. (2002). Characterization of a novel pH-sensitive peptide that enhances drug release from folate-targeted liposomes at endosomal pHs. *Biochim. Biophys. Acta* 1559, 56-68.
4. Plank, C. Oberhauser, B. Mechtler, K. Koch, C. Wagner, E. (1994). The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems, *J. Biol. Chem.* 269 12918–12924.

5. Mastrobattista, E., Koning, G. A. et al. (2002). Functional characterization of an endosome-disruptive peptide and its application in cytosolic delivery of immunoliposome-entrapped proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 27135-43.

6. Oberhauser, B., Plank, C. et al. (1995). Enhancing endosomal exit of nucleic acids using pH-sensitive viral fusion peptides. *Deliv. Strategies Antisense Oligonucleotide Ther.* 247-66.

5

Предпочтительные лиганды могут улучшать транспорт, гибридизацию и специфичные свойства, а также могут улучшить устойчивость к нуклеазе, образующихся в результате естественных или модифицированных олигорибонуклеотидов, или полимерных молекул, содержащих любую комбинацию мономеров, описанную в данном документе и/или естественных или модифицированных рибонуклеотидов.

Лиганды, обычно, могут включать терапевтические модификаторы, например, для повышения поглощения; диагностические соединения или репортер-группы, например, для мониторинга распределения; сшивающие агенты и фрагменты, предоставляющие нуклеазоустойчивость. Характерные примеры включают липиды, стероиды, витамины, сахара, белки, пептиды, полиамины и имитаторы пептида.

Лиганды могут включать вещества естественного происхождения, такие, как белок (например, человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), липопротейн низкой плотности (ЛПНП), липопротейн высокой плотности (ЛПВП), или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновая кислота); или липид. Лиганд может также быть рекомбинантной или синтетической молекулой, такой как синтетический полимер, например, синтетическая полиаминокислота, олигонуклеотид (например аптамер). Примеры полиаминокислот включают полиамино кислоту — полилизин (ПЛЛ), поли L-аспарагиновую кислоту, поли L-глутаминовую кислоту, сополимер стирола и малеинового ангидрида, сополимер поли (L-лактида-со-гликолида), сополимер дивинилэфира и малеинового ангидрида, сополимер N-(2-гидроксипропил)метакриламида (ГМПА), полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливиниловый спирт (ПВС), полиуретан, поли (2-этилакрилловую кислоту), N-изопропилакриламидные полимеры, или полифосфазин. Примеры полиаминов включают: полиэтиленимин, полилизин (ПЛЛ), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, полиамин пептидомиметик, дендример полиамин, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирина, четвертичную соль полиамина, или альфа-спиральный пептид.

Лиганды могут также включать нацеливающие группы, например, агент, нацеливающий на клетку или ткань, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается с заданным типом клеток, такими как клетки почек. Нацеливающей группой может быть тиреотропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, по

5 поверхностный белок А, углеводы муцина, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетил-галактозамин, N-ацетил-глюкозамин поливалентная манноза, поливалентная фукоза, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентная галактоза, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчная кислота, фолиевая кислота, витамин В₁₂, биотин, РГД пептид, РГД пептидомиметик или аптамер. В

10 таблице 5 представлены некоторые примеры нацеливающих лигандов и связанных с ними рецепторов.

Таблица 5: Нацеливающие лиганды и связанные с ними рецепторы

Клетки печени	Лиганд	Рецептор
1) Паренхимальные клетки (ПК) (Гепатоциты)	Галактоза	АЗГП-Р (азиологликопротеиновый рецептор)
	Gal NAc (n-ацетил-галактозамин)	АЗПГ-Р Gal NAc Рецептор
	Лактоза	
	Азиалофетуин	АЗПГ-р
2) Синусоидальные эндотелиальные клетки (СЭК)	Гиалуроновая кислота	рецептор гиалуроновой кислоты
	Проколлаген	проколлагеновый рецептор
	Отрицательно заряженные молекулы	фагоцитарные рецепторы
	Манноза	маннозный рецептор
	N-ацетил Глюкозамин	фагоцитарные рецепторы
	Иммуноглобулины	Fc Рецептор
	ЛПС	CD14 Рецептор
	Инсулин	Рецептор посредник транскитоza
	Трансферрин	Рецептор посредник транскитоza
	Альбумины	Неспецифический
	Сахаро-альбуминовые конъюгаты	
	Манноза-6-фосфат	манноза-6-фосфатрецептор
3) Клетки Купфера (КК)	Манноза	маннозные рецепторы
	Фукоза	фукозные рецепторы

	Альбумины	Неспецифический
	Маннозо-альбуминовые конъюгаты	

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие агенты (например, акридины), кросс-линкеры (например псорален, митомицин С), порфирины (TRPC4, тексафирин, Сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, ЭДТА), липофильные молекулы, например, холестерин, желчная кислота, адамантан уксусная кислота, 1-пирен масляная кислота, дигидротестостерон, 1,3-бис-О (гексадецил)глицерин, группу геранилоксигексила, гексадецилглицерол, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, группу гептадецила, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, ОЗ-(олеоил)листохоловую кислоту, ОЗ-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил, или феноксазин и пептидные конъюгаты (например, пептид антеннапедии, Тат пептид), алкилирующие агенты, фосфат, аминок, меркапто, ПЭГ (например, ПЭГ-40К), МПЭГ, [МПЭГ]₂, полиамино, алкил, замещенный алкил, меченые маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), посредники транспорта/поглощения (например, аспирин, витамин Е, фолиевая кислота), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазол кластеры, акридин-имидазол конъюгаты, Eu3 + комплексы тетраазамакроцикло), динитрофенил, *HRP*, или *AP*.

Лиганды могут быть белками, например, гликопротеинами, или пептидами, например, молекулами, имеющими специфическое сродство к ко-лиганду, или антителами, например, антителами, которые связываются с заданным типом клеток, таким как раковая клетка, эндотелиальная клетка, или костная клетка. Лиганды могут также включать гормоны и гормональные рецепторы. Они могут также включать непептидные разновидности, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетил-галактозамин, N-ацетил-глюкозамин поливалентной маннозы, поливалентная фукоза, или аптамеры. Лиганд может быть, например, липополисахаридом, активатором p38 MAP киназ, или активатором NF- κB.

Лиганд может быть веществом, например, лекарственным средством, которое может увеличить поглощение иРНК агента в клетке, например, путем разрушения цитоскелета клетки, например, разрушая микротрубочки клетки, микрофиламенты, и/или промежуточные филаменты. Лекарственное средство может быть, например, таксоном, винкристином,

винбластином, цитохалазином, нокодазолом, джаплакинолидом, латрункулином А, фаллоидином, свинхолидом А, инданосином, или миосервином.

Лиганд может увеличить поглощение иРНК агента в клетку путем активации воспалительной реакции, например. Типичные лиганды, которые могут обладать таким
5 действием включают фактор некроза опухоли альфа (TNFalpha), интерлейкин-1 бета- или гамма-интерферон.

В одном аспекте, лиганд является липидом или молекулой на основе липида. Такой липид или молекула на основе липида преимущественно связывает сывороточный белок, например, человеческий сывороточный альбумин (ЧСА). ЧСА-связывающий лиганд
10 допускает распределение конъюгата в ткани-мишени, например, непочечные ткани-мишени организма. Например, тканью-мишенью может быть печень, включая паренхиматозные клетки печени. Другие молекулы, которые могут связывать ЧСА, также могут быть использованы в качестве лигандов. Например, может быть использован непростин или аспирин. Липид или лиганд на основе липида может (а) повышать устойчивость к деградации
15 конъюгата, (б) увеличивать нацеливание или транспорт в клетку-мишень или клеточную мембрану, и/или (с) может быть использован для регулирования связывания с сывороточным белком, например, ЧСА.

Лиганд, основанный на липиде, может быть использован для модуляции, например, для контроля связывания конъюгата к ткани-мишени. Например, липид и лиганд, основанный
20 на липиде, которые связываются с ЧСА сильнее, с меньшей вероятностью будут направлены на почки и, следовательно, менее вероятно, будут выводиться из организма. Липид и лиганд, основанный на липиде, которые связываются с ЧСА менее сильно, могут быть использованы для нацеливания конъюгата в почки.

В предпочтительном варианте, лиганд, основанный на липиде, связывает ЧСА. Предпочтительно, он связывает ЧСА с достаточной афинностью, так что конъюгат будет
25 преимущественно распределен в непочечные ткани. Однако, является предпочтительным, чтобы сродство не было настолько сильным, что ЧСП-лиганд связывание могло быть необратимым.

В другом предпочтительном варианте, лиганд, основанный на липиде, связывает ЧСА
30 слабо или совсем не связывает, таким образом, что конъюгат будет преимущественно

распределен в почки. Другие фрагменты, нацеленные к клеткам почек, могут также использоваться вместо или в дополнение к лиганду, основанному на липиде.

В другом аспекте, лиганд является частью, например, витамином, который захватывается клеткой-мишенью, например, пролиферирующей клеткой. Такие лиганды особенно пригодны для лечения нарушений, которые характеризуется нежелательной пролиферацией клеток, например, злокачественного или доброкачественного типа, например, раковых клеток. Типичные витамины включают витамин А, Е и К. Другие примеры витаминов включают — витамины группы В, например, фолиевую кислоту, В₁₂, рибофлавин, биотин, пиридоксаль или другие витамины или питательные вещества, захватываемые раковыми клетками. Также включены НАS, липопотеины низкой плотности (ЛПНП) и липопотеины высокой плотности (ЛПВП).

В другом аспекте, лиганд является агентом проникновения в клетку, предпочтительно винтовым агентом проникновения в клетку. Предпочтительно, агент является амфипатическим. Типичный агент — пептид, такой, как *тат* или *антеннопедия*. Если агент является пептидом, он может быть модифицирован, включая пептидилмиметик, инвертомеры, непептидные или псевдо-пептидные связи, а также использование D-аминокислот. Винтовой агент является предпочтительно альфа-спиральным агентом, который имеет предпочтительно липофильную и липофобную фазы.

Лиганд может быть пептидом или пептидомиметиком. Пептидомиметик (также называется здесь олигопептидомиметик) — это молекула, способная складываться в определенную трехмерную структуру, сходную с природным пептидом. Фрагмент пептида или пептидомиметика может быть длиной около 5-50 аминокислот, например, около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, или 50 аминокислот в длину (см. таблицу 6, например).

Таблица 6. Типичные пептиды, проникающие в клетку.

проникающие в клетку пептиды	Аминокислотная последовательность	Ссылка
Пенетратин	RQIKIWFQNRRMKWKK	Derossi <i>et al.</i> , J. Biol. Chem. 269:10444, 1994
Тат фрагмент (48-60)	GRKKRRQRRPPQC	Vives <i>et al.</i> , J. Biol. Chem., 272:16010, 1997
Пептид, основанный на	GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKR KV	Chaloin <i>et al.</i> , Biochem. Biophys. Res. Commun.,

сигнальной последовательности		243:601, 1998
PVEC	LLILRRRIRKQAHANSK	Elmqvist <i>et al.</i> , Exp. Cell Res., 269:237, 2001
Транспортан	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL	Pooga <i>et al.</i> , FASEB J., 12:67, 1998
Амфифильная модель пептида	KLALKLALKALKAAALKLA	Oehlke <i>et al.</i> , Mol. Ther., 2:339, 2000
Arg ₉	RRRRRRRRR	Mitchell <i>et al.</i> , J. Pept. Res., 56:318, 2000
Бактериальное проникновение клеточной стенки	KFFKFFKFFK	
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES	
Цекропин P1	SWLSKTAKKLENSAKKRISSEGIAIAIQG GPR	
α -дефенсин	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC	
β -дефенсин	DHYNVCVSSGGQCLYSACPIFTKIQTGTCYRGKAKCCK	
Бактенецин	RKCRIVVIRVCR	
PR-39	RRRPRPPYLPRPRPPPPFPRLPPRIPPGFPPRFPPRFPGKR-NH ₂	
Индолицидин	ILPWKWPWWPWRR-NH ₂	

Пептид или пептидомиметик может быть, например, проникающим в клетку пептидом, катионным пептидом, амфипатическим пептидом, или гидрофобным пептидом (например, состоящий в основном из тирозина (Tyr), триптофана (Trp) или фенилаланина (Phe)).

- 5 Пептидная частица может представлять собой пептид дендример, ограниченный пептид или сшитый пептид. В другом варианте, пептидный фрагмент может включать гидрофобную последовательность мембранной транслокации (МТП). Типичный гидрофобный МТП-содержащий пептид — это RFGF, имеющий аминокислотную последовательность AAVALLPAVLLALLAP. Аналог RFGF (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP), содержащий гидрофобную МТП, также может быть нацеливающей
- 10 частицей. Пептидная частица может быть "доставочным" пептидом, который может переносить через клеточные мембраны большие полярные молекулы, включая пептиды, олигонуклеотиды, и белок. Например, была обнаружена способность к функционированию в качестве доставки пептидов, последовательности TAT белка ВИЧ (GRKKRRQRRRPPQ) и
- 15 белка дрозофилы Антеннапедия (RQIKIWFQNRRMKWKK). Пептид или пептидомиметик

могут быть закодированы случайной последовательностью ДНК, такой как пептид, идентифицированный из фаг-дисплей библиотеки, или комбинаторной библиотеки «одна-бусина-одно-соединение» (ОБОС) (Lam et al., Nature, 354:82-84, 1991). Предпочтительно, если пептид или пептидомиметик, привязанный к иРНК агенту через встроенный мономерный элемент ячейки, является нацеливающим клеточным пептидом, таким как пептид аргинин-глицин-аспарагиновой кислоты (РГД), или имитирующий РГД. Пептидный фрагмент может варьироваться в длину от 5 аминокислот до приблизительно 40 аминокислот. Пептидные фрагменты могут иметь структурные модификации для повышения стабильности или прямых конформационных свойств. Любая из структурных модификаций, описанных ниже, может быть использована.

Фрагмент РГД пептида может быть использован для опухолевой клетки-мишени, такой как эндотелиальная клетка опухоли или клетка опухоли рака молочной железы (Zitzmann et al., Cancer Res., 62:5139-43, 2002). РГД пептид может способствовать таргетингу иРНК к опухолям ряда других тканей, в том числе легких, почек, селезенки и печени (Aoki et al., Cancer Gene Therapy 8:783-787, 2001). Предпочтительно, когда РГД пептид будет способствовать таргетингу иРНК агента к почкам. РГД пептид может быть линейным или циклическим, и может быть модифицированным, например, гликозилированным или метилированным для облегчения нацеливания на специфические ткани. Например, гликозилированный РГД пептид может доставить иРНК агент в опухолевую клетку экспрессирующую $\alpha v \beta_3$ (Haubner et al., Jour. Nucl. Med., 42:326-336, 2001).

Могут быть использованы пептиды, целью которых являются маркеры, наделенные пролиферирующими клетками. Например, РГД содержащие пептиды и пептидомиметики могут выбирать в качестве цели раковые клетки, в частности клетки, которые демонстрируют $\alpha v \beta_3$ интегрин. Таким образом, можно использовать РГД пептиды, циклические пептиды, содержащие РГД, РГД пептиды, которые содержат D-аминокислоты, а также и синтетические РГД имитаторы. В дополнение к РГД, можно использовать и другие фрагменты, которые нацеливают $\alpha v \beta_3$ интегрин лиганд. Как правило, такие лиганды могут быть использованы для контроля пролиферирующих клеток и ангиогенеза. Предпочтительные конъюгаты этого типа — лиганды, которые выбирают в качестве цели PECAM-1, VEGF, или другой ген рака, например, ген рака, описанный в данном документе.

"Проникающий в клетку пептид" способен проникать в клетку, например, микробную клетку, такую как бактериальная или грибковая клетка, или в клетки млекопитающих, такие как клетки человека. Микробным проникающим в клетку пептидом может быть, например, α -спиральный линейный пептид (например, LL-37 или Secorin P1), пептид, содержащий дисульфидные связи (например, α -дефенсин, β -дефенсин или бактенецин), или пептид, содержащий только одну или две доминирующие аминокислоты (например, PR-39 или индолицидин). Проникающий в клетку пептид может также включать сигнал ядерной локализации (NLS). Например, проникающий в клетку пептид может быть двудольным амфипатическим пептидом, таким как MPG, который является производным от слияния пептидного домена ВИЧ-1 gp41 и NLS из SV40 большого Т антигена (Simeoni *et al.*, Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

В одном из вариантов таргетинг пептид привязан к иРНК агенту и/или олигомер носитель может быть амфипатическим α -спиральным пептидом. Типичные амфипатические α -спиральные пептиды включают, но не ограничиваясь, цекропины, ликотоксины, парадоксины, буфорин, CPF, бомбинин-подобный пептид (БПП), кателицидины, цератотоксины, *S. clava* пептиды, кишечные антимикробные пептиды миксины (КАМПм), магаинины, бревинины-2, дермасептины, мелиттины, плевроцидин, H₂A пептиды, пептиды Хепорус, эскулентин-1, и церины. Чтобы сохранить целостность спиральной стабильности, будет желательно учесть ряд факторов. Например, будет использоваться максимальное количество стабилизирующих остатков спирали (например, лейцин, аланин, или лизин), а количество дестабилизирующих остатков спирали будет использовано минимальное (например, пролин, или циклические мономерные единицы). Будут учтены кэп остатки (например могут быть использованы глицин, являющийся типичным N-кэп остатком и/или C-концевое амидирование для обеспечения дополнительной Н-связи для стабилизации спирали).

Формирование солевых мостов между остатками с противоположными зарядами, разделенных по $i \pm 3$, или $i \pm 4$ позиции может обеспечить стабильность. Например, катионные остатки, такие как лизин, аргинин, гомо-аргинин, орнитин и гистидин могут образовывать солевые мосты с анионными остатками глутамата и аспартата.

Пептидные и пептидомиметические лиганды включают те, которые обладают естественными или модифицированными пептидами, например, D или L пептиды; α , β , или γ пептиды, N-метил пептиды; азапептиды; пептиды, имеющие один или несколько амидов, т. е.

пептид, с замененной связью одной или более связями мочевины, тиомочевины, карбамата, или сульфонил мочевины, или циклические пептиды.

Нацеливающим лигандом может быть любой лиганд, способный выбирать в качестве цели специфический рецептор. Примерами являются: фолат, *GalNAc*, галактоза, манноза, манноза-6P, кластеры сахаров, такие как *GalNAc* кластер, кластер маннозы, кластер галактозы, или апатамер. Кластер представляет собой сочетание двух или более элементов сахара. Таргетинг лиганды также включают лиганды интегрин рецепторов, лиганды хемокиновых рецепторов, трансферрин, биотин, лиганды рецептора серотонина, ПСМА, эндотелин, *GCP II*, соматостатин, лиганды ЛПНП и ЛПВП. Лиганды могут быть также на основе нуклеиновых кислот, например, аптамеров. Аптамер может быть немодифицированным или иметь любую комбинацию модификаций, описанных в данном документе.

Эндосомальные релиз-агенты включают имидазолы, поли или олигоимидазолы, ПЭИ, пептиды, фузогенные пептиды, поликарбоксилаты, поликатионы, замаскированные олиго- или поли- катионы или анионы, ацетали, полиацетали, кетали/поликетали, ортоэфиры, полимеры с замаскированными или незамаскированными катионными или анионными зарядами, дендримеры с замаскированными или незамаскированными катионными или анионными зарядами.

ФК модулятор означает фармакокинетический модулятор. ФК модулятор включает липофилы, желчную кислоту, стероиды, аналоги фосфолипидов, пептиды, вещества, связывающиеся с белками, ПЭГ, витамины и др. Типичный ФК модулятор включает, но не ограничиваясь, холестерин, жирные кислоты, желчную кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицериды, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин и др. Олигонуклеотиды, которые включают множество фосфоротиоатных связей, которые, как известно, связываются с белком сыворотки, являются короткими олигонуклеотидами, например, олигонуклеотиды, состоящие из около 5 баз, 10 баз, 15 баз или 20 баз, включающими множество из фосфоротиоатных связей в скелете, также подлежат настоящему изобретению в качестве лигандов (например, ФК модулирующие лиганды).

Кроме того, аптамеры, которые связывают компоненты сыворотки (например, белки сыворотки) также подлежат настоящему изобретению, в качестве ФК модулирующих лигандов.

Другие лиганды, подлежащие изобретению описаны в находящихся одновременно на рассмотрении заявок U S S N: 10/916185, поданной 10 августа 2004 г.; U S S N: 10/946873, поданной 21 сентября 2004 г.; U S S N: 10/833934, поданной 3 августа 2007 г.; U S S N: 11/115989, поданной 27 апреля 2005 г и U S S N: 11/944 227 поданной 21 ноября 2007 г, которые включены в качестве ссылки во всей их полноте для всех предназначений.

Если имеются в наличии два или более лигандов, все лиганды могут иметь одинаковые свойства, все могут иметь различные свойства или некоторые лиганды имеют одинаковые свойства, а другие обладают различными свойствами. Например, лиганд может иметь таргетинг свойства, иметь эндосомолитическую активность или ФК модулирующие свойства. В предпочтительном варианте, все лиганды обладают различными свойствами.

Лиганды могут быть спарены с олигонуклеотидами в различных местах, например, на 3'-конце, 5'-конце, и/или на внутренней позиции. В предпочтительных вариантах лиганда присоединяется к олигонуклеотидам через промежуточные троса. Лиганд или привязанный лиганд могут присутствовать на мономере, когда упомянутый мономер встроен в растущую цепь. В некоторых вариантах лиганд может быть встроен через соединение с "предшественником" ("прекурсором") мономера после того, как названный "предшественник" мономера был встроен в растущую цепь. Например, мономер, имеющий амино-ограниченный трос (т. е. не имеющий связанных лигандов), например, TAP-(CH₂)_nNH₂, может быть встроен в растущую смысловую или антисмысловую цепь. В последующей операции, т. е. после встраивания предшественника мономера в цепь, лиганд, имеющий электрофильную группу, например, пентафторфенильный эфир, или альдегидную группу, впоследствии может быть присоединен к предшественнику мономера через связывание электрофильной группы лиганда с терминальной нуклеофильной группой троса предшественника мономера.

Для двухцепочечных олигонуклеотидов, лиганды могут быть прикреплены к одной или обоим цепям. В некоторых вариантах, двухцепочечный иРНК агент содержит лиганд, соединенный со смысловой цепью. В других вариантах, двухцепочечный иРНК агент содержит лиганд, соединенный с антисмысловой цепью.

В некоторых вариантах, лиганды могут быть присоединены к нуклеиновым основаниям, фрагментам сахара, или межнуклеозидным связям молекул нуклеиновых кислот. Соединение с пуриновыми нуклеиновыми основаниями или их производными может

произойти в любой позиции, включая, эндоциклический и экзоциклический атомы. В некоторых вариантах, позиции 2-, 6-, 7- или 8- пуриновых нуклеиновых оснований присоединены к конъюгированному фрагменту. Соединение с пиримидиновыми нуклеиновыми основаниями или их производными, также может произойти в любой позиции.

- 5 В некоторых вариантах, позиции 2-, 5-, и 6- пиримидиновых нуклеиновых оснований могут быть замещены конъюгированным фрагментом. Соединение с фрагментами сахара нуклеозидов может произойти в любом атоме углерода. Пример атомов углерода фрагмента сахара, которые могут быть присоединены к конъюгированным фрагментам включает 2', 3' и 5' атомы углерода. 1' позиция может быть также присоединена к конъюгированному фрагменту,
- 10 такому, как абазический остаток. Межнуклеозидные связи могут также переносить конъюгированные фрагменты. Для фосфорсодержащих связей (например, фосфодиэфирных, фосфоротриатных, фосфородитриатных, фосфороамидатных, и т.п.), конъюгированный фрагмент может быть прикреплен непосредственно к атому фосфора или к O, N, S атомной связи с атомом фосфора. Для амин- или амид- содержащих межнуклеотидных связей
- 15 (например, *PNA*), конъюгированный фрагмент может быть присоединен к атому азота амина или амида или к соседним атомам углерода.

Есть множество способов для получения конъюгатов олигомерных соединений. Как правило, олигомерное соединение крепится к конъюгированному фрагменту, посредством контакта реактивной группы (например, OH, SH, амина, карбоксила, альдегида, и им

20 подобных) на олигомерном соединении с реактивной группой на конъюгированном фрагменте. В некоторых вариантах, одна реактивная группа является электрофильной, а другая является нуклеофильной.

Например, электрофильная группа может быть карбонилсодержащей по функциональности и нуклеофильная группа может быть аминовой или тиоловой. Способы

25 конъюгации нуклеиновых кислот и связанных с ними олигомерных соединений со связывающими группами и без связывающих групп, хорошо описаны в литературе, как, например, в работе Manoharan in Antisense Research and Applications, Crooke and LeBleu, eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1993, Chapter 17, которая включена здесь в качестве ссылки полностью

30 Репрезентативные патенты Соединенных Штатов, которые обучают приготовлению олигонуклеотидных конъюгатов включают, но не ограничиваясь, патенты США под

номера: 4828979; 4948882; 5218105; 5525465; 5541313; 5545730; 5552538; 5578717, 5580731; 5580731; 5591584; 5109124; 5118802; 5138045; 5414077; 5486603; 5512439; 5578718; 5608046; 4587044; 4605735; 4667025; 4762779; 4789737; 4824941; 4835263; 4876335; 4904582; 4958013; 5082830; 5112963; 5214136; 5082830; 5112963; 5149782; 5214136; 5245022; 5254469; 5 5258506; 5262536; 5272250; 5292873; 5317098; 5371241; 5391723; 5416203; 5451463; 5510475; 5512667; 5514785; 5565552; 5567810; 5574142; 5585481; 5587371; 5595726; 5597696; 5599923; 5599928; 5672662; 5688941; 5714166; 6153737; 6172208; 6300319; 6335434; 6335437; 6395437; 6444806; 6486308; 6525031; 6528631; 6559279, каждый из которых приведен здесь в качестве ссылки.

10

Характеристика частиц нуклеиновая кислота-липид

В некоторых вариантах, настоящее изобретение относится к способам и композициям для производства липид-инкапсулированных частиц нуклеиновой кислоты, в которых нуклеиновые кислоты заключены в липидный слой. Такие частицы нуклеиновая кислота-липид, включающие миРНК олигонуклеотиды, характеризуются использованием различных биофизических параметров в том числе: (1) соотношение лекарственного средства к липиду; (2) эффективность инкапсуляции; и (3) размер частицы. Высокое соотношение лекарственного средства к липиду, высокая эффективность инкапсуляции, хорошая 15 устойчивость к нуклеазе и стабильность в сыворотке крови и контролируемый размер частиц, как правило, менее 200 нм в диаметре, являются желательными. Кроме того, характер полимера нуклеиновых кислот имеет значение, так как модификация нуклеиновых кислот в попытке придать устойчивость к нуклеазе, добавляет стоимость терапии, в то время как во многих случаях обеспечивает лишь ограниченную устойчивость. Если не указано иное, эти 20 критерии рассчитываются в этой спецификации следующим образом:

Соотношение лекарственного средства к липиду — это количество нуклеиновой кислоты в определенном объеме препарата, разделенное на количество липидов в том же объеме. Этот параметр может быть на основе моль к молю или на основе масса к массе или на основе масса к молю. Для окончательного, готового к введению состава, соотношение 30 нуклеиновая кислота : липид рассчитывается после диализа, хроматографии и/или

ферментного (например, нуклеазного) переваривания, использованных для удаления наиболее возможного количества внешних нуклеиновых кислот;

Эффективность инкапсуляции означает соотношение лекарственного средства к липиду в исходной смеси, разделенное на соотношение лекарственного средства к липиду в конечном препарате, отвечающем требованиям для введения. Это измерение относительной эффективности. Для измерения абсолютной эффективности, общее количество нуклеиновой кислоты добавленной в исходную смесь, которое остается в конечном препарате, отвечающем требованиям для введения, также может быть вычислено. Количество липидов, утраченных во время процесса производства также может быть рассчитано. Эффективность является мерой утрат и затрат на препарат; и

Размер указывает на размер (диаметр) образующихся частиц. Размер распределения может быть определен с помощью квазиупругого рассеяния света (QELS) на сайзере субмикронных частиц *Nicompr Model 370*. Частицы менее 200 нм являются предпочтительными для распределения в нео-васкуляризированных (протекающих) тканях, таких как новообразования и места воспаления.

Фармацевтические композиции

Липидные частицы согласно настоящему изобретению, особенно в сочетании с терапевтическим средством, могут быть представлены в виде фармацевтической композиции, например той, что дополнительно содержит фармацевтически приемлемый растворитель, наполнитель, или транспортное средство, например, физиологический раствор или фосфатный буфер, отобранные в соответствии со способом введения и стандартной фармацевтической практикой.

В отдельных вариантах, фармацевтические композиции, содержащие частицы липид-нуклеиновая кислота данного изобретения изготовлены в соответствии со стандартными технологиями и сверх того включают фармацевтически приемлемый носитель. В большинстве случаев, в качестве фармацевтически приемлемого носителя будет использоваться физиологический раствор. Другие подходящие носители включают, например, воду, буферизованную воду, 0,9% физиологический раствор, 0,3% раствор глицина, и подобные, содержащие гликопротеины для повышения стабильности, такие как альбумин, липопротеин, глобулин и т.д. В композициях, содержащих физиологический

раствор или другие солесодержащие носители, носитель желательно добавлять после формирования липидных частиц. Таким образом, после того, как композиции липид-нуклеиновая кислота изготовлены, композиции могут быть разбавлены фармацевтически приемлемыми носителями, такими как физиологический раствор.

5 Полученные в результате фармацевтические препараты могут быть стерилизованы обычными, хорошо известными способами стерилизации. Водные растворы могут быть упакованы для использования или профильтрованы в асептических условиях и лиофилизированны, лиофилизированный препарат должен быть соединен со стерильным водным раствором перед введением. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для соответствия физиологическим
10 условиям, такие как регулирующие pH и буферизирующие средства, регулирующие концентрацию (тоничность) вещества, как, например, ацетат натрия, лактат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция и т. д. Кроме того, липидная суспензия может включать липидозащитные вещества, которые защищают липиды от свободных радикалов и
15 липидно-перекисного повреждения при хранении. Липофильные гасители свободных радикалов, такие как α -токоферол и водорастворимые железоспецифичные сорбенты, такие как ферриоксамин, являются подходящими.

Концентрация частиц липидов или частиц липид-нуклеиновая кислота в фармацевтических препаратах может широко варьировать, т. е. приблизительно от менее чем
20 0,01%, обычно, на уровне или как минимум около 0,05-5% до 10–30% по массе и будет отобрана в первую очередь в зависимости от объема жидкости, вязкости и т.д., в соответствии с конкретным выбранным видом введения. Например, концентрация может быть увеличена, чтобы снизить нагрузку жидкости, связанную с лечением. Это может быть особенно желательно у пациентов с застойной сердечной недостаточностью связанной с
25 атеросклерозом или у пациентов с тяжелой гипертензией. Кроме того, комплексы, состоящие из раздражающих липидов могут быть разведены до низких концентраций, чтобы уменьшить воспаление в месте введения. В одной группе вариантов, нуклеиновая кислота будет иметь присоединенный ярлык и будет использоваться для диагностики (путем индикации наличия комплементарной нуклеиновой кислоты). В этом случае, количество введенных комплексов
30 будет зависеть от используемого конкретного ярлыка, состояния заболевания, которое диагностируется, и решения врача, но обычно будет составлять от примерно 0,01 мг до

примерно 50 мг на килограмм массы тела, предпочтительно от 0,1 мг до около 5 мг/кг массы тела.

Как отмечалось выше, частицы липид-терапевтический агент (например, нуклеиновая кислота) согласно изобретению может включать полиэтиленгликоль (ПЭГ)-модифицированные фосфолипиды, ПЭГ-церамиды, или ганглиозид GM1-модифицированные липиды или другие липиды эффективные для предотвращения или ограничения агрегации. Добавление таких компонентов не только предотвращает агрегацию состава. Скорее, это может также обеспечить возможность для увеличения продолжительности жизни циркуляции и для увеличения доставки композиций липид-нуклеиновая кислота к тканям-мишеням.

Настоящее изобретение также предусматривает композиции липид-терапевтическое вещество в виде комплекта. Комплект, как правило, состоит из контейнера, разделенного на отсеки для хранения различных элементов комплекта. Комплект будет содержать частицы или фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению, предпочтительно в обезвоженной или концентрированной формах, с инструкциями по их регидратации или разбавлению и введению. В некоторых вариантах, частицы содержат активные вещества, в то время как в других вариантах, они не содержат активных веществ.

Способы изготовления

Способы и композиции изобретения используют определенные катионные липиды, синтез, изготовление и характеристика которых описывается ниже и в сопровождающих Примерах. Кроме того, настоящее изобретение предлагает способы получения липидных частиц, в том числе связанных с терапевтическим средством, например, нуклеиновой кислотой. В способах, описанных в данном документе, смеси липидов объединены с буферным водным раствором нуклеиновой кислоты для получения промежуточной смеси, содержащей нуклеиновую кислоту, инкапсулированную в липидные частицы, где инкапсулированные нуклеиновые кислоты присутствуют в частицах нуклеиновая кислота/липид в соотношении примерно от 3 мас% до 25 мас%, предпочтительно от 5 мас% до 15 мас%. По желанию, промежуточной смеси может быть обеспечен размер для получения частиц липид-инкапсулированной нуклеиновой кислоты, в которых липидные части представляют собой однослойные везикулы предпочтительно с диаметром от 30 нм до

150 нм, более предпочтительно от 40 нм до 90 нм. Затем уровень pH повышают, чтобы нейтрализовать по крайней мере часть поверхностных зарядов на частицах липид-нуклеиновая кислота, обеспечивая тем самым хотя бы частично поверхностно-нейтрализованные композиции липид-инкапсулированная нуклеиновая кислота.

5 Как описано выше, некоторые из этих катионных липидов являются аминолипидами, которые заряжены при pH ниже pK_a аминогруппы и по существу нейтральны при уровне pH выше pK_a . Эти катионные липиды называются титруемые катионные липиды и они могут быть использованы в технологии приготовления лекарственного средства согласно изобретению, используя два этапа. Во-первых, липидные пузырьки могут быть
10 сформированы при более низком уровне pH с титруемыми катионными липидами и другими компонентами везикул в присутствии нуклеиновых кислот. Таким образом, пузырьки будут инкапсулировать и удерживать нуклеиновые кислоты. Во-вторых, поверхностный заряд вновь образованных пузырьков может быть нейтрализован путем увеличения уровня pH среды до уровня выше pK_a присутствующих титруемых катионных липидов, т.е. до
15 физиологического уровня pH или выше. Особенно благоприятные аспекты этого процесса включают в себя как легко достижимое удаление любой поверхностно адсорбированной нуклеиновой кислоты, так и получение в результате транспортного средства для доставки нуклеиновой кислоты, которое имеет нейтральную поверхность. Ожидается, что липосомные или липидные частицы, имеющие нейтральную поверхность, позволят избежать быстрого
20 клиренса из циркуляции и позволят избежать определенной токсичности, которая связана с катионными липосомными препаратами. Дополнительные подробности относительно использования таких титруемых катионных липидов в изготовлении частиц нуклеиновая кислота-липид предоставляются в патенте США No 6287591 и патенте США No 6858225, включенных здесь в качестве ссылки.

25 Далее отмечено, что везикулы, произведенные таким образом обеспечивают изготовление везикул одинакового размера с высоким содержанием нуклеиновых кислот. Кроме того, везикулы имеют размер в диапазоне от 30 нм до 150 нм, преимущественно примерно от 30 нм до 90 нм.

Не углубляясь в детали теории, считается, что очень высокая эффективность
30 инкапсуляции нуклеиновой кислоты является результатом электростатического взаимодействия при низких значениях pH. При кислых уровнях pH (например, pH 4,0)

поверхность везикул заряжена и связывает часть нуклеиновых кислот через электростатическое взаимодействие. Когда внешний кислый буфер изменяется на более нейтральный буфер (например, pH 7,5), поверхность липидной частицы или липосомы нейтрализуется, что позволяет удалить любую поверхностную нуклеиновую кислоту. Более

5 подробная информация о процессе изготовления приводится в различных публикациях (например, патент США No 6287591 и патент США No 6858225).

С учетом вышеизложенного, настоящее изобретение предоставляет способы изготовления составов липид/нуклеиновая кислота. В способах, описанных в данном документе, смесь липидов объединена с буферным водным раствором нуклеиновой кислоты

10 для получения промежуточной смеси, содержащей нуклеиновую кислоту, инкапсулированную в липидные частицы, где инкапсулированные нуклеиновые кислоты присутствуют в частицах нуклеиновая кислота/липид в соотношении примерно от 10 мас% до приблизительно 20 мас%. Промежуточной смеси может быть по желанию обеспечен

15 размер для получения частиц липид-инкапсулированной нуклеиновой кислоты, в которых липидные части представляют собой однослойные везикулы предпочтительно с диаметром от 30 нм до 150 нм, более предпочтительно от 40 нм до 90 нм. Затем уровень pH повышают, чтобы нейтрализовать по крайней мере часть поверхностных зарядов на частицах липид-нуклеиновая кислота, обеспечивая тем самым хотя бы частично поверхностно-нейтрализованные композиции липид-инкапсулированная нуклеиновая кислота.

20 В некоторых вариантах, смесь липидов включает в себя по крайней мере два липидных компонента: первый липидный компонент согласно настоящему изобретению, который отобран из липидов, которые имеют уровень pK_a , при котором липид является катионным при уровне pH ниже pK_a и нейтральным при уровне pH выше pK_a , и второй липидный компонент, который отобран из числа липидов, предупреждающих агрегацию

25 частиц на протяжении времени образования частиц липид-нуклеиновая кислота. В отдельных вариантах, аминлипид является новым катионным липидом согласно настоящему изобретению.

При подготовке частиц нуклеиновая кислота-липид данного изобретения, смесь липидов, как правило, является раствором липидов в органическом растворителе. Эта смесь

30 липидов может быть затем высушена, с образованием тонкой пленки или лиофилизированна с образованием порошка перед тем как она будет гидратированна с водным буфером для

формирования липосом. Кроме того, в предпочтительном способе, липидная смесь может быть растворена в воде, смешанной с алкоголем, таким как этанол, и этот раствор этанола добавляется в водный буфер, что приводит к спонтанному образованию липосом. В большинстве вариантов, спирт используется в том виде, в котором он доступен в продаже.

- 5 Например, этанол может использоваться в виде абсолютного этанола (100%), или как 95% этанол, остальное составляет вода. Этот способ более подробно описан в патенте США No 5976567.

В одном типичном варианте, смесь липидов представляет собой смесь катионных липидов, нейтральных липидов (кроме катионных липидов), стерола (например, холестерина) и ПЭГ-модифицированного липида (например, ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА) в спиртовом растворителе. В предпочтительных вариантах, смесь липидов состоит главным образом из катионного липида, нейтрального липида, холестерина и ПЭГ-модифицированного липида в спирте, более предпочтительно в этаноле. В следующих предпочтительных вариантах, первый раствор состоит из вышеупомянутой смеси липидов, в молярном соотношении

10 примерно 20-70% катионный липид : 5-45% нейтральный липид : 20-55% холестерин : 0,5-15% ПЭГ модифицированный липид. В еще более предпочтительных вариантах, первый раствор состоит в основном из липидов, отобранных из таблицы 1, ДСФХ, холестерина и ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА, более предпочтительно в молярном соотношении примерно 20-60% катионный липид : 5-25% ДСФХ : 25-55% холестерин : 0,5-15% ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-

20 ДМА. В отдельных вариантах, молярное липидное соотношение составляет примерно 40/10/40/10 (моль% катионный липид/ДСФХ/Холестерин/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА), 35/15/40/10 (моль% катионный липид/ДСФХ/Холестерин/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА) или 52/13/30/5 (моль% катионный липид/ДСФХ/Холестерин/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА). В другой группе предпочтительных вариантов, нейтральный липид в этих композициях замещается на

25 ПОФХ, ДПФХ, ДОФЭ или СМ.

В соответствии с изобретением, липидная смесь объединена с буферным водным раствором, который может содержать нуклеиновые кислоты. Буферный водный раствор, как правило, является раствором, в котором буфер имеет уровень pH менее pK_a протонируемого липида в липидной смеси. Примеры подходящих буферов включают цитрат, фосфат, ацетат,

30 и МЭС. Особенно предпочтительным буфером является цитратный буфер. Предпочтительные буферы будут находиться в диапазоне 1-1000 мМ аниона, в зависимости

от химических свойств инкапсулированных нуклеиновых кислот, и для достижения высокого уровня загрузки может понадобиться существенная оптимизация концентрации буфера (см., например, патент США No 6287591 и патент США No 6858225). Кроме того, может быть пригодна чистая вода, подкисленная хлоридом, сульфатом или подобными веществами до уровня pH 5-6. В этом случае, можно применить добавление 5% раствора глюкозы или другого неионного раствора, который будет сохранять равновесие осмотического потенциала по ту сторону мембраны частицы, когда частицы подвергнутся диализу для удаления этанола, повышению pH, или будут смешаны с фармацевтически приемлемым носителем, таким как физиологический раствор. Количество нуклеиновой кислоты в буфере может варьироваться, но как правило, будет примерно на уровне от 0,01 мг/мл до 200 мг/мл, более предпочтительно от примерно 0,5 мг/мл до 50 мг/мл.

Смесь липидов и буферный водный раствор терапевтических нуклеиновых кислот объединяют, чтобы получить промежуточную смесь. Промежуточная смесь, как правило, представляет собой смесь липидных частиц, обладающих инкапсулированными нуклеиновыми кислотами. Кроме того, промежуточная смесь может также содержать какую-то часть нуклеиновых кислот, которые присоединены к поверхности липидных частиц (липосом или липидных везикул) в связи с ионным притяжением отрицательно заряженных нуклеиновых кислот и положительно заряженных липидов на поверхности липидной частицы (амино липиды или другие липиды, входящих в состав протонируемого первого липидного компонента заряжены положительно в буфере с уровнем pH меньше pK_a протонируемой группы на липиде). В одной группе предпочтительных вариантов, смесь липидов является спиртовым раствором липидов и объем каждого из растворов регулируется таким образом, что при сочетании, полученное в результате содержание алкоголя составляет примерно от 20% по объему до 45% по объему. Способ объединения смесей может включать любой из множества процессов, часто зависящий от масштабов производства состава. Например, если общий объем составляет около 10-20 мл или менее, растворы могут быть соединены в пробирке и перемешаны с использованием вихревого смесителя. Масштабные процессы могут осуществляться в соответствующей стеклянной измерительной емкости для серийного производства.

При желании, комплексы липид-инкапсулированное терапевтическое вещество (например, нуклеиновая кислота), которые производятся путем объединения смеси липидов и

буферного водного раствора терапевтических веществ (нуклеиновых кислот) могут быть откалиброваны для достижения желаемого диапазона размеров и относительно узкого распределения размеров липидных частиц. Предпочтительно, если композиции, предусмотренные в данном документе, будут откалиброваны по размеру до среднего диаметра от 70 нм до 200 нм, более предпочтительно от 90 нм до около 130 нм. Доступны несколько способов для калибровки липосом до нужного размера. Один способ калибровки описан в патенте США No 4737323, включенном здесь в качестве ссылки. Ультразвуковое разрушение липосомной суспензии с помощью обработки ультразвуком в ванной или с помощью зонда служит причиной постепенного сокращения размеров вплоть до мелких однослойных везикул (SUV), по размеру меньше, чем около 0,05 мкм. Гомогенизация — это другой способ, который опирается на гидродинамическое фрагментирование энергии фрагмента больших липосом на более мелкие. При типичной процедуре гомогенизации, многослойные везикулы рециркулируют через стандартный гомогенизатор эмульсии до того времени, как регистрируется липосома заданного размера, как правило, от 0,1 мкм до 0,5 мкм. В обоих способах, распределение частиц по размерам можно контролировать с помощью обычного определения размера частиц лазерным пучком. Для некоторых способов в настоящем документе, для получения одинакового размера везикул используется экструзия.

Экструзия липосомных композиций через поликарбонатную мембрану с малыми порами или асимметричную керамическую мембрану приводит к относительно хорошо определенному размеру распределения. Как правило, суспензия циркулирует через мембраны один или несколько раз до достижения желаемого размера распределения липосомного комплекса. Липосомы могут быть экструдированы через последовательные мембраны с уменьшением пор, для достижения постепенного сокращения размера липосом. В некоторых случаях, образующиеся композиции липид-нуклеиновая кислота, могут быть использована без калибровки.

В отдельных вариантах, способы настоящего изобретения дополнительно содержат шаг нейтрализации, по крайней мере некоторых поверхностных зарядов на липидной части композиции липид-нуклеиновая кислота. Посредством по крайней мере, частичной нейтрализации поверхностных зарядов, неинкапсулированная нуклеиновая кислота освобождается от поверхности липидной частицы и может быть удалена из композиции при использовании обычных способов. Предпочтительно удалять неинкапсулированные и

поверхностно адсорбированные нуклеиновые кислоты из полученной композиции путем обмена буферных растворов. Например, замена цитратного буфера (рН около 4,0, используемого для формирования композиции) на HEPES-солевой буферный раствор (HBS рН около 7,5), приводит к нейтрализации поверхности липосом и высвобождению нуклеиновых кислот с поверхности. Освобожденные нуклеиновые кислоты могут быть удалены с помощью хроматографии с использованием стандартных способов, а затем переведены в буфер с рН выше pK_a использованных липидов.

По выбору, липидные везикулы (т.е. липидные частицы) могут быть сформированы путем гидратации в водном буфере и откалиброваны с помощью любого из способов, описанных выше, до добавления нуклеиновой кислоты. Как описано выше, уровень рН водного буфера должен быть ниже pK_a аминлипидов. Затем к этим откалиброванным, предварительно сформированным везикулам может быть добавлен раствор нуклеиновых кислот. Чтобы сделать возможной инкапсуляцию нуклеиновых кислот в такие "предварительно сформированные" везикулы, смесь должна содержать алкоголь, такой как этанол. Что касается этанола, он должен присутствовать в концентрации от около 20% (по массе) до примерно 45% (по массе). Кроме того, может быть необходимо нагреть смесь предварительно сформированных пузырьков и нуклеиновых кислот в смеси водного буфера и этанола до температуры от около 25°C до 50°C, в зависимости от состава липидных везикул и характера нуклеиновой кислоты. Для специалиста в данной области техники будет очевидным, что оптимизация процесса инкапсуляции для достижения желаемого уровня нуклеиновых кислот в липидных везикулах потребует манипулирования переменными, такими как концентрация этанола и температура. Примеры подходящих условий для инкапсуляции нуклеиновых кислот приводятся в Примерах. Как только нуклеиновые кислоты инкапсулированы в предварительно сформированные везикулы, уровень внешней рН может быть увеличен, чтобы по крайней мере частично нейтрализовать поверхностный заряд. Неинкапсулированные и поверхностно адсорбированные нуклеиновые кислоты могут быть удалены, как описано выше.

Способы применения

Липидные частицы согласно настоящему изобретению могут быть использованы для доставки терапевтических средств в клетку, *in vitro* или *in vivo*. В отдельных вариантах,

терапевтическим средством является нуклеиновая кислота, которая доставляется в клетку с помощью частиц нуклеиновая кислота-липид согласно настоящему изобретению. Хотя следующее описание различных способов использования липидных частиц и связанных с ними фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению проиллюстрировано

5 описанием, связанным с частицами нуклеиновая кислота-липид, понятно, что эти способы и композиции могут быть легко адаптированы для доставки любого терапевтического средства для лечения любого заболевания или нарушения, которые извлекают пользу от такого лечения.

В некоторых вариантах, настоящее изобретение относится к способам введения

10 нуклеиновых кислот в клетку. Предпочтительными нуклеиновыми кислотами для введения в клетку являются миРНК, иммунностимулирующие олигонуклеотиды, плазмиды, антисмысловые и рибозимы. Эти способы могут быть проведены посредством контактирования частиц или композиций согласно настоящему изобретению с клетками в течение периода времени, достаточного для того, чтобы произошла внутриклеточная

15 доставка.

Композиции согласно настоящему изобретению могут адсорбироваться практически любым типом клеток. После адсорбирования, частицы нуклеиновая кислота-липид могут быть эндоцитированы частью клеток, обмениваться липидами с клеточными мембранами, или слиться с клетками. Перемещение или инкорпорация нуклеиновокислотной части комплекса

20 может осуществляться любым из этих путей. Не желая быть ограниченными, признавая масштаб изобретения, считается, что в случае захвата частиц в клетку путем эндоцитоза, частицы затем взаимодействуют с эндосомальной мембраной, что приводит к дестабилизации эндосомальной мембраны, возможно, посредством формирования недвухслойных фаз, результатом чего является введение инкапсулированных нуклеиновых

25 кислот в цитоплазму клетки. Точно так же, в случае прямого слияния частиц с плазматической мембраной клетки, когда происходит слияние, липосомная мембрана становится интегрированной в клеточную мембрану и содержимое липосом объединяется с внутриклеточной жидкостью. Контакт между клетками и композициями липид-нуклеиновая кислота, при осуществлении *in vitro*, будет происходить в биологически совместимой среде.

30 Концентрация композиции может широко варьироваться в зависимости от конкретного применения, но, как правило, примерно находится в диапазоне от 1 мкмоль до 10 ммоль. В

некоторых вариантах, лечение клеток композициями липид-нуклеиновая кислота, как правило, будет осуществляться при физиологических температурах (около 37°C) в течение периода времени от 1 до 24 часов, преимущественно от 2 до 8 часов. При применении *in vitro*, нуклеиновые кислоты могут быть доставлены в любую клетку, выращенную в культуре, будь
 5 она растительного или животного происхождения, позвоночных или беспозвоночных животных, а также из любой ткани или любого типа. В предпочтительных вариантах, клетки будут клетками животных, более предпочтительно клетками млекопитающих, и наиболее предпочтительно человеческими клетками.

В одной группе вариантов, суспензия из частиц липид-нуклеиновая кислота
 10 добавляется к 60-80% сливных гальванизированных клеток, имеющих плотность клеток от примерно 10^3 клеток/мл до примерно 10^5 клеток/мл, более предпочтительно около 2×10^4 клеток/мл. Концентрация суспензии, добавленной к клеткам, предпочтительно равняется примерно от 0,01 мкг/мл до 20 мкг/мл, более предпочтительно около 1 мкг/мл.

В другом варианте, липидные частицы изобретения могут быть использованы для
 15 доставки нуклеиновой кислоты в клетки или клеточные линии (например, линии опухолевых клеток). Неограничивающие примеры таких клеточных линий включают: *HELA* (ATCC Cat N: CCL-2), *KB* (ATCC Cat N: CCL-17), *HEP3B* (ATCC Cat N: HB-8064), *SKOV-3* (ATCC Cat N: HTB-77), *HCT-116* (ATCC Cat N: CCL-247), *HT-29* (ATCC Cat N: HTB-38), *PC-3* (ATCC Cat N: CRL-1435), *A549* (ATCC Cat N: CCL-185), *MDA-MB-231* (ATCC Cat N: HTB-26).

20 Типичные области применения включают использование известных процедур для обеспечения внутриклеточной доставки миРНК, чтобы разрушить или выключить специфические клеточные мишени. Альтернативные области применения включают доставку ДНК или мРНК последовательностей, которые кодируют для терапевтически пригодных полипептидов. Таким образом, обеспечивается терапия генетических заболеваний путем
 25 поставки недостающих или отсутствующих генных продуктов (т.е. для дистрофии Дюшенна, см. Kunkel, *et al.*, *Brit. Med. Bull.* 45(3):630-643 (1989), муковисцидоза, см. Goodfellow, *Nature* 341:102-103 (1989)). Другие виды применения для композиций согласно настоящему изобретению включают введение антисмысловых олигонуклеотидов в клетки (см., Bennett, *et al.*, *Mol. Pharm.* 41:1023-1033 (1992)).

30 Кроме того, композиции согласно настоящему изобретению могут также быть использованы для доставки нуклеиновых кислот в клетки *in vivo*, с использованием способов,

которые известны специалистам в данной области техники. В отношении доставки ДНК или РНК последовательностей, работа Zhu, *et al.*, *Science* 261:209-211 (1993), включенная здесь в качестве ссылки, описывает внутривенную доставку цитомегаловирус(ЦМВ)-хлорамфеникол ацетилтрансферазы (ХАТ), экспрессирующий плазмид с использованием ДОТМА-ДОФЭ комплексов. Работа Hyde, *et al.*, *Nature* 362:250-256 (1993), включенная здесь в качестве ссылки, описывает доставку гена трансмембранного регулятора проводимости муковисцидоза (МВТР) к эпителию дыхательных путей и к альвеолам в легких мышей, используя липосомы. Работа Brigham, *et al.*, *Am. J. Med. Sci.* 298:278-281 (1989), включенная здесь в качестве ссылки, описывает *in vivo* трансфекцию легких мышей с функционирующим прокариотическим геном, кодирующим внутриклеточный фермент, хлорамфеникола ацетилтрансферазу (ХАТ). Таким образом, составы изобретения могут быть использованы в лечении инфекционных заболеваний.

При введении *in vivo*, фармацевтические композиции, предпочтительно вводить парентерально, т.е. внутрисуставно, внутривенно, внутрибрюшинно, подкожно или внутримышечно. В отдельных вариантах, фармацевтические композиции вводят внутривенно или внутрибрюшинно в виде болюсной инъекции. Для примера, см. работы Stadler, *et al.*, патент США No 5286634, которая включена здесь в качестве ссылки. Внутриклеточная доставка нуклеиновой кислоты также обсуждалась в работах Straubinger, *et al.*, METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, New York. 101:512-527 (1983); Mannino, *et al.*, *Biotechniques* 6:682-690 (1988); Nicolau, *et al.*, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 6:239-271 (1989), и Behr, *Acc. Chem. Res.* 26:274-278 (1993). Тем не менее, другие способы введения лекарственных средств на основе липидов описаны, например, в работах Rahman *et al.*, патенте США No 3993754; Sears, патенте США No 4145410; Papahadjopoulos *et al.*, патенте США No 4235871; Schneider, патенте США No 4224179; Lenk *et al.*, патенте США No 4522803; Fountain *et al.*, патенте США No 4588578.

В других способах, фармацевтические препараты могут контактировать с тканью-мишенью путем непосредственного нанесения (аппликации) препарата на ткани. Аппликация может быть выполнена путем местных, "открытых" или "закрытых" процедур. Под "местной" процедурой подразумевается непосредственная аппликация фармацевтических препаратов на ткань, подвергающуюся воздействию окружающей среды, такую как кожа, ротоглотка, наружный слуховой проход, и подобные. "Открытые" процедуры - это те процедуры, которые

включают рассечение кожи пациента и непосредственную визуализацию подлежащей ткани, на которую наносятся фармацевтические препараты. Обычно это достигается путем хирургического вмешательства, такого как торакотомия для доступа к легким, брюшная лапаротомия для доступа к брюшной полости, или другой непосредственный хирургический

5 подход к целевой ткани. "Закрытые" процедуры – это инвазивные процедуры, при которых внутренние ткани непосредственно не визуализируются, но доступны благодаря введению инструментов через небольшие раны на коже. Например, препараты могут быть введены в брюшину при помощи лаважа через иглу. Подобным образом фармацевтические препараты могут быть введены в мозговые оболочки или спинной мозг путем инфузии во время

10 люмбальной пункции, которая проводится после соответствующего расположения пациента, как обычно принято на практике при проведении спинальной анестезии или контрастной визуализации спинного мозга с метразамидом. Кроме того, препараты могут быть введены через эндоскопические приборы.

Композиции липид-нуклеиновая кислота могут быть также введены в виде

15 аэрозольных ингаляций в легкие (см., Brigham, *et al.*, *Am. J. Sci.* 298(4):278-281 (1989)), либо путем инъекции непосредственно в область заболевания (Culver, Human Gene Therapy, MaryAnn Liebert, Inc., Publishers, New York. pp.70-71 (1994)).

Способы настоящего изобретения могут быть применены на практике для различных организмов. Предпочтительные организмы включают виды млекопитающих, такие как люди,

20 не человеческие приматы, собаки, кошки, крупный рогатый скот, лошади, овцы, и им подобные.

Дозы для частиц липид-терапевтическое вещество согласно настоящему изобретению будут зависеть от соотношения терапевтического вещества к липиду и заключения врача, который назначает средство, основанного на возрасте, массе тела и состоянии пациента.

25 В одном из вариантов, настоящее изобретение предоставляет способ модуляции экспрессии целевого полинуклеотида или полипептида. Эти способы обычно включают контакт клетки с липидной частицей настоящего изобретения, которая является связанной с нуклеиновой кислотой, способной модулировать экспрессию целевого полинуклеотида или полипептида. Используемый здесь термин "модулировать" означает изменять экспрессию

30 целевого полинуклеотида или полипептида. В разных вариантах, модулирование может означать увеличение или повышение, или может означать уменьшение или сокращение.

Способы измерения уровня экспрессии целевого полинуклеотида или полипептида известны и доступны в области техники и включают, например, способы, использующие обратную транскрипцию-полимеразную цепную реакцию (ОТ-ПЦР) и иммуногистохимические способы. В отдельных вариантах, уровень экспрессии целевого полинуклеотида или полипептида увеличивается или уменьшается по крайней мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, или более чем на 50% по сравнению с соответствующим контрольным значением.

Например, если желательна повышенная экспрессия полипептида, нуклеиновая кислота может быть вектором экспрессии, который включает полинуклеотид, кодирующий заданный полипептид. С другой стороны, если желательна сниженная экспрессия полинуклеотида или полипептида, то нуклеиновая кислота может быть, например, антисмысловым олигонуклеотидом, миРНК, или микроРНК, которые включают в себя последовательность полинуклеотида, которая специфически гибридизируется к полинуклеотиду, который кодирует целевой полипептид, тем самым нарушая экспрессию целевого полинуклеотида или полипептида. Кроме того, нуклеиновая кислота может быть плазмидом, который экспрессирует антисмысловой олигонуклеотид, миРНК, или микроРНК.

В одном конкретном варианте, настоящее изобретение обеспечивает способ модуляции экспрессии полипептида клеткой, включая доставку в клетку липидной частицы, которая состоит из, или состоит в основном из липида выбранного из таблицы 1, ДСФХ, Холестерина, и либо ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА, например, в молярном соотношении равным примерно 20-60% катионный липид : 5-25% ДСФХ : 25-55% холестерин : 0,5-15% ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА, где липидная частица, связанная с нуклеиновой кислотой, способной к модуляции экспрессии полипептида. В отдельном варианте, молярное липидное соотношение составляет приблизительно 40/10/40/10 (моль% катионный липид/ДСФХ/Холестерин/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА), 35/15/40/10 (моль% катионный липид/ДСФХ/Холестерин/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА) или 52/13/30/5 (моль% катионный липид/ДСФХ/Холестерин/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА). В другой группе вариантов, нейтральный липид в этих композициях замещается на ПОФХ, ДПФХ, ДОФЭ или СМ.

В отдельных вариантах, терапевтическое средство отобрано из миРНК, микроРНК, антисмыслового олигонуклеотида, и плазмиды, способного экспрессировать миРНК, микроРНК, или антисмысловой олигонуклеотид, и где миРНК, микроРНК, или антисмысловая РНК содержат полинуклеотид, который специфически связывается с

полинуклеотидом, кодирующим полипептид, или его комплемент, таким образом, что экспрессия полипептида снижается.

В других вариантах, нуклеиновая кислота является плазмидом, который кодирует полипептид или его функциональный вариант или его фрагмент, например, таким образом, что экспрессия полипептида или его функционального варианта или его фрагмента увеличивается.

В связанных вариантах, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения заболевания или нарушения, характеризующегося чрезмерной экспрессией полипептида у субъекта, включающий обеспечение субъекта фармацевтической композицией согласно настоящему изобретению, в которой терапевтическое средство отобрано из миРНК, микроРНК, антисмыслового олигонуклеотида, и плазида, способного экспрессировать миРНК, микроРНК, или антисмысловой олигонуклеотид, и где миРНК, микроРНК, или антисмысловая РНК содержат полинуклеотид, который специфически связывается с полинуклеотидом, кодирующим полипептид, или его комплемент.

В одном из вариантов, фармацевтическая композиция содержит липидную частицу, которая состоит из, или состоит в основном из липида выбранного из таблицы 1, ДСФХ, холестерина, и либо ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА, например, в молярном соотношении равном примерно 20-60% катионный липид : 5-25% ДСФХ : 25-55% холестерин : 0,5-15% ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА, где липидная частица, связана с терапевтической нуклеиновой кислотой. В отдельных вариантах, молярное липидное соотношение составляет приблизительно 40/10/40/10 (моль% катионный липид/ДСФХ/Холестерин/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА), 35/15/40/10 (моль% катионный липид/ДСФХ/Холестерин/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА) или 52/13/30/5 (моль% катионный липид/ДСФХ/Холестерин/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА). В другой группе вариантов, нейтральный липид в этих композициях замещается на ПОФХ, ДПФХ, ДОФЭ или СМ.

В другом связанном варианте, настоящее изобретение включает способ лечения заболевания или расстройства, характеризующегося недостаточной экспрессией полипептида у субъекта, включая обеспечение субъекта фармацевтической композицией согласно настоящему изобретению, в котором терапевтическим агентом является плазмид, который кодирует полипептид или его функциональный вариант или его фрагмент.

В одном из вариантов, фармацевтическая композиция содержит липидную частицу, которая состоит исключительно или в основном из липида выбранного из таблицы 1, ДСФХ, Холестерина, и либо ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА, например, в молярном соотношении равным примерно 20-60% катионный липид : 5-25% ДСФХ : 25-55% холестерин : 0,5-15% ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА, где липидная частица, связанна с терапевтической нуклеиновой кислотой. В отдельных вариантах, молярное липидное соотношение составляет приблизительно 40/10/40/10 (моль% катионный липид/ДСФХ/Холестерин/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА), 35/15/40/10 (моль% катионный липид/ДСФХ/Холестерин/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА) или 52/13/30/5 (моль% катионный липид/ДСФХ/Холестерин/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА). В другой группе вариантов, нейтральный липид в этих композициях замещается на ПОФХ, ДПФХ, ДОФЭ или СМ.

Настоящее изобретение также предоставляет способ индуцирования иммунного ответа у субъекта, включающий обеспечение субъекта фармацевтической композицией согласно настоящему изобретению, в котором терапевтическое средство является иммуностимулирующим олигонуклеотидом. В некоторых вариантах, иммунный ответ является гуморальным иммунным ответом или иммунным ответом слизистых оболочек. В одном варианте, фармацевтическая композиция содержит липидную частицу, которая состоит из, или состоит в основном из липида выбранного из таблицы 1, ДСФХ, холестерина, и либо ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА, например, в молярном соотношении равным примерно 20-60% катионный липид : 5-25% ДСФХ : 25-55% холестерин : 0,5-15% ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА, где липидная частица, связанна с терапевтической нуклеиновой кислотой. В отдельных вариантах, молярное липидное соотношение составляет приблизительно 40/10/40/10 (моль% катионный липид/ДСФХ/Холестерин/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА), 35/15/40/10 (моль% катионный липид/ДСФХ/Холестерин/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА) или 52/13/30/5 (моль% катионный липид/ДСФХ/Холестерин/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДМА). В другой группе вариантов, нейтральный липид в этих композициях замещается на ПОФХ, ДПФХ, ДОФЭ или СМ.

В дальнейших вариантах, фармацевтическая композиция предоставляется субъекту в сочетании с вакциной или антигеном. Таким образом, настоящее изобретение само обеспечивает вакцинами, содержащими в составе липидную частицу согласно настоящему изобретению, которая включает в себя иммуностимулирующий олигонуклеотид, а также является связанной с антигеном, к которому желателен иммунный ответ. В отдельных

вариантах, антиген является опухолевым антигеном или связан с инфекционным агентом, таким как, например, вирус, бактерия, или паразит.

Многообразие опухолевых антигенов, антигенов инфекционных агентов, и антигенов, связанных с другими заболеваниями, хорошо известны в данной области техники и примеры этих антигенов описаны в ссылках, приведенных в настоящем документе. Примеры антигенов подходящих для использования в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваясь, полипептидные антигены и ДНК-антигены. Конкретные примеры антигенов включают антиген гепатита А, гепатита В, натуральной оспы, полиомиелита, сибирской язвы, гриппа, тифа, столбняка, кори, ротавируса, дифтерии, коклюша, туберкулеза, краснухи. В предпочтительном варианте, антиген является рекомбинантным антигеном гепатита В. В других подходах, антиген является рекомбинантным антигеном гепатита А. В других подходах, антиген является опухолевым антигеном. Примерами таких ассоциированных с опухолью антигенов являются MUC-1, ЭБВ (вирус Эпштейна-Барра) антиген и антигены, связанные с лимфомой Беркитта. В еще одном аспекте, антиген является рекомбинантным антигеном родственного тирозиназе белкового опухолевого антигена. Специалисты в данной области техники будут знать о других антигенах, подходящих для использования в настоящем изобретении.

Антигены, ассоциированные с опухолью, подходящие для использования в обсуждаемом изобретении, включают в себя как мутированные, так и немутированные молекулы, которые могут указывать на один тип опухоли, быть общими для нескольких типов опухолей, и/или экспрессироваться или чрезмерно экспрессироваться исключительно в опухолевых клетках по сравнению с нормальными клетками. В дополнение к белкам и гликопротеинам, также были зарегистрированы опухоль-специфические образцы экспрессии углеводов, ганглиозидов, гликолипидов и муцинов. Типичные опухоль-специфичные антигены для использования в раковых вакцинах, являющихся предметом обсуждения, включают белковые продукты онкогенов, генов-супрессоров опухолей и других генов с мутациями или перестановками, уникальными для опухолевых клеток, реактивированные продукты эмбриональных генов, онкоэмбриональные антигены, дифференцировочные тканеспецифические (но не опухоль-специфические) антигены, рецепторы фактора роста, углеводные остатки клеточной поверхности, чужеродные вирусные белки и ряд других аутобелков.

Специфические варианты опухолевых антигенов включают, например, мутировавшие антигены, такие как белковые продукты *Ras p21* протоонкогенов, онкогены супрессора опухоли *p53* и *BCR-abl*, а также *CDK4*, *MUM1*, каспазу 8, и бета катенин; чрезмерно экспрессированные антигены такие как галектин 4, галектин 9, карбоангидраза, альдолаза А, *PRAME*, *Her2/neu*, *ErbB-2* и *KSA*, онкоэмбриональные антигены, таких как альфа-фетопротеин (*АФП*), хорионический гонадотропин человека (*ХГЧ*); аутоантигены, такие как карциноэмбриональный антиген (*КЭА*) и антигены дифференциации меланоцитов, такие как *Mart 1/Melan A*, *gp100*, *gp75*, тирозиназа, *TRP1* и *TRP2*; простатспецифические антигены, такие как *PSA*, *PAP*, *PSMA*, *PSM-P1* и *PSM-P2*, реактивированные продукты эмбриональных генов, такие как *MAGE 1*, *MAGE 3*, *MAGE 4*, *GAGE 1*, *GAGE 2*, *BAGE*, *RAGE* и другие антигены рака яичка, таких как *NY-ESO1*, *SSX2* и *SCP1*; муцины, такие как *Muc-1* и *Muc-2*; ганглиозиды, такие как *GM2*, *GD2* и *GD3*, нейтральные гликолипиды и гликопротеиды, таких как *Lewis (y)* и *globo-H*, и гликопротеины, такие как *Tn*, *Thompson-Freidenreich* антиген (*TF*) и *sTn*. Также включены в данный документ в качестве опухоль-ассоциированных антигенов

10
 15
 20
 25
 30

цельноклеточные и опухолевоклеточные лизаты, а также их иммуногенные части, а также идиотипы иммуноглобулина, экспрессированные на моноклональных пролиферациях В-лимфоцитов для использования против В клеточных лимфом.

Патогенные микроорганизмы включают, но не ограничиваясь, инфекционные агенты, например, вирусы, которые инфицируют млекопитающих, и особенно людей. Примеры

20
 25
 30

контагиозных вирусов включают, но не ограничиваясь: Ретровирусы (например, вирусы иммунодефицита человека, такие, как ВИЧ-1 (также упоминается как HTLV-III, LAV или HTLV-III/LAV, или ВИЧ-III; и другие изоляты, такие, как ВИЧ-LP; Пикорнавирусы (например, вирусы полиомиелита, вирус гепатита А, энтеровирусы, человеческие вирусы Коксаки, риновирусы, эховирусы); Калицивирусы (например, штаммы, вызывающие гастроэнтерит) Тогавирусы (например, вирусы энцефалитов лошадей, вирусы краснухи); Флавивирусы (например, вирусы лихорадки Денге, вирусы энцефалита, вирусы желтой лихорадки); Короновирусы (например, коронавирус); Рабдовирусы (например, вирусы везикулярного стоматита, вирусы бешенства); Филовирусы (например, вирусы Эбола); Парамиксовирусы (например, вирусы парагриппа, вирус паротита, вирус кори, респираторно-синцитиальный вирус); Ортомиксовирусы (например, вирусы гриппа); Буньявирусы (например, Хантаан вирусы, буньявирусы, флебовирусы, наировирусы); Аренавирусы

(вирусы геморрагической лихорадки); Реовирусы (например, реовирусы, орбивирусы и ротавирусы); Бирнавирусы; Гепаднавирусы (вирус гепатита В); Парвовирусы (парвовирусы); Паповавирусы (папилломавирусы, вирусы полиомы); Аденовирусы (большинство аденовирусов); Герпесвирусы (вирус простого герпеса (ВПГ) 1 и 2 типа, вирус ветряной оспы, цитомегаловирус (ЦМВ), вирус герпеса); Поксвирусы (вирусы натуральной оспы, вирусы коревой оспы, вирусы оспы) и Иридовирусы (например, вирус африканской чумы свиней); и неклассифицированные вирусы (например, возбудители губчатой энцефалопатии, возбудитель дельта гепатита (считается дефектным спутником вируса гепатита В), возбудители гепатита «ни А ни В» (класс 1 = фекально оральный (энтеральный) путь передачи; класс 2 = парентеральный путь передачи (например, гепатит С); Норовирус («вирус Норуолк» и связанные вирусы, и астровирусы).

Кроме того, в качестве антигенов у позвоночных животных, служат грамотрицательные и грамположительные бактерии. Такие грамположительные бактерии, включают, но не ограничиваясь виды пастереллы, виды стафилококков, и виды стрептококков. Грамотрицательные бактерии, включают, но не ограничиваясь, кишечную палочку, бактерии вида псевдомонад и вида сальмонелл. Конкретные примеры инфекционных бактерий включают, но не ограничиваясь ими: *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* виды (например, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* группы А), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* группы В), *Streptococcus* (группы *viridans*), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (анаэробные виды), *Streptococcus pneumoniae*, *pathogenic Campylobacter* вид, *Enterococcus* вид, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* вид, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides* вид, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia*, и *Actinomyces israelii*.

Дополнительные примеры патогенных микроорганизмов включают, но не ограничиваясь, инфекционные грибы, поражающие млекопитающих, и особенно людей. Примеры инфекционных грибов включают, но не ограничиваясь *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*,

Candida albicans. Примеры инфекционных паразитов включают *Plasmodium* как, например *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, и *Plasmodium vivax*. Другие инфекционные организмы (например, простейшие) включают *Toxoplasma gondii*.

В одном варианте состав изобретения может быть использован, чтобы выключить или

5 модулировать гены-мишени, такие как, но не ограничиваясь ими, *FVII*, *Eg5*, *PCSK9*, *TPX2*, апоB, *SAA*, *TTR*, *RSV*, *PDGF beta* ген, *Erb-B* ген, *Src* ген, *CRK* ген, *GRB2* ген, *RAS* ген, *MEKK* ген, *JNK* ген, *RAF* ген, *Erk1/2* ген, *PCNA(p21)* ген, *MYB* ген, *JUN* ген, *FOS* ген, *BCL-2* ген, *Cyclin D* ген, *VEGF* ген, *EGFR* ген, Циклин А ген, Циклин Е ген, *WNT-1* ген, бета-катенин ген, *c-MET* ген, *PKC* ген, *NFKB* ген, *STAT3* ген, сурвивин ген, *Her2/Neu* ген, *SORT1* ген, *XPB1* ген,

10 топоизомераза I ген, топоизомераза II альфа ген, *p73* ген, *p21(WAF1/CIP1)* ген, *p27(KIP1)* ген, *PPMID* ген, *RAS* ген, *caveolin I* ген, *MIB I* ген, *MTAI* ген, *M68* ген, гены супрессоры опухолей, *p53* ген супрессор опухоли, *p53* член семьи *DN-p63*, *pRb* ген супрессор опухоли, *APC1* ген супрессор опухоли, *BRCA1* ген супрессор опухоли, *PTEN* ген супрессор опухоли, *mLL* ген слияния, *BCR/ABL* ген слияния, *TEL/AML1* ген слияния, *EWS/FLI1* ген слияния, *TLS/FUS1* ген

15 слияния, *PAX3/FKHR* ген слияния, *AML1/ETO* ген слияния, альфа v-интегрин ген, ген рецептора *Flt-1*, *tubulin* ген, ген вируса папилломы человека, ген, необходимый для репликации вируса папилломы человека, ген вируса иммунодефицита человека, ген, необходимый для репликации вируса иммунодефицита человека, ген вируса гепатита А, ген, необходимый для репликации вируса гепатита А, ген вируса гепатита В, ген, необходимый

20 для репликации вируса гепатита В, ген вируса гепатита С, ген, необходимый для репликации вируса гепатита С, ген вируса гепатита D, ген, необходимый для репликации вируса гепатита D, ген вируса гепатита E, ген, необходимый для репликации вируса гепатита E, ген вируса гепатита F, ген, необходимый для репликации вируса гепатита F, ген вируса гепатита G, ген, необходимый для репликации вируса гепатита G, ген вируса гепатита H, ген,

25 необходимый для репликации вируса гепатита H, ген *Respiratory Syncytial Virus*, ген, необходимый для репликации *Respiratory Syncytial Virus*, ген *Herpes Simplex Virus*, ген, необходимый для репликации *Herpes Simplex Virus*, ген *herpes Cytomegalovirus*, ген, необходимый для репликации *herpes Cytomegalovirus*, ген *herpes Epstein Barr Virus*, ген, необходимый для репликации *herpes Epstein Barr Virus*, ген *Kaposi's Sarcoma-associated*

30 *Herpes Virus*, ген, необходимый для репликации *Kaposi's Sarcoma-associated Herpes Virus*, *JC Virus* ген, человеческий ген, необходимый для репликации *JC Virus*, *myxovirus* ген, ген,

необходимый для репликации *myxovirus*, *rhinovirus* ген, ген, необходимый для репликации *rhinovirus*, ген *coronavirus*, ген, необходимый для репликации *coronavirus*, ген *West Nile Virus*, ген, необходимый для репликации *West Nile Virus*, ген *St. Louis Encephalitis*, ген, необходимый для репликации *St. Louis Encephalitis*, ген *Tick-borne encephalitis virus*, ген, 5 необходимый для репликации *Tick-borne encephalitis virus*, ген *Murray Valley encephalitis virus*, ген, необходимый для репликации *Murray Valley encephalitis virus*, ген *dengue virus*, ген, необходимый для репликации *dengue virus* гена, *Simian Virus 40* ген, ген, необходимый для репликации *Simian Virus 40*, ген *Human T Cell Lymphotropic Virus*, ген, необходимый для репликации *Human T Cell Lymphotropic Virus*, ген *Moloney-Murine Leukemia Virus*, ген, 10 необходимый для репликации *Moloney-Murine Leukemia Virus*, ген *encephalomyocarditis virus*, ген, необходимый для репликации *encephalomyocarditis virus*, ген *measles virus*, ген, необходимый для репликации *measles virus*, ген *Varicella zoster virus*, ген, необходимый для репликации *Varicella zoster virus*, ген *adenovirus*, ген, необходимый для репликации *adenovirus*, ген вируса желтой лихорадки, ген, необходимый для репликации вируса желтой 15 лихорадки, ген *poliovirus*, ген, необходимый для репликации *poliovirus*, ген *poxvirus*, ген, необходимый для репликации *poxvirus*, ген *plasmodium*, ген, необходимый для репликации *plasmodium* гена, ген *Mycobacterium ulcerans*, ген, необходимый для репликации *Mycobacterium ulcerans*, ген *Mycobacterium tuberculosis*, ген, необходимый для репликации *Mycobacterium tuberculosis*, ген *Mycobacterium leprae*, ген, необходимый для репликации 20 *Mycobacterium leprae*, ген *Staphylococcus aureus*, ген, необходимый для репликации *Staphylococcus aureus*, ген *Streptococcus pneumoniae*, ген, необходимый для репликации *Streptococcus pneumoniae*, ген *Streptococcus pyogenes*, ген, необходимый для репликации *Streptococcus pyogenes*, ген *Chlamydia pneumoniae*, ген, необходимый для репликации *Chlamydia pneumoniae*, ген *Mycoplasma pneumoniae*, ген, необходимый для репликации 25 *Mycoplasma pneumoniae*, ген интегрина, ген селектина, ген системы комплемента, ген хемокина, ген рецептора хемокина, ген *GCSF*, ген *Gro1*, ген *Gro2*, ген *Gro3*, ген *PF4*, ген *MIG*, ген *Pro-Platelet Basic Protein*, ген *MIP-II*, ген *MIP-1J*, ген *RANTES*, ген *MCP-1*, ген *MCP-2*, ген *MCP-3*, ген *CMBKR1*, ген *CMBKR2*, ген *CMBKR3*, *CMBKR5v*, ген *AIF-1*, *I-309* ген, ген компонента ионного канала, ген рецептора нейротрансмиттера, ген нейромедиатора 30 лиганда, ген амилоидной семьи, ген *presenilin*, ген *HD*, ген *DRPLA*, ген *SCA1*, ген *SCA2*, ген

MJD1, ген *CACNL1A4*, ген *SCA7*, ген *SCA8*, аллельный ген, обнаруженный в клетках LON, или аллельный ген полиморфного гена.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

5 "Алкил" означает прямую или разветвленную цепь, нециклическую или циклическую, насыщенную алифатическим углеводородом, содержащую от 1 до 24 атомов углерода. Типичными представителями алкилов с насыщенной прямой цепью являются метил, этил, n-пропил, n-бутил, n-пентил, n-гексил, и им подобные, в то время как насыщенные разветвленные алкилы включают изопропил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, изопентил, и
10 им подобные. Типичные представители насыщенных циклических алкилов включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и им подобные; в то время как ненасыщенные циклические алкилы включают циклопентенил и циклогексенил, и им подобные.

"Алкенил" означает алкил, описанный выше, содержащий по меньшей мере одну
15 двойную связь между соседними атомами углерода. Алкенилы включают как цис-, так и транс-изомеры. Представители алкенилов с прямой цепью и разветвленные алкенилы включают этиленил, пропиленил, 1-бутенил, 2-бутенил, изобутиленил, 1-пентенил, 2-пентенил, 3-метил-1-бутенил, 2-метил-2-бутенил, 2,3-диметил-2-бутенил, и им подобные.

"Алкинил" означает любой алкил или алкенил описанный выше, который
20 дополнительно содержит по крайней мере одну тройную связь между смежными углеродными атомами. Представители алкинилов с прямой цепью и разветвленные алкинилы включают ацетиленил, пропинил, 1-бутинил, 2-бутинил, 1-пентинил, 2-пентинил, 3-метил-1-бутинил, и им подобные.

Термин "ацил" относится к водороду, алкилу, частично насыщенному или полностью
25 насыщенному циклоалкилу, частично насыщенному или полностью насыщенному гетероциклу, арилу, замещенному гетероарилу и карбонильным группам. Например, ацил включает в себя такие группы, как (C₁-C₂₀) алканоил (например, формил, ацетил, пропионил, бутирил, валерил, капроил, t-бутилацетил и т.д.), (C₃-C₂₀) циклоалкилкарбонил (например, циклопропилкарбонил, циклобутилкарбонил, циклопентилкарбонил, циклогексилкарбонил и
30 т.д.), гетероциклический карбонил (например, пирролидинилкарбонил, пирролид-2-один-5-карбонил, пиперидинилкарбонил, пиперазинилкарбонил, тетрагидрофуранилкарбонил и т.д.),

ароил (например, бензоил) и гетероароил (например, тиофенил-2-карбонил, тиофенил-3-карбонил, фуранил-2-карбонил, фуранил-3-карбонил, 1Н-пирроил-2-карбонил, 1Н-пирроил-3-карбонил, бензо[b]тиофенил-2-карбонил и др.).

5 Термин "арил" относится к ароматической моноциклической, бициклической, или трициклической кольцевой системе углеводородов, где любой кольцевой атом может быть замещен. Примеры арильных фрагментов включают, но не ограничиваясь, фенил, нафтил, антраценил, и пиренил.

"Гетероцикл" означает 5-7-членное моноциклическое, или 7-10-членное бициклическое, гетероциклическое кольцо, которое является либо насыщенным, 10 ненасыщенным, или ароматическим, и которое содержит от 1 или 2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и где гетероатомы азота и серы могут быть факультативно окислены, и гетероатом азота может быть факультативно кватернизован, включая бициклические кольца, в которых любой из вышеназванных гетероциклов слиты в бензольное кольцо. Гетероцикл может быть присоединен через любой гетероатом или атом 15 углерода. Гетероциклы включают гетероарилы как определено ниже. Гетероциклы включают морфолинил, пирролидинонил, пирролидинил, пиперидинил, пиперизинил, гидантоинил, валеролактамин, оксиранил, оксетанил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, тетрагидропиридинила, тетрагидропримидинил тетрагидротиофенил тетрагидротиопиранил, тетрагидропиримидинил, тетрагидротиофенил тетрагидротиопиранил и им подобные.

20 Термин "гетероарил" относится к ароматической 5-8 членной моноциклической, 8-12 членной бициклической, или 11-14 членной трициклической кольцевой системе, обладающей 1-3 гетероатомами, если эта система моноциклическая, 1-6 гетероатомами, если эта система бициклическая, или 1-9 гетероатомами, если эта система трициклическая, названные гетероатомы, отобраны из O, N или S (например, атомов углерода и 1-3, 1-6, или 1-9 25 гетероатомов N, O, или S, если система моноциклическая, бициклическая, или трициклическая, соответственно), где любой атом кольца может быть заменен. Группы гетероарила, описанные в данном документе, также могут содержать слившиеся кольца, которые совместно используют общие связи углерод-углерод. Термин "алкилгетероцикл" относится к гетероарилу, где по меньшей мере один из атомов кольца заменяется алкилом, 30 алкенилом или алкинилом.

Термин "замещенный" относится к замене одного или нескольких радикалов водорода в данной формуле на радикал указанного заместителя включающего, но не ограничиваясь: галоген, алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероцикл, тиол, алкилтио, оксо, тиокси, арилтио, алкилтиоалкил, арилтиоалкил, алкилсульфонил, алкилсульфонилалкил, арилсульфонилалкил, алкокси, арилокси, аралкокси, аминокарбонил, алкиламинокарбонил, ариламинокарбонил, алкоксикарбонил, арилоксикарбонил, галогеналкил, аминокислоты, трифторметил, циано, нитро, алкиламино, ариламино, алкиламиноалкил, ариламиноалкил, аминокислоты, трифторметил, циано, гидроксид, алкоксиалкил, карбоксиалкил, алкоксикарбонилалкил, аминокислоты, трифторметил, циано, аралкоксикарбонил, карбоновая кислота, сульфоновая кислота, сульфонил, фосфоновая кислота, арил, гетероарил, гетероциклические и алифатические радикалы. Понятно, что заместитель может быть в дальнейшем замещен. Типичные заместители включают амино, алкиламино, диалкиламино и циклические аминокислоты.

"Галоген" означает фтор, хлор, бром и йод.

Термины "алкиламин" и "диалкиламин" относятся к $-NH(алкил)$ и $-N(алкил)_2$ радикалам, соответственно.

Термин "алкилфосфат" относится к $-O-P(Q')(Q'')-O-R$, где Q' и Q'' являются каждый независимо O , S , $N(R)_2$, факультативно замещенный алкил или алкокси; и R — это факультативно замещенный алкил, ω -аминоалкил или ω -(замещенный)аминоалкил.

Термин "алкилфосфотриат" относится к алкилфосфату, в котором по меньшей мере один из Q' или Q'' является S .

Термин "алкилфосфонат" относится к алкилфосфату, в котором по меньшей мере один из Q' или Q'' является алкилом.

Термин "гидроксиалкил" означает $-O$ -алкильный радикал.

Термин "алкилгетероцикл" относится к алкилу, в котором по меньшей мере один метилен замещен гетероциклом.

Термин " ω -аминоалкил" относится к $-алкил-NH_2$ радикалу. И термин ω -(замещенный)аминоалкил относится к ω -аминоалкилу в котором по меньшей мере один из H на N замещен алкилом.

Термин " ω -фосфоалкил" относится к $-алкил-O-P(Q')(Q'')-O-R$, где Q' и Q'' являются каждый независимо O или S и R — это факультативно замещенный алкил.

Термин “ ω -тиофосфоалкил” относится к ω -фосфоалкилу где по меньшей мере один из Q’ или Q” является S.

В некоторых вариантах, способы изобретения могут потребовать использования защитных групп. Методология защитной группы хорошо известна специалистам в данной области техники (см., например, Защитные группы в органическом синтезе, Green, T.W. et al., Wiley-Interscience, New York City, 1999). Коротко, защитные группы в контексте данного изобретения являются любой группой, которая уменьшает или устраняет нежелательную реакционную способность функциональных групп. Защитная группа может быть добавлена в функциональную группу, чтобы замаскировать ее реактивность во время определенных реакций, а затем удалена, чтобы открыть оригинальные функциональные группы. В некоторых вариантах используется "спиртовая защитная группа". "Спиртовая защитная группа" — это любая группа, которая снижает или устраняет нежелательные реакционные способности спиртовых функциональных групп. Защитные группы могут быть добавлены и удалены с помощью способов, хорошо известных в данной области техники.

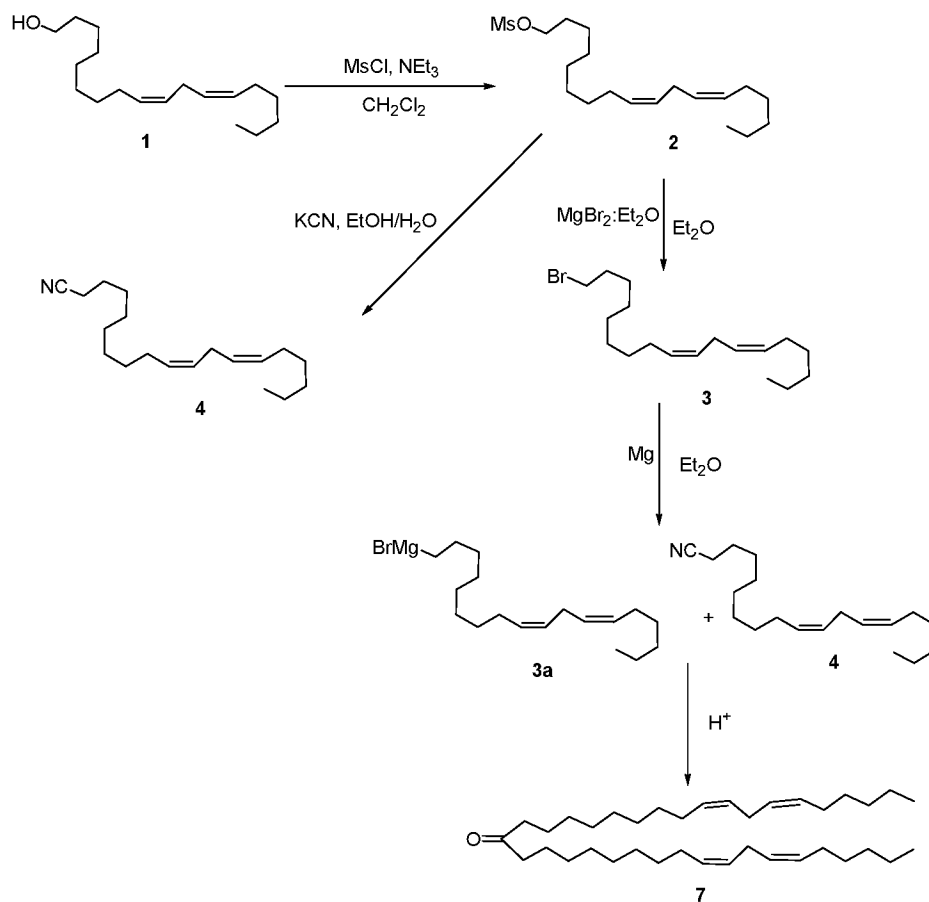
Соединения согласно настоящему изобретению могут быть получены путем известных органических способов синтеза, включая способы более подробно описанные в примерах.

ПРИМЕРЫ

20 Пример 1:

Синтез метилсульфоновой кислоты октадека-9,12-диэнил эфира 2

Схема 1



Триэтиламин (13,13 г, 130 ммоль) добавляют в спиртовой раствор 1 (26,6 г, 100 ммоль) в дихлорметане (100 мл); полученный раствор охлаждают на ледяной бане. В данный охлажденный раствор по каплям добавляют мезил хлорид (12,6 г, 110 ммоль) в дихлорметане (60 мл); после завершения добавления, реакционную смесь оставляют, чтобы она нагрелась до температуры окружающей среды и перемешивают в течении ночи. Тонкослойная хроматография (ТСХ) реакционной смеси отражает завершение реакции. Реакционную смесь разбавляют дихлорметаном (200 мл), промывают водой (200 мл), насыщенным NaHCO_3 (200 мл), соляным раствором (100 мл) и высушивают (NaSO_4). Органический слой концентрируют для получения неочищенного продукта, который очищают с помощью колоночной хроматографии (силикагель), используя 0-10% Et_2O в гексанах. Чистые фракции продукта смешивают и концентрируют с целью получения чистого продукта 2 в виде бесцветного масла (30,6 г, 89%). ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ = 5,42-5,21 (m, 4H), 4,20 (t, 2H), 3,06 (s, 3H), 2,79 (t, 2H), 2,19-2,00 (m, 4H), 1,90-1,70 (m, 2H), 1,06-1,18 (m, 18H), 0,88 (t, 3H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ = 130,76, 130,54, 128,6, 128,4, 70,67, 37,9, 32,05, 30,12, 29,87, 29,85, 29,68,

29,65, 29,53, 27,72, 27,71, 26,15, 25,94, 23,09, 14,60. МС. Расчетная молекулярная масса для $C_{19}H_{36}O_3S$ 344,53, Обнаруженная 343,52 (М-Н⁺).

Синтез 18-бром-октадека-6,9-диен 3

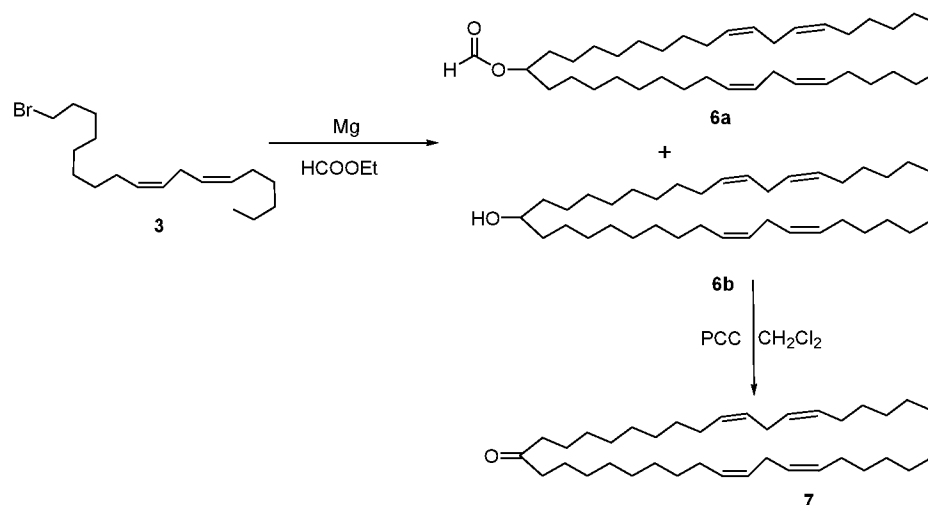
Мезилат 2 (13,44 г, 39 ммоль) растворяют в безводном эфире (500 мл), после чего к нему в среде аргона добавляют комплекс $MgBr \cdot Et_2O$ (30,7 г, 118 ммоль); данная смесь подвергается кипячению в среде аргона на протяжении 26 часов, после чего ТСХ отражает завершение реакции. Реакционную смесь разбавляют эфиром (200 мл) и добавляют в нее ледяную воду (200 мл), и разделяют слои. Органический слой промывают 1% водным раствором K_2CO_3 (100 мл), соляным раствором (100 мл) и высушивают (безводным Na_2SO_4). Концентрат органических слоев предоставляет источник неочищенного продукта, который затем очищают методом колоночной хроматографии (силикагель), используя 0-1% Et_2O в гексанах для выделения бромида 3 (12,6 г, 94%) в виде бесцветного масла. 1H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ = 5,41-5,29 (m, 4H), 4,20 (d, 2H), 3,40 (t, J = 7 Гц, 2H), 2,77 (t, J = 6,6 Гц, 2H), 2,09-2,02 (m, 4H), 1,88-1,00 (m, 2H), 1,46-1,27 (m, 18H), 0,88 (t, J = 3,9 Гц, 3H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$) δ = 130,41, 130,25, 128,26, 128,12, 34,17, 33,05, 31,75, 29,82, 29,57, 29,54, 29,39, 28,95, 28,38, 27,42, 27,40, 25,84, 22,79, 14,28.

Синтез 18-циан-октадека-6,9-диена 4

Раствор KCN (1,32 г, 20 ммоль) в воде (10 мл) добавляют в спиртовой раствор мезилата (3,44 г, 10 ммоль) в этаноле (90 мл) и кипятят полученную смесь в течении 30 мин, после чего ТСХ реакционной смеси отражает завершение реакции, после чего в реакционную смесь добавляют эфир (200 мл) с последующим добавлением воды. Реакционную смесь экстрагируют эфиром и комбинированные органические слои промывают водой (100 мл), соляным раствором (200 мл) и высушивают. Концентрат органического слоя обеспечивает источник неочищенного продукта, который затем очищают методом колоночной хроматографии (0-10% Et_2O в гексанах). Чистый продукт 4 выделяют в виде бесцветного масла. (2 г, 74%). 1H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ = 5,33-5,22 (m, 4H), 2,70 (t, 2H), 2,27-2,23 (m, 2H), 2,00-1,95 (m, 4H), 1,61-1,54 (m, 2H), 1,39-1,20 (m, 18H), 0,82 (t, 3H), ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$) δ = 130,20, 129,96, 128,08, 127,87, 119,78, 70,76, 66,02, 32,52, 29,82, 29,57, 29,33, 29,24, 29,19, 29,12, 28,73, 28,65, 27,20, 27,16, 25,62, 25,37, 22,56, 17,10, 14,06. МС. Расчетная молекулярная масса для $C_{19}H_{33}N$, 275,47, Обнаруженная 276,6 (М-Н⁺).

Синтез гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-один 7

- Свежеактивированную стружку Mg (0,144 г, 6 ммоль) добавляют в высушенную на огне колбу 500 мл 2NRB, оборудованную магнитной мешалкой и обратным конденсатором (рефлюкс-конденсатором). Данную установку дегазируют, промывают аргоном, после чего в колбу добавляют с помощью шприца 10 мл безводного эфира. Бромид **3** (1,65 г, 5 ммоль) растворяют в безводном эфире (10 мл) и добавляют в колбу капельно с помощью шприца. Регистрируют экзотермическую реакцию (для подтверждения / ускорения формирования реактива Гриньяра добавляют 2 мг йода, после чего наблюдают немедленное обесцвечивание, которое подтверждает формирование реактива Гриньяра) и эфир начинает кипеть. После завершения добавления реакционную смесь выдерживают при температуре 35 °C в течение 1 часа и затем охлаждают на ледяной бане. Цианид **4** (1,38 г, 5 ммоль) растворяют в безводном эфире (20 мл) и, помешивая, добавляют капельно в реакционную смесь. Наблюдают экзотермическую реакцию, и реакционную смесь перемешивают в течение ночи при комнатной температуре. Реакцию гасят добавлением по каплям 10 мл ацетона, после чего добавляют ледяную воду (60 мл). Реакционную смесь обрабатывают водной H₂SO₄ (10% по объему, 200 мл) до тех пор, пока раствор не станет однородным, и слои разделяют. Водную фазу экстрагируют эфиром (2x100 мл). Смешанные эфирные слои высушивают (Na₂SO₄) и концентрируют для получения неочищенного продукта, который очищают с помощью колоночной (силикагель, 0-10% эфира в гексанах) хроматографии. Фракции очищенного продукта выпаривают для получения чистого кетона **7** в виде бесцветного масла (2 г, 74%).
- ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц) δ = 5,33-5,21 (м, 8H), 2,69 (t, 4H), 2,30 (t, 4H), 2,05-1,95 (м, 8H), 1,55-1,45 (м, 2H), 1,35-1,15 (м, 18H), 0,82 (t, 3H). ¹³C ЯМР (CDCl₃) δ = 211,90, 130,63, 130,54, 128,47, 128,41, 43,27, 33,04, 32,01, 30,93, 29,89, 29,86, 29,75, 29,74, 27,69, 26,11, 24,35, 23,06, 14,05. МС. Расчетная молекулярная масса для C₃₇H₆₆O, 526,92, Обнаруженная 528,02 (M+H⁺).
- Пример 2: Альтернативный синтез кетона 7**



Синтез соединения 6b

Свеже активированную стружку Mg (2,4 г, 6 ммоль) добавляют в высушенную на огне RB колбу объемом 500 мл, оборудованную магнитной мешалкой, капельной воронкой и обратным конденсатором (рефлюкс-конденсатором). Данную установку дегазируют, промывают аргоном, после чего в колбу добавляют с помощью шприца 10 мл безводного эфира. Бромид **3** (26,5 г, 80,47 ммоль) растворяют в безводном эфире (50 мл) и добавляют в капельную воронку. Около 5 мл указанного эфирного раствора добавляют в магниевую стружку, энергично размешивая. Отмечают экзотермическую реакцию (для подтверждения / ускорения формирования реактива Гриньяра, добавляют 5 мг йода, после чего наблюдают немедленное обесцвечивание, которое подтверждает формирование реактива Гриньяра) и эфир начинает кипеть. Оставшийся раствор бромиды добавляют по каплям, в то время, как поддерживают реакцию в условиях мягкой дефлегмации, охлаждая колбу в воде. По завершению добавления, реакционную смесь выдерживают при температуре 35°C в течение 1 часа и после чего охлаждают на ледяной бане. Этилформиат (2,68 г, 36,2 ммоль) растворяют в безводном эфире (40 мл), перемещают в капельную воронку и, помешивая, добавляют по каплям в реакционную смесь. Наблюдают экзотермическую реакцию и реакционная смесь начинает кипеть. После начала реакции оставшийся эфирный раствор формиата быстро струйно добавляют и перемешивают реакционную смесь в течение часа при комнатной температуре. Реакцию гасят капельным добавлением 10 мл ацетона, после чего добавляют ледяную воду (60 мл). Реакционную смесь обрабатывают водным раствором H₂SO₄ (10% по объему, 300 мл) до тех пор, пока раствор не становится однородным, после чего слои разделяют. Водную фазу экстрагируют эфиром (2x100 мл). Смешанные эфирные

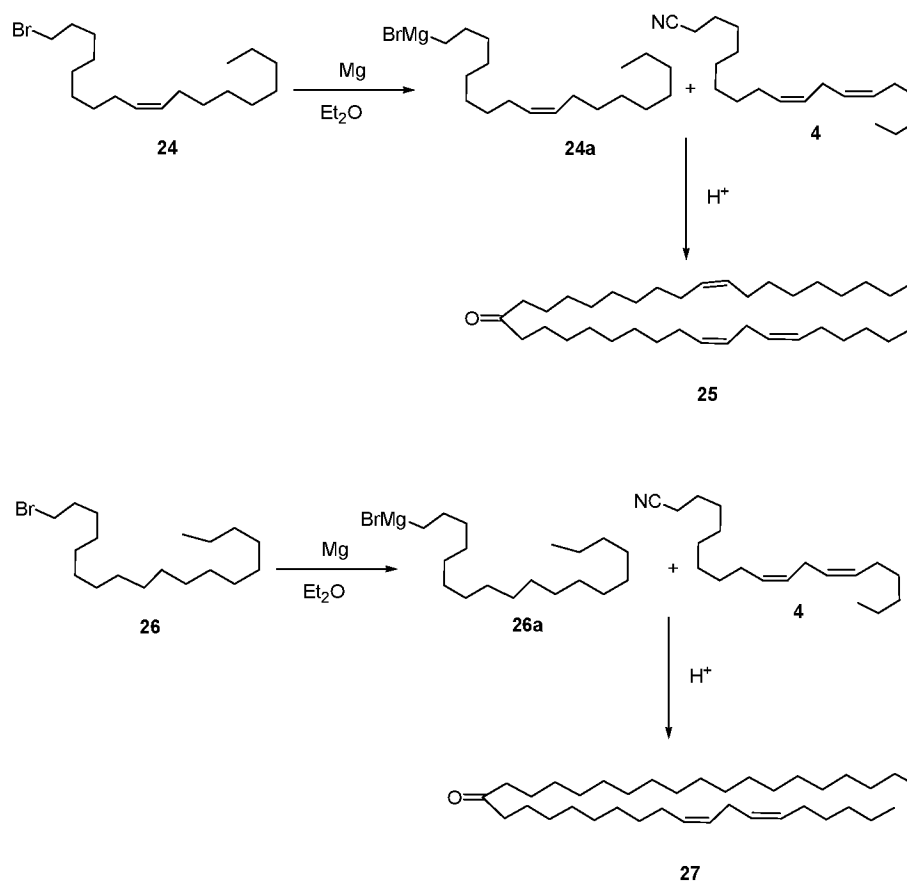
слои высушивают (Na_2SO_4) и концентрируют для получения неочищенного продукта, который очищают с помощью колоночной (силикагель, 0-10% эфира в гексанах) хроматографии. Слегка менее поляризованные фракции концентрируют для получения формиата **6a** (1,9 г), фракции очищенного продукта выпаривают для получения чистого продукта **6b** в виде бесцветного масла (14,6 г, 78%).

Синтез соединения 7

Свеже активированные 4А молекулярные сита (50 г) добавляют в спиртовой раствор **6b** (3 г, 5,68 ммоль) в CH_2Cl_2 (60 мл); в данный раствор в течении 20 минут добавляют измельченный в порошок осажденный карбонат кальция (ОКК) (4,9 г, 22,7 ммоль), после чего смесь перемешивают в течение 1 часа (**Примечание:** необходимо внимательное наблюдение за реакцией для получения хорошего результата, так как затягивание времени реакции приводит к ухудшению конечного результата) и ТСХ реакционной смеси следует каждые 10 минут (5% эфира в гексанах). После завершения реакции реакционную смесь фильтруют через слой силикагеля и остаток промывают CH_2Cl_2 (400 мл). Фильтрат концентрируют и полученный таким образом неочищенный продукт в дальнейшем очищают с помощью колоночной хроматографии (силикагель, 1% Et_2O в гексанах) для выделения чистого продукта **7** (2,9 г, 97%) в виде бесцветного масла. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ = 5,33-5,21 (м, 8H), 2,69 (t, 4H), 2,30 (t, 4H), 2,05-1,95 (м, 8H), 1,55-1,45 (м, 2H), 1,35-1,15 (м, 18H), 0,82 (t, 3H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ = 211,90, 130,63, 130,54, 128,47, 128,41, 43,27, 33,04, 32,01, 30,93, 29,89, 29,86, 29,75, 29,74, 27,69, 26,11, 24,35, 23,06, 14,05. МС. Расчетная молекулярная масса для $\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}$, 526,92, Обнаруженная 528,02 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Пример 3: Синтез асимметричных кетонов **25** и **27**.

Схема 3



Синтез гептатриаконта-6,9,28-триен-19-один **25**

Свеже активированную стружку Mg (132 мг, 0,0054 моль) добавляют в сухую колбу 50 мл 2NRB, оборудованную магнитной мешалкой и обратным конденсатором (рефлюкс-конденсатором). Данную установку дегазируют, промывают азотом, и добавляют в колбу с помощью шприца 10 мл безводного эфира. Бромид **24** (1,8 г, 0,0054 моль) растворяют в безводном эфире (10 мл) и добавляют в колбу капельно с помощью шприца. Отмечают экзотермическую реакцию (реакцию инициирует дибромэтан) и эфир начинает кипеть. После завершения добавления реакционную смесь выдерживают при температуре 35⁰С в течение 1 часа и затем охлаждают на ледяной бане до 10-15⁰С. Цианид **4** (0,5 г, 0,0018 моль) растворяют в сухом ТГФ (5 мл) и, помешивая, добавляют капельно в реакционную смесь. Наблюдают экзотермическую реакцию; реакционная смесь кипит (при 70⁰С) в течение 12 часов и реакцию гасят раствором хлорида аммония. Затем обрабатывают 25% раствором HCl до тех пор, пока раствор не становится однородным, после чего слои разделяют. Водную фазу экстрагируют эфиром. Смешанные эфирные слои высушивают и концентрируют для получения неочищенного продукта, который затем очищают с помощью колоночной

хроматографии. Фракции очищенного продукта выпаривают для получения чистого кетона **25** в виде бесцветного масла.

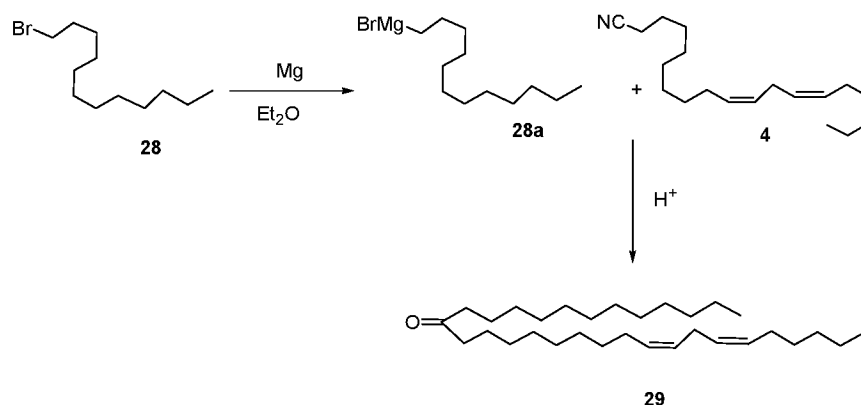
Выход: 0,230 г (24%). ^1H -ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): δ = 5,37-5,30 (м, 6H), 2,77-2,74 (t, 2H), 2,38-2,34 (t, 4H), 2,05-1,95 (м, 8H), 1,56-1,52 (м, 4H), 1,35-1,25 (м, алифатические протоны), 0,89-0,85 (t, 6H). ИК (cm^{-1}): 2924, 2854, 1717, 1465, 1049, 721.

Синтез гептатриаконта-6,9-диен-19-один **27**

Свеже активированную стружку Mg (0,144 г, 6 ммоль) добавляют в высушенную на огне 2NRB колбу объемом 500 мл, оборудованную магнитной мешалкой и обратным конденсатором (рефлюкс-конденсатором). Данную установку дегазируют, промывают аргоном, после чего в колбу добавляют с помощью шприца 10 мл безводного эфира. Коммерчески доступный бромид **26** (2,65 г, 5 ммоль) растворяют в безводном эфире (10 мл) и добавляют в колбу по каплям с помощью шприца. После окончания добавления, реакционную смесь выдерживают при температуре 35°C в течение 1 часа и затем охлаждают на ледяной бане. Цианид **4** (1,38 г, 5 ммоль) растворяют в безводном эфире (20 мл) и, помешивая, добавляют по каплям в реакционную смесь. Наблюдается экзотермическая реакция; и реакционную смесь перемешивают в течении ночи при комнатной температуре. Реакцию гасят добавлением 10 мл ацетона по каплям, после чего добавляют ледяную воду (60 мл). Реакционную смесь обрабатывают водным раствором H_2SO_4 (10 % по объему; 200 мл) до тех пор, пока раствор не становится однородным, после чего слои разделяют. Водную фазу экстрагируют эфиром (2x100 мл). Смешанные эфирные слои высушивают (Na_2SO_4) и концентрируют для получения неочищенного продукта, который затем очищают с помощью колоночной хроматографии для получения очищенного кетона **27** в виде бесцветного масла. ^1H -ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): δ = 5,42-5,30 (м, 4H), 2,79-2,78 (t, 2H), 2,40-2,37 (t, 4H), 2,08-2,03 (м, 4H), 1,58-1,54 (м, 4H), 1,36-1,26 (br m, алифатические протоны), 0,91-0,87 (t, 6H). ИК (cm^{-1}): 2924, 2854, 1716, 1465, 1375, 721.

Пример 4: Синтез асимметричных кетонов с C_{12} цепью.

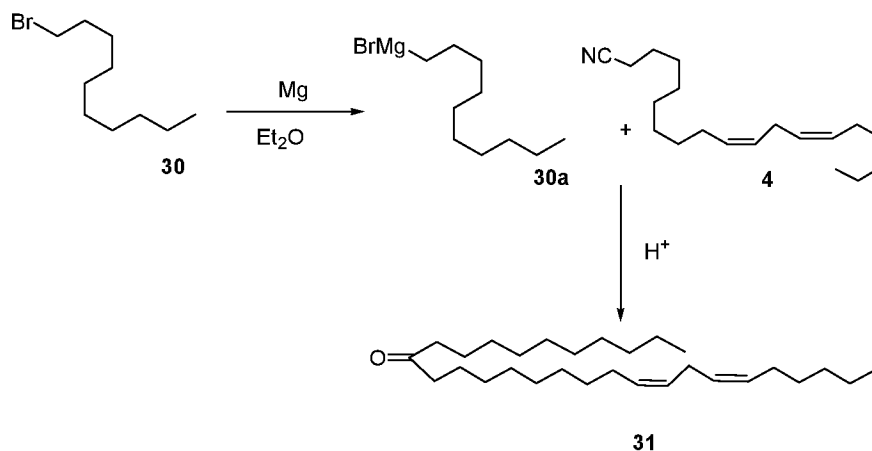
30 Схема 4



Свеже активированную стружку Mg (175 мг, 0,0072 моль) добавляют в сухую 2NRB колбу 50 мл, оборудованную магнитной мешалкой и обратным конденсатором (рефлюкс-конденсатором). Данную установку дегазируют, промывают азотом, и добавляют в колбу 10 мл безводного эфира с помощью шприца. Бромид **28** (1,5 г, 0,006 моль) растворяют в безводном эфире (7 мл) и добавляют в колбу по каплям с помощью шприца. Отмечают экзотермическую реакцию (реакцию инициирует дибромэтан) и эфир начинает кипеть. После окончания добавления, реакцию смесь выдерживают при температуре 35⁰ С в течение 1 часа и затем охлаждают на ледяной бане до 10-15⁰ С. Цианид **4** (1 г, 0,0036 моль) растворяют в безводном эфире (7 мл) и, помешивая, добавляют капельно в реакционную смесь. Наблюдают экзотермическую реакцию; реакционную смесь кипятят в течение 12 часов и гасят раствором хлорида аммония. Затем смесь обрабатывают 25% раствором HCl до тех пор, пока раствор не становится однородным, после чего слои разделяют. Водную фазу экстрагируют эфиром. Смешанные эфирные слои высушивают и концентрируют для получения неочищенного продукта, который затем очищают с помощью колоночной хроматографии. Фракции чистого продукта выпаривают для получения чистого кетона **29** в виде бесцветного масла. Выход: 0,65 г (26%). ¹H-ЯМР (δ частиц на миллион): 5,388-5,302 (м, 4Н), 2,77 – 2,74 (t, 2Н), 2,38 – 2,34 (t, 4Н), 2,04-2,01 (м, 4Н), 1,34 – 1,18 (м, 36Н), 0,89 – 0,85 (м 6Н). ИК (см⁻¹): 3009, 2920, 2851, 1711 (C=O), 1466, 1376, 1261.

Пример 5: Синтез асимметричных кетонов с C10 цепью **31**

Схема 5



Свеже активированную стружку Mg (266 мг, 0,0109 моль) добавляют в сухую 2NRB колбу объемом 50 мл, оборудованную магнитной мешалкой и обратным конденсатором (рефлюкс-конденсатором). Данную установку дегазируют, промывают азотом, после чего

5 добавляют в колбу с помощью шприца 10 мл безводного эфира. Бромид (2,43 г, 0,0109 моль) растворяют в безводном эфире (7 мл) и добавляют в колбу по каплям с помощью шприца. Отмечают экзотермическую реакцию (реакцию инициирует дибромэтан) и эфир начинает кипеть. После окончания добавления, реакционную смесь выдерживают при температуре 35⁰C в течение 1 часа и затем охлаждают на ледяной бане до 10-15⁰C. Цианид (1 г,

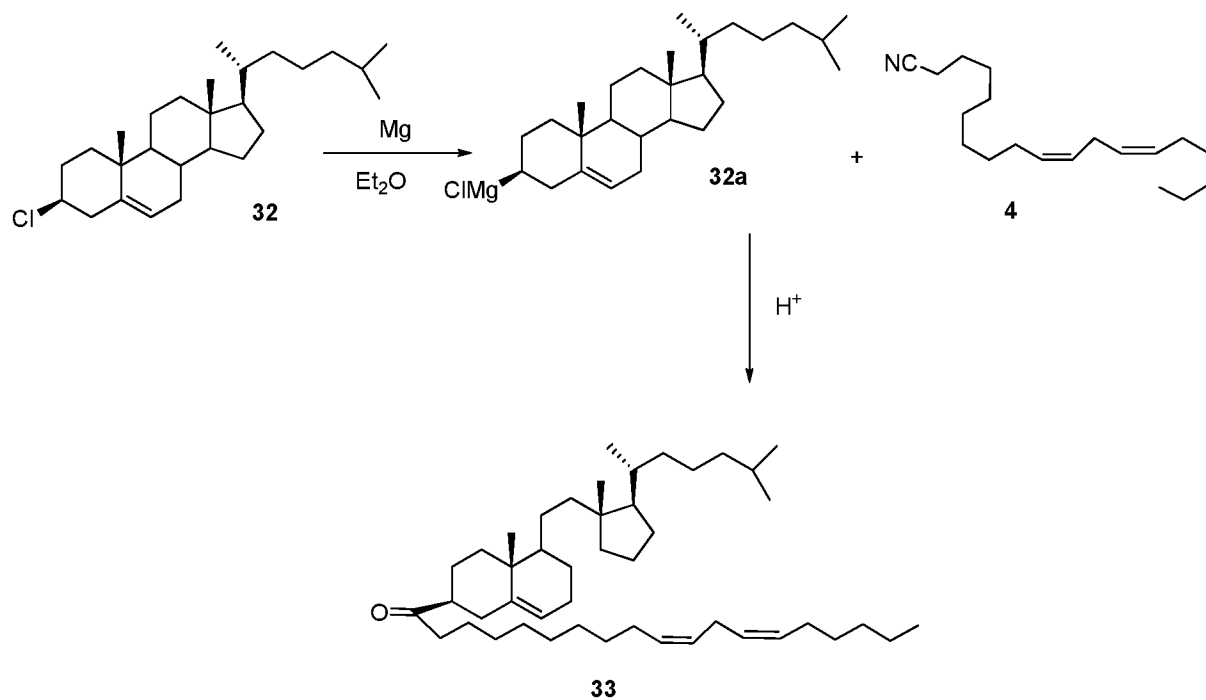
10 0,0036 моль) растворяют в безводном эфире (7 мл) и, помешивая, добавляют по каплям в реакционную смесь. Наблюдают экзотермическую реакцию; и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течении 2 часов. ТГФ (4 мл) добавляют в реакционную смесь и нагревают до 45-50⁰C в течении 4 часов до полного расходования цианистых производных. Реакцию гасят добавлением по каплям 3 мл ацетона, после чего

15 добавляют ледяную воду. Реакционную смесь обрабатывают 25% раствором HCl до тех, пока раствор не становится однородным, после чего слои разделяют. Водную фазу экстрагируют эфиром. Смешанные эфирные слои высушивают и концентрируют для получения неочищенного продукта, который затем очищают с помощью колоночной хроматографии. Фракции чистого продукта выпаривают для получения чистого кетона в виде бесцветного

20 масла. Выход: 0,93 г MC (61%). ¹H-ЯМР (δ частиц на миллион): 5,37-5,302 (м, 4H), 2,77 – 2,74 (t, 2H), 2,38 – 2,34 (t, 4H), 2,05-2,00 (м, 4H), 1,55 – 1,52 (м, 2H), 1,35 – 1,24 (м, 34H), 0,89 – 0,84 (м 6H). ИК (см⁻¹): 3009, 2925, 2854, 1717 (C=O), 1465, 1376.

Пример 6: Синтез асимметричных кетонов с холестерином 33

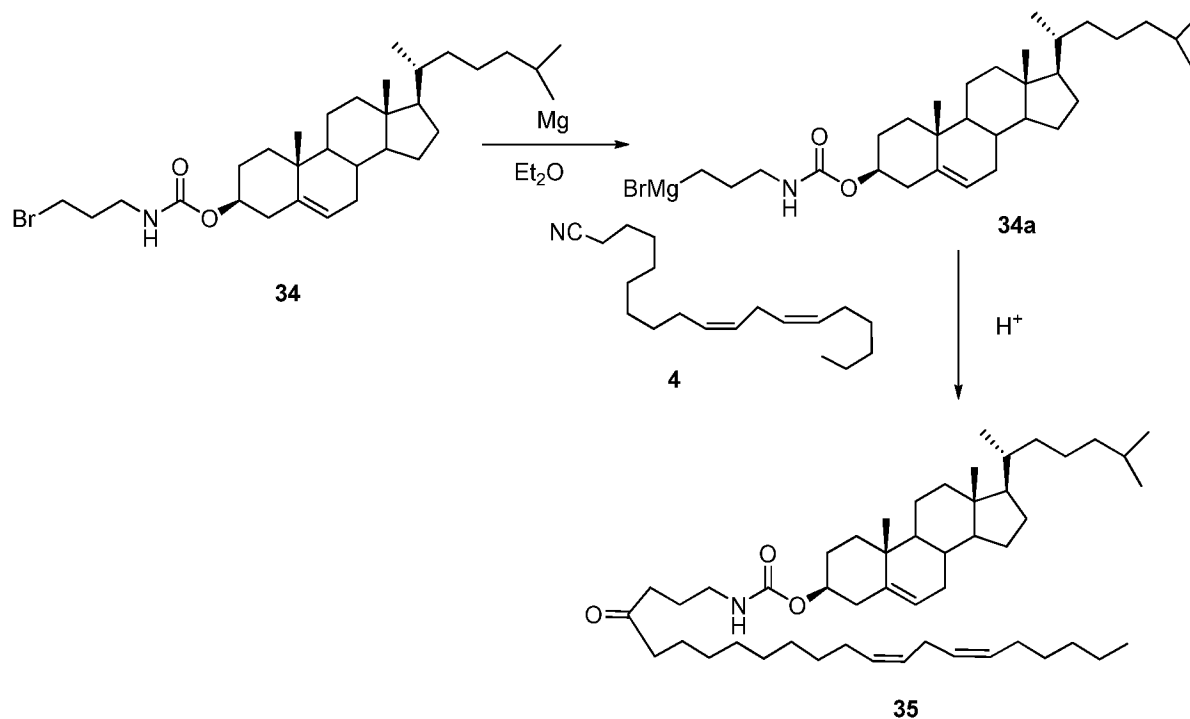
Схема 6



Используя процедуру, аналогичную той, которая используется для синтеза кетона **31**; холестерина хлорид в пересчете на соответствующее количество хлорида магния с
 5 последующим добавлением линолеата цианида, обеспечивает кетон **33**.

Пример 7: Синтез асимметричных кетонов с холестерином 35

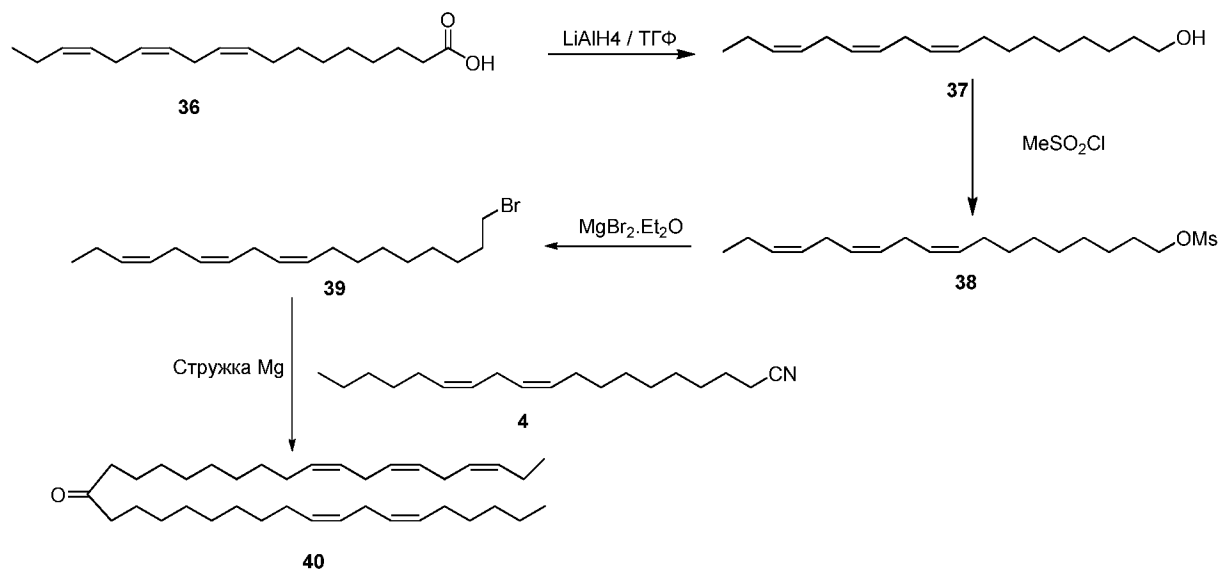
Схема 7



- 5 Обработка холестеролхлороформиата 3-бромопропиламином; предоставляет бромид **34**, который превращается в соответственный реактив Гриньяра **34a**, который, при обработке линолеил цианидом, обеспечивает соответствующий асимметричный кетон **35** в хорошем выходе.

10 Пример 8: Синтез асимметричного кетона 40

Схема 8



Синтез соединения 37

Безводный ТГФ (20 мл) в атмосфере азота добавляют при комнатной температуре в двух-горлышковую круглодонную колбу объемом 500 мл, содержащую LiAlH_4 (1,02 г, 0,0269 моль). Суспензию перемешивают в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем охлаждают до 0°C . Раствор соединения 1 (5 г, 0,01798 моль) в безводном ТГФ (50 мл) медленно добавляют в данную смесь, поддерживая при этом внутреннюю температуру 0°C . После окончания добавления, реакционную смесь нагревают до температуры окружающей среды и перемешивают в течение 1 часа. Прогресс реакции контролируют методом ТСХ. По завершению реакции, смесь охлаждают до 0°C и гасят насыщенным водным раствором Na_2SO_4 . Реакционную смесь перемешивают в течение 30 минут и фильтруют твердый осадок через целитовый слой и промывают этилацетатом (100 мл). Фильтрат и промывной материал смешивают и выпаривают в роторном испарителе для получения соединения 37 в виде бесцветной жидкости, которая используется в таком виде для следующей стадии без какой-либо очистки. Выход: (4,5 г, 95%); ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) $\delta = 5,39\text{--}5,28$ (м, 6H), 3,64–3,61 (т, 2H), 2,81–2,78 (т, 4H), 2,10–2,01 (м, 4H), 1,59–1,51 (м, 2H), 1,29–1,22 (м, алифатические протоны), 0,98–0,94 (т, 3H).

Синтез соединения 38

Соединение 37 (14 г, 0,0530 моль) растворяют в ДХМ (300 мл) в двух-горлышковой круглодонной колбе объемом 500 мл и охлаждают до 0°C . Триэтиламин (29,5 мл, 0,2121 моль) медленно добавляют в инертной атмосфере в данный раствор. Затем

реакционную смесь перемешивают в течение 10-15 минут и медленно добавляют мезила хлорид (6,17 мл; 0,0795 моль). После окончания добавления, реакционную смесь нагревают до температуры окружающей среды и перемешивают в течение 20 ч. Реакцию контролируют методом ТСХ. После завершения, реакционную смесь разбавляют водой (200 мл),
 5 перемешивают в течение нескольких минут, и отделяют органический слой. Далее органическую фазу промывают соляным раствором (1 x 70 мл), высушивают Na_2SO_4 ; растворитель удаляют в роторном испарителе для получения неочищенного соединения **38** в виде коричневого масла, которое используется в таком виде для следующей реакции. Выход: (17 г, 93 %) ^1H ЯМР (400МГц, CDCl_3) δ = 5,39-5,31 (м, 6H), 4,22-4,19 (т, 2H), 2,99 (с, 3H),
 10 2,81-2,78 (м, 4H), 2,08-2,01 (м, 4H), 1,75-1,69 (м, 2H), 1,39-1,29 (м, алифатические протоны), 0,98-0,94 (т, 3H).

Синтез соединения 39

Мезилат **38** (10 г, 0,2923 моль) растворяют в безводном эфире (300 мл) в двух-горлышковой круглодонной колбе объемом 1000 мл; и добавляют комплекс $\text{MgBr}_2\text{Et}_2\text{O}$ (22,63 г, 0,0877 моль)
 15 в среде азота. Полученную смесь нагревают до кипения в течение 26 ч. После завершения реакции (по ТСХ), реакционную смесь разбавляют эфиром (300 мл) и ледяной водой (200 мл); эфирный слой отделяют. Органический слой промывают 1% водным раствором K_2CO_3 (100 мл), а затем соляным раствором (80 мл). После чего органическую фазу высушивают безводным Na_2SO_4 ; растворитель выпаривают в вакууме для получения
 20 неочищенного материала, который хроматографируют с помощью силикагеля (60-120 меш), используя 0-1% этилацетат в гексане в качестве элюирующей (извлекающей) системы для получения необходимого соединения **39** в виде масла. Выход: (7 г, 73 %) ^1H ЯМР (400МГц, CDCl_3) δ = 5,39-5,31 (м, 6H), 3,41-3,37 (т, 2H), 2,81-2,78 (м, 4H), 2,08-2,02 (м, 4H), 1,86-1,80 (м, 2H), 1,42-1,29 (м, алифатические протоны), 0,98-0,94 (т, 3H).

25 Синтез асимметричного кетона 40

Свеже активированную стружку Mg (0,88 г, 0,03636 моль) добавляют в высушенную на пламени 2-х горлышковую круглодонную колбу объемом 500 мл, оборудованную магнитной мешалкой и обратным конденсатором. Данную установку дегазируют, промывают аргоном, после чего в колбу добавляют 150 мл эфира. Несколько капель соединения брома **4**
 30 (11,89 г, 0,03636 моль) в 50 мл эфира добавляют в начале для инициации реакции (*обратить внимание: каталитическое количество 1,2-дибромозтана также добавляют для ускорения*

формирования реактива Гриньяра). После инициации оставшийся раствор соединения брома медленно добавляют в кипящий эфирный раствор. После полного добавления, реакционную смесь кипятят при температуре 40°C в течение 1,5 часа. Затем охлаждают до 10°C и добавляют по каплям линолеил цианид **4** (5 г, 0,01818 моль) в 30 мл сухого эфира, и полученную смесь нагревают до кипения на протяжении 20 часов при температуре 40°C. Развитие реакции контролируют методом ТСХ. После полного потребления производных цианида **40** (в соответствии ТСХ), полученную смесь охлаждают до комнатной температуры и гасят 30 мл ацетона, а затем 50 мл ледяной воды. Далее указанный раствор подкисляют 10% раствором соляной кислоты и отделяют эфирный слой. Водную фазу экстрагируют диэтиловым эфиром (2 x 100 мл). Высушивают безводным Na₂SO₄, удаляют растворитель, и получают неочищенный (сырьевой) кетон, который очищают колоночной хроматографией с силикагелем (100-200 меш), используя 0-5% эфир в гексане в качестве элюирующей системы, для получения названного соединения **40** в виде бледно-желтого масла. Выход: (4,8 г, 50,5%) ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ = 5,38-5,28 (м, 10H), 2,80-2,74 (м, 6H), 2,38-2,34 (t, 4H), 2,08-2,00 (м, 8H), 1,55-1,52 (м, 4H), 1,35-1,26 (м, алифатические протоны), 0,98-0,94 (t, 3H), 0,89-0,85 (t, 3H). ВЭЖХ- 98,04%.

Пример 9: синтез олигонуклеотидов

Все олигонуклеотиды синтезируют в АКТА-олигопилот синтезаторе. Для синтеза олигонуклеотидов используют коммерчески доступный контролируемый пористый стеклянный твердый носитель (dT-CPG, 500Å, Prime Synthesis) и РНК фосфорамидиты со стандартными защитными группами, 5'-О-диметокситритил N6-бензоил-2'-t-бутилдиметилсилил-аденозин-3'-О-N, N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфорамидит, 5'-О-диметокситритил N4-ацетил-2'-t-бутилдиметилсилил-аденозин-3'-О-N, N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфорамидит, 5'-О-диметокситритил N2 - изобутирил-2'-t-бутилдиметилсилил-аденозин-3'-О-N, N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфорамидит, и 5'-О-диметокситритил -2'-t-бутилдиметилсилил-аденозин-3'-О-N, N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфорамидит (*Pierce Nucleic Acids Technologies*). 2'-F фосфорамидиты, 5'-О-диметокситритил-N4-ацетил-2'-фторцитидин-3'-О-N, N'-диизопропил-2-цианоэтил-фосфорамидит и 5'-О-диметокситритил-2'-фтор-уридин-3'-О, N, N'-диизопропил-2-цианоэтил-фосфорамидит закупают у производителя

(Promega). Все фосфорамидиты используют в концентрации 0,2 М в ацетонитриле (CH_3CN), за исключением гуанозина, который был использован в концентрации 0,2 М в 10% ТГФ/КНС (объемное содержание). Применяют время связывания/переработки 16 минут. В качестве активатора используют 5-этил тиотетразол (0,75 М, *American International Chemicals*), для РО-окисления используют йод/вода/пиридин и для PS-окисления используют PADS (2%) в 2,6-лутидин/КНС (в объемном соотношении 1:1).

3'-лиганд конъюгированные цепи синтезируют с использованием твердого носителя, содержащего соответствующий лиганд. Например, введение единицы холестерина в последовательность выполняют, из гидроксипролинол-холестерина фосфорамидиат.

- 10 Холестерин привязывают к транс-4- гидроксипролинолу посредством 6-аминогексаноатной связи для получения гидроксипролинол-холестериновой части. 5'-Су-3 и Су-5.5 (фторофор) меченной миРНК, синтезированной из соответствующего Квазар-570 (Су-3) фосфорамидита, который закупают у *Biosearch Technologies*. Конъюгацию лигандов к 5'-концу и/или внутреннему положению достигают путем использования соответствующим образом
- 15 защищённого лиганд-фосфорамидит строительного блока. Соединение в течении 15-минут 0,1 М раствора фосфорамидита в безводном CH_3CN в присутствии 5-(этилтио)-1Н-тетразола активатора к твердой связи олигонуклеотида. Окисление межнуклеотидного фосфита в фосфат проводят с использованием стандартного водного раствора йода, как сообщалось (1), или путем обработки терт-бутил-гидропероксида / ацетонитрила / воды (10 : 87 : 3) с 10
- 20 минутным периодом ожидания окисления конъюгированного олигонуклеотида. Фосфоротиоат вводят при окислении фосфита до фосфоротиоата с помощью серного трансфер реагента, такого как КДТТ (закупают у AM Chemicals), PADS и/или Beaucage реагент. Холестерола фосфорамидит синтезируют в фирме, и используют в концентрации 0,1 М в дихлорметане. Время связывания для холестерина фосфорамидита составляет 16
- 25 минут.

- После завершения синтеза, носитель перемещают в стеклянный бутыль емкостью 100 мл (VWR). Олигонуклеотид отщепляют от поддержки с одновременным снятием защиты оснований и фосфатных групп с 80 мл спиртовой смеси аммиака [аммиак : этанол (3:1)] на протяжении 6,5 часов при температуре 55°C. Бутыль кратковременно охлаждают во льду, а
- 30 затем спиртовую смесь аммиака отфильтровывают в новый бутыль объемом 250 мл. СРГ промывают дважды смесью этанола/воды 40 мл (в соотношении 1:1 по объему). Объем смеси

уменьшают приблизительно до 30 мл на роторном испарителе. Затем смесь замораживают и высушивают в вакууме на скоростном испарителе.

Высушенный осадок ресуспендируют в 26 мл триэтиламина, триэтиламина тригидрофторида (ТЭА 3-ГФ) либо пиридин-НФ и ДМСО (3 : 4 : 6) и нагревают при температуре 60° С в течение 90 минут, чтобы удалить *терт*-бутилдиметилсилил (ТБДМС) группы во 2-й позиции. Затем реакционную смесь гасят с помощью 50 мл 20 мМ ацетата натрия; доводят уровень pH до 6,5; и хранят в морозильнике до очистки.

Олигонуклеотиды исследуют методом жидкостной хроматографии с высоким разрешением (ВЭЖХ) перед очисткой, и отбор буфера и столбцов зависят от природы последовательности и/или конъюгированных лигандов.

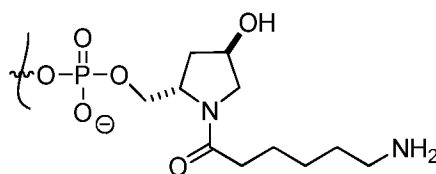
Лиганд-конъюгированные олигонуклеотиды очищают обратно-фазовой подготовительной ВЭЖХ. Неконъюгированные олигонуклеотиды очищают анион-обменной ВЭЖХ на TSK гелевой (полистерольный гель) колонке, упакованной в отделении. В качестве буферов используют 20 мМ фосфата натрия (pH 8,5) в 10% CH₃CN (буфер А) и 20 мМ фосфата натрия (pH 8,5) в 10% CH₃ CN, 1М NaBr (буфер В). Фракции, содержащие полномерные олигонуклеотиды, объединяют, обессоливают и лиофилизируют. Примерно 0,15 OD из обессоленных олигонуклеотидов разводят в воде до 150 мл, а затем переносят пипеткой в специальные емкости для КГЭ и ЖХ/МС анализов. Соединения окончательно анализируют с помощью ЖХ-ЭСМС и КГЭ.

Для приготовления миРНК, эквимольные количества смысловых и антисмысловых цепей нагревают в 1xPBS при 95°С в течение 5 минут и медленно охлаждают до комнатной температуры. Целостность дуплексов подтверждают с помощью ВЭЖХ анализа.

Таблица 7. двойные спирали миРНК для Luc и FVII мишеней.

Дуплекс	Смысловые / Антисмысловые	Последовательность 5'-3 '	Идентификационный № последовательности:	Мишень
	1000/2434	CUU ACG CUG AGU ACU UCG AdTdT U*CG AAG fUAC UCA GCG fUAA GdT*dT		Luc
	2433/1001	C*UfU ACG CUG AGfU ACU UCG AdT*dT		Luc

		UCG AAG UAC UCA GCG UAA GdTdT		
	2433/2434	C*UfU ACG CUG AGfU ACU UCG AdT*dT U*CG AAG fUAC UCA GCG fUAA GdT*dT		Luc
	1000/1001	CUU ACG CUG AGU ACU UCG AdTdT UCG AAG UAC UCA GCG UAA GdTdT		Luc
AD-1596		GGAUCAUCUCAAGUCUUACdTdT GUAAGACUUGAGAUGAUCCdTdT		FVII
AD-1661		GGAfUfCAfUfCfUfCAAGfUfCfUfUAfCdTsdT GfUAAGAfCfUfUGAGAfUGAfUfCfCdT*dT		FVII



Примечание: L8 является метил модифицированным нуклеотидом, * является фосфоротиоатными скелетными соединениями, fN является — 2'-фтор нуклеотидом, dN является — 2'-дезоксинуклеотидом.

5

Пример 10: Химический анализ сывороточной стабильности для миРНК

Химический анализ пропускной способности среды для исходной селекции стабильности основанной на последовательности оснований проводят методом “stains all”. Для выполнения химического анализа, дуплекс миРНК инкубируют в 90% человеческой сыворотке при температуре 37° С. Образцы реакционной смеси гасят в различные точки времени (на 0-й минуте, 15-й, 30-й, 60-й, 120-й и 240-й минутах) и производят анализ методом электрофореза (Фигура. 1). Расщепление РНК во время проведения теста дает информацию о восприимчивости дуплекса миРНК к разрушению сывороточной нуклеазой.

10

Радиоактивно меченные дцРНК и химический анализ сывороточной стабильности используют для прогноза дальнейшего характера расщепления миРНК. Изначально, дуплекс миРНК метят ³²P в 5'-положении либо на смысловой, либо на антисмысловой цепочке. Меченый дуплекс миРНК инкубируют в 90% сыворотке крови человека при температуре 37° С; и образцы раствора извлекают для анализа и гасят в различные моменты времени по нарастающей. Образцы анализируют методом электрофореза.

15

20

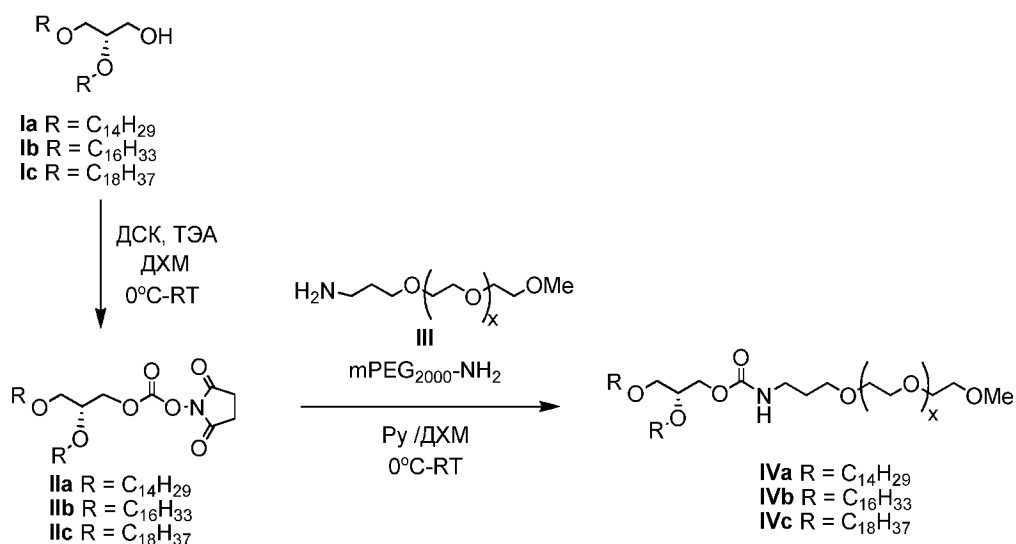
Пример 11: Оценивание FVII *in vivo* с использованием липосом, производных катионных липидов

In vivo эксперименты: фактор VII грызунов и *Ano B* сайленсинг.

C57BL/6 мыши (Charles River Labs, MA) и Спраг-Доли крысы (Charles River Labs, MA) получают либо изотонический раствор хлорида натрия, либо мРНК в желаемых соединениях в виде инъекции в хвостовую вену в объеме 0,01 мл/г. В разные моменты времени после введения, животным проводят ингаляционную анестезию изофтораном и отбирают образцы крови ретроорбитальным методом в пробирки для отделения сыворотки. Сывороточные уровни белка фактора VII определяют в образцах методом хромогенного анализа (Coaset Factor VII, DiaPharma Group, OH или Biophen FVII, Anisara Corporation, OH) в соответствии с протоколами производителя. Стандартную кривую генерируют, используя сыворотку подопытных животных, пролеченных изотоническим раствором. В тех экспериментах, где оценивают уровень печеночной мРНК, в различные моменты времени после введения, животных умерщвляют, а извлеченную печень немедленно замораживают в жидком азоте. Замороженную печеночную ткань измельчают в порошок. Подготавливают тканевые лизаты, определяют уровни фактора VII и *apoB* печеночной мРНК с помощью разветвленного ДНК анализа (QuantiGene Assay, Panomics, CA).

15

Пример 12; Приготовление 1,2-ди-О-алкил-сн3-корбомилглицерида (ПЭГ-ДМГ)



Приготовление IVa

20 1,2-ди-О-тетрадецил-сн-глицерид **Ia** (30 г, 61,80 ммоль) и *N, N'*-сукцинимидилкарбоант (ДСК, 23,76 г, 1,5 экв) помещают в дихлорметан (ДХМ, 500 мл) и перемешивают на водно-ледяной смеси. Триэтиламин (ТЭА, 25,30 мл; 3 экв) добавляют в перемешиваемый раствор, после чего

реакционную смесь перемешивают в течение ночи при температуре окружающей среды. Прогресс реакции контролируют методом ТСХ. Реакционную смесь разбавляют ДХМ (400 мл); органический слой промывают водой (2x500 мл), и водным раствором NaHCO_3 (500 мл) после стандартной процедуры. Полученный остаток высушивают при температуре окружающей среды в вакууме в течение ночи. После высыхания, неочищенный карбонат **IIa**, полученный на предыдущем этапе, растворяют в дихлорметане (500 мл) и перемешивают на ледяной бане. К перемешанному раствору добавляют мПЭГ₂₀₀₀-NH₂ (**III**, 103,00 г, 47,20 ммоль, приобретен в NOF Corporation, Japan) и безводный пиридин (Py, 80 мл, избыток) в среде аргона. После этого реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Удаляют в вакууме растворители и летучие вещества; остаток растворяют в ДХМ (200 мл); заряжают в колонку с силикагелем, упакованным в этилацетат. Колонку изначально элюируют этилацетатом, после метанолом, с градиентом 5-10% в дихлорметане для получения необходимого ПЭГ-Липида **IVa** в виде белого твердого вещества (105,30 г, 83%). ¹H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ = 5,20-5,12(м, 1H), 4,18-4,01(м, 2H), 3,80-3,70(м, 2H), 3,70-3,20(м, -O-CH₂-CH₂-O-, ПЭГ-CH₂), 2,10-2,01(м, 2H), 1,70-1,60 (м, 2H), 1,56-1,45(м, 4H), 1,31-1,15(м, 48H), 0,84(t, J= 6,5 Гц, 6H). МС выявленный диапазон: 2660-2836.

Приготовление IVb

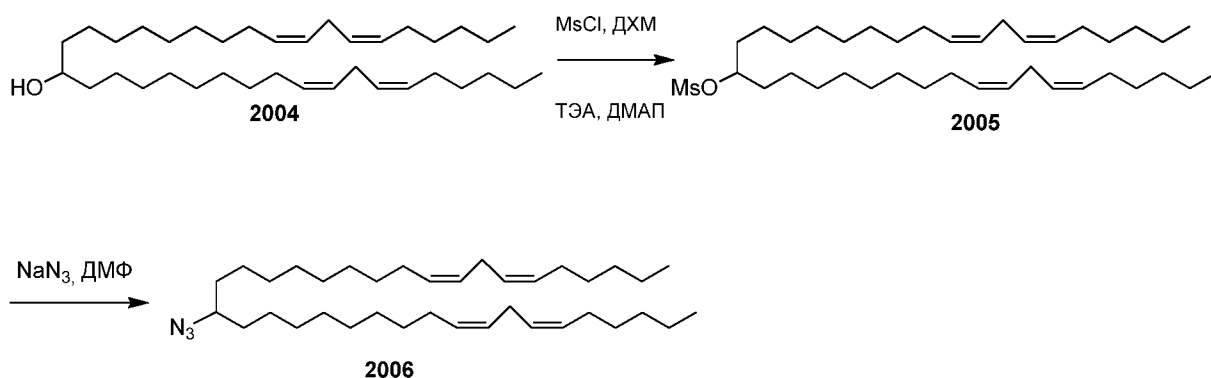
1,2-ди-О-гексадецил-сн-глицерид **Ib** (1,00 г, 1,848 ммоль) и ДСК (0,710 г, 1,5 экв) вместе помещают в дихлорметан (20 мл) и охлаждают до 0°C на смеси льда и воды. Триэтиламин (1,00 мл; 3 экв) добавляют, после чего реакционную смесь перемешивают в течение ночи. Реакция сопровождается ТСХ, реакционную смесь разбавляют ДХМ; дважды промывают водой, раствором NaHCO_3 и высушивают натрия сульфатом. Растворители удаляют при пониженном давлении; полученный остаток **IIb** помещают в вакуум на ночь. Полученное соединение непосредственно используют в последующей реакции без дальнейшего очищения. мПЭГ₂₀₀₀-NH₂ **III** (1,50 г, 0,687 ммоль, закупленный у NOF Corporation, Japan) и **IIb** (0,702 г, 1,5 экв) растворяют в дихлорметане (20 мл) в среде аргона. Реакцию охлаждают до 0°C. Пиридин (Py, 1 мл, избыток) добавляют и перемешивают в течение ночи. Прохождение реакции контролируют с помощью ТСХ. Удаляют в вакууме растворители и летучие вещества, остаток очищают с помощью хроматографии (вначале этилацетатом, затем 5-10% MeOH/ДХМ в качестве градиентного элюирования) для получения необходимого соединения **IVb** в виде белого твердого вещества (1,46 г, 76 %). ¹H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ = 5,17(t, J=

5,5 Гц, 1H), 4,13(dd, J= 4,00 Гц, 11,00 Гц, 1H), 4,05(dd, J= 5,00 Гц, 11,00 Гц, 1H), 3,82-3,75(м, 2H), 3,70-3,20(м, -O-CH₂-CH₂-O-, ПЭГ-CH₂), 2,05-1,90(м, 2H), 1,80-1,70 (м, 2H), 1,61-1,45(м, 6H), 1,35-1,17(м, 56H), 0,85(t, J= 6,5 Гц, 6H). Выявленный МС диапазон: 2716-2892.

Приготовление IVc

- 5 1,2-ди-О-октадецил-сн-глицерид **Ic** (4,00 г, 6,70 ммоль) и ДСК (2,58 г, 1,5 экв) вместе помещают в дихлорметан (60 мл) и охлаждают до 0°С на смеси льда и воды. Триэтиламин (2,75 мл; 3 экв) добавляют, после чего реакционную смесь перемешивают в течение ночи. За реакцией следует ТСХ, реакционную смесь разбавляют ДХМ; дважды промывают водой, раствором NaHCO₃ и высушивают натрия сульфатом. Растворители удаляют в среде с
- 10 пониженным давлением; полученный остаток **IIb** помещают в вакуум на ночь. Полученное соединение непосредственно используют в последующей реакции без дальнейшего очищения. МПЭГ₂₀₀₀-NH₂ **III** (1,50 г, 0,687 ммоль, закупленный у *NOF Corporation, Japan*) и **IIc** (0,760 г, 1,5 экв) растворяют в дихлорметане (20 мл) в среде аргона. Реакцию охлаждают до 0° С. Пиридин (1мл, избыток) добавляют и перемешивают в течение ночи. Реакцию контролируют
- 15 с помощью ТСХ. Удаляют в вакууме растворители и летучие вещества, остаток очищают с помощью хроматографии (изначально этилацетатом, затем 5-10% MeOH/ДХМ в качестве градиентного элюирования) для получения необходимого соединения **IVc** в виде белого твердого вещества (0,92 г, 48 %). ¹Н ЯМР (CDCl₃, 400 МГц) δ = 5,22-5,15(м, 1H), 4,16(dd, J= 4,00 Гц, 11,00 Гц, 1H), 4,06(dd, J= 5,00 Гц, 11,00 Гц, 1H), 3,81-3,75(м, 2H), 3,70-3,20(м, -O-CH₂-CH₂-O-, ПЭГ-CH₂), 1,80-1,70 (м, 2H), 1,60-1,48(м, 4H), 1,31-1,15(м, 64H), 0,85(t, J= 6,5 Гц, 6H). Выявленный МС диапазон: 2774-2948.
- 20

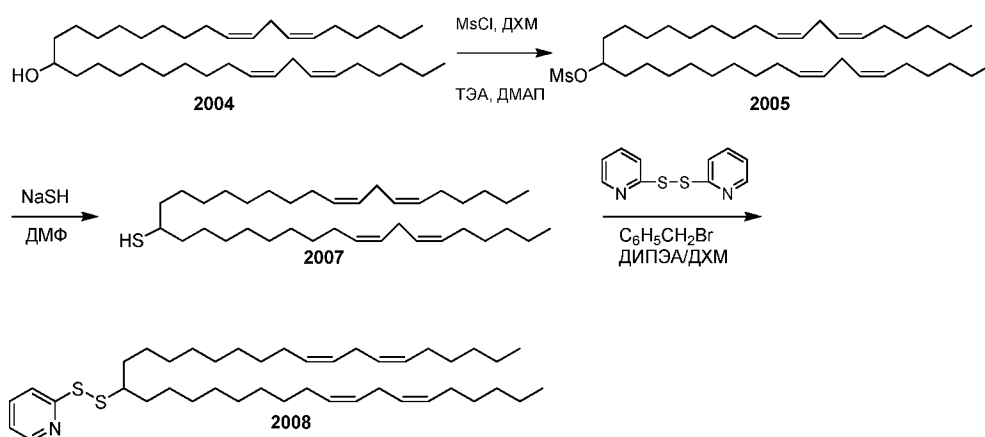
Пример 13:



Синтез **2005**: В раствор 2004 (50 г, 95 ммоль) в ДХМ (400 мл) в атмосфере аргона добавляют ТЭА (53 мл, 378 ммоль) и ДМАП (1,2Г, 9,5 ммоль) и перемешивают при комнатной температуре в атмосфере аргона. Реакционную массу охлаждают до -5°C и медленно добавляют раствор мезила хлорида (15 мл, 190 ммоль) в ДХМ (100 мл) при температуре ниже -5°C , после добавления нагревают до комнатной температуры. Через 30 минут (ТСХ), реакцию массу гасят ледяной водой (20 мл). Органический слой отделяют, промывают 1N HCl (30 мл), водой, соляным раствором, высушивают сульфатом натрия и выпаривают при пониженном давлении для получения чистого продукта (55 г, 95,5%) в виде желтой жидкости. **^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3):** δ 0,89 (t, 6H, $J = 6,8$), 1,2-1,5 (м, 36H), 1,67 (м, 4H), 2,05 (q, 8H, $J_1 = 6,8$, $J_2 = 6,8$), 2,77 (t, 4H, $J = 6,4$), 2,99 (s, 3H), 4,71(м, 1H) и 5,36 (м, 8H).

Синтез **2006**: В раствор 2005 (50 г, 82 ммоль) в ДМФА (500 мл) в атмосфере аргона добавляют NaN_3 (27 г, 410 ммоль) и нагревают до 70°C и поддерживают данную температуру на протяжении 4 часов (ТСХ). Полученную смесь разводят водой, и экстрагируют этилацетатом (3x250 мл). Органический слой промывают водой, соляным раствором, высушивают Na_2SO_4 и выпаривают при пониженном давлении для получения неочищенного продукта, который затем очищают при помощи хроматографии силикагелем с использованием гексана/эфира к качестве элюэнта. Полученный продукт элюируют 2% эфиром гексана для получения 2006 (36 г, 86%) в виде бледно-желтой жидкости. **^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3):** δ 0,90 (t, 8H), 1,30 (м, 36H), 1,49 (t, 4H, $J = 6,4$ Гц) 2,04 (q, 8H, $J_1 = 7,6$, $J_2 = 14$ Гц), 2,77 (t, 4H, $J = 6,4$ Гц), 3,22 (м, 1H), 5,34 (м, 8H). **^{13}C ЯМР (400 МГц, CDCl_3):** δ 14,1, 22,5, 25,6, 26,1, 27,2, 29,2, 29,3, 29,45, 29,65, 31,5, 34,1, 63,1, 127,9, и 130,1. ИК (KBr): 2098.

Пример 14:

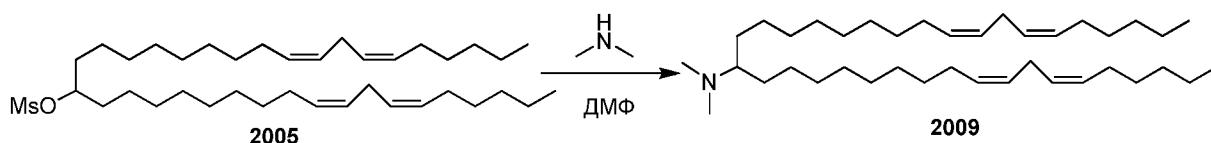


Синтез **2007**: В раствор 2005 (76 г, 125 ммоль) в диметилформамиде (500 мл) при комнатной температуре добавляют натрия гидросульфид гидрат (35 г, 625 ммоль). Реакционную смесь нагревают до 70°C в течение 2 часов (ТСХ). Затем данную смесь охлаждают до комнатной температуры, разбавляют водой (7объемов) и экстрагируют эфиром (3 x 5 объемов). Смешанные эфирные слои промывают водой (дважды по 3 объема), соевым раствором (2 x 3 объема), высушивают натрия сульфатом и выпаривают при пониженном давлении для получения неочищенного продукта, который очищают методом хроматографии на силикагеле с использованием гексана в качестве элюента для получения продукта **2007** (43,6 г, 64%). МС: Расчетная молекулярная масса для $\text{C}_{37}\text{H}_{68}\text{S}$ 544,50. Обнаруженная: 545,51 (M+H).

Синтез **2008**: Бензилбромид (11 мл, 92 ммоль) добавляют в раствор алдритиола (20,2 г, 92 ммоль) в дихлорметане (400 мл) при температуре 0°C . После перемешивания в течение 15 минут при 0°C , нагревают до комнатной температуры и повторно перемешивают в течение 15 минут. Реакционную смесь повторно охлаждают до 0°C и добавляют сначала раствор 2007 (50 г, 92 ммоль) в дихлорметане (100 мл), а затем диизопропилэтиламина (16 мл, 92 ммоль). После добавления, нагревают до кипения в течении 2-х часов (ТСХ). Затем разбавляют дихлорметаном (10 объемов), промывают водой (2 x 10 объемов), соляным раствором (2 x 10 объемов), высушивают натрия сульфатом и выпаривают при пониженном давлении для получения неочищенного продукта, который очищают методом хроматографии на силикагеле с использованием 3% эфира/гексана для получения чистого продукта в виде бледно желтой жидкости (35 г, 58%) ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 0,89 (t, 6H, $J_1 = 6,4$ Гц, $J_2 = 7,2$ Гц), 1,25-1,42 (м, 38H), 1,56-1,63 (м, 2H), 2,05 (q, 8H, $J_1 = 6,4$ Гц, $J_2 = 14$ Гц), 2,78 (t, 5H, J_1

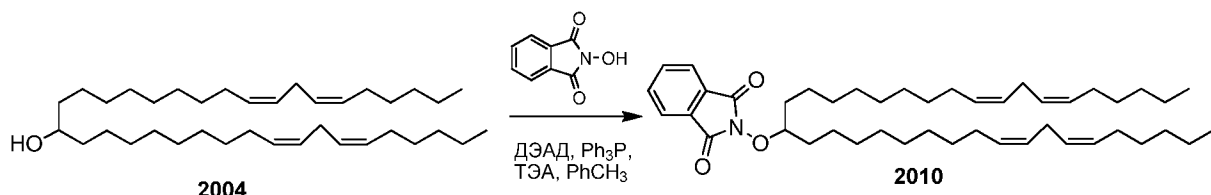
= 6,4 Гц, J₂ = 6 Гц), 5,30-5,42 (м, 8H), 7,06 (t, 1H, J₁ = 5,2 Гц, J₂ = 6,8 Гц), 7,62 (t, 1H, J₁ = 7,6 Гц, J₂ = 7,6 Гц), 7,76 (d, 1H, J = 8 Гц), 8,42 (d, 1H, J = 4,4 Гц). ¹³C ЯМР (100 МГц, CDCl₃): δ 22,6, 25,6, 26,7, 27,2, 29,2, 29,3, 29,5, 29,6, 31,5, 33,74, 52,9, 119,9, 120,4, 127,9, 128, 130,1, 130,2, 136,7, 149,3, 161,5. МС: Расчетная молекулярная масса для C₄₂H₇₁NS₂ 653,50, 5 Обнаруженная: 654,49 (M+H).

Пример 15:



Синтез **2009** (ALNY-138): Раствор **2005** (5 г, 8 ммоль) в ДМФА и 40% водный раствор диметиламина помещают в закупоренную пробирку. Реакционную смесь нагревают до 90°C в 10 течении 20 часов (ТСХ). Затем охлаждают до комнатной температуры, выливают в воду и экстрагируют этилацетатом (3 x 50 мл). Органический слой промывают водой и соляным раствором, высушивают Na₂SO₄ и выпаривают для получения чистого продукта в виде светло 15 коричневой жидкости (2,00 г, 45%) ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 0,89 (t, 6H, j = 6,8), 1,2-1,4 (м, 40H), 2,05 (q, 8H, J₁ = 6,8 Гц, J₂ = 6,8 Гц), 2,2 (s, 6H), 2,77 (t, 4H, j = 6,4 Гц), 5,35 (м, 8H). ¹³C ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 14,1, 22,5, 22,6, 27,1, 27,2, 29,3, 29,5, 29,57, 29,63, 29,67, 30,0, 31,5, 32,5, 40,5, 64,0, 127,9 и 130,1 МС: Расчетная молекулярная масса для C₃₉H₇₃N 555,57, 15 Обнаруженная: 556,55(M+H).

Пример 16:

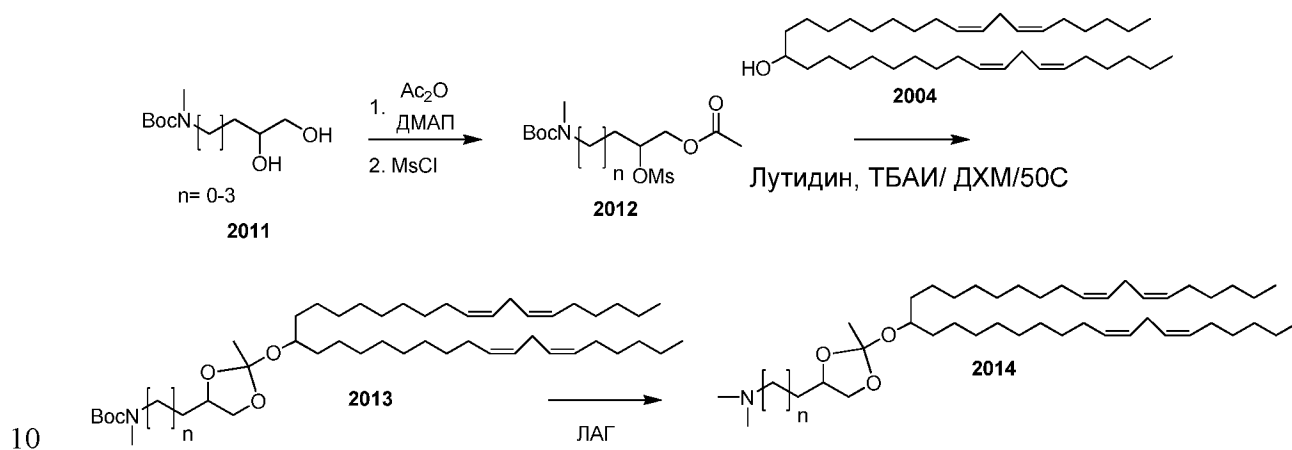


Синтез **2010**: N-гидроксифталимид (13,9 г, 85 ммоль) и ТРР (22,30 г, 85 ммоль) добавляют в 20 среде аргона в раствор **2004** (30 г, 56,8 ммоль) в толуоле. Реакционную массу охлаждают до – 5° С и добавляют ТЭА (11,84 мл), а затем ДЭАД (13,14 мл). Реакционную массу 25 перемешивают в течении 12 часов при комнатной температуре (ТСХ). Затем данную смесь фильтруют через целитовый слой. Фильтрат выпаривают при пониженном давлении для

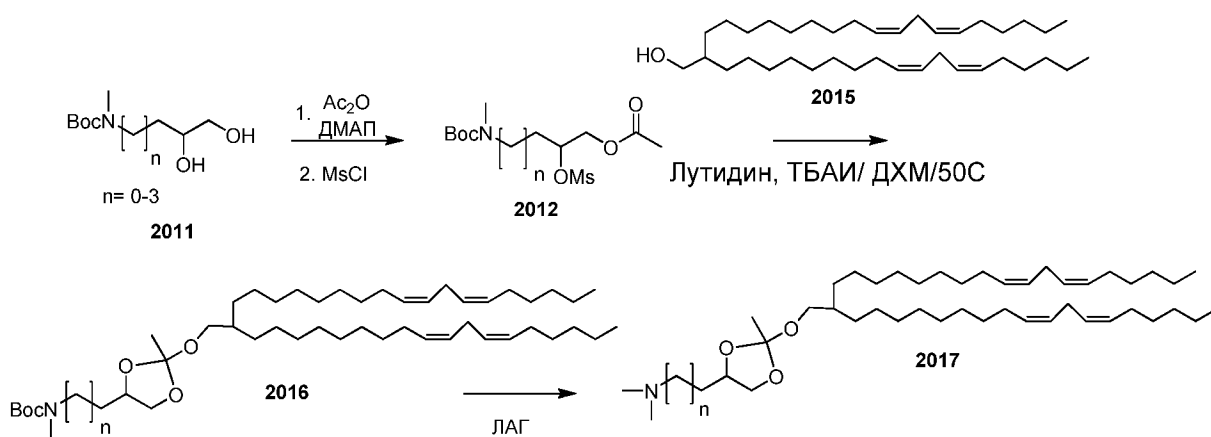
получения неочищенного продукта, очищают методом хроматографии на силикагеле для получения чистого продукта, который элюируют 3%-м диэтиловым эфиром и гексаном для получения продукта 2010 (22,90 г, 60,50 %) в виде светло желтой жидкости **¹НЯМР**

(400 МГц, CDCl₃): δ 0,90 (6H, t, J = 7,2 Гц), 1,2-1,4 (34H, м), 1,66-1,70 (4H, м), 2,03-2,08 (8H, м), 2,78 (4H, t, J = 12,8 Гц), 4,22 (1H, м), 5,29-5,43 (8H, м), 7,74-7,76 (2H, м), 7,83-7,85 (2H, м). **¹³СЯМР** (100М Гц, CDCl₃): δ 14,3, 22,5, 24,9, 25,6, 27,2, 27,20, 29,3, 29,3, 29,5, 29,5, 29,6, 29,7, 31,5, 32,4, 88,3, 123,3, 127,9, 129,0, 130,1, 134,3, 164,3. МС: Расчетная молекулярная масса для C₄₅H₇₁NO₃ 673,54, Обнаруженная: 674,55(M+H).

Пример 17:



Пример 18:



15 **Пример 19:** Синтез 3-(диметиламино)-N-((11Z,14Z)-2-((9Z, 12Z)-октадека-9,12-диэнил)икоза-11,14-диэнил) пропанамида (ALNY-201)

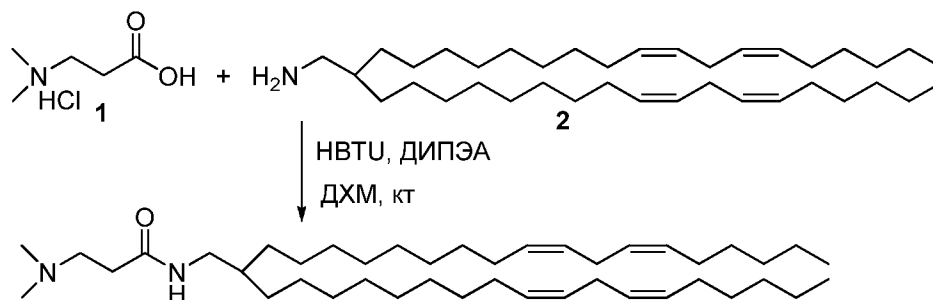


Схема 1 1

ALNY-201

НВТУ (0,59 г, 1,56 ммоль, 1,2 экв) и ДИПЭА (0,71 мл, 3,9 ммоль, 3,0 экв) добавляют во взболтанную суспензию N, N-диметиламино-пропионовой кислоты (**1**, 0,198 г, 1,3 ммоль, 1,0 экв) в ДХМ при комнатной температуре. После перемешивания в течение 10 минут, при

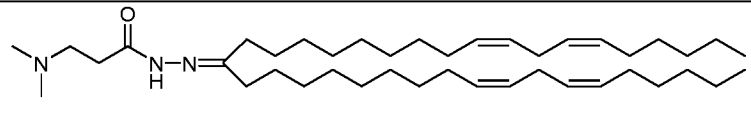
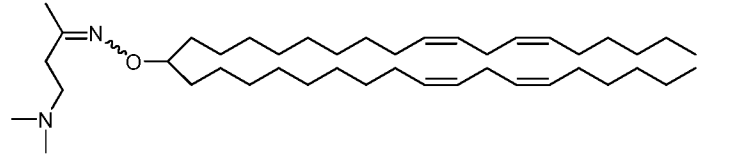
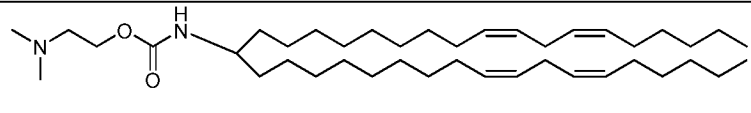
5 комнатной температуре добавляют по каплям раствор амина (**2**, 0,7 г, 1,3 ммоль, 1,0 экв) в ДХМ при комнатной температуре и продолжают перемешивать до завершения реакции. Реакционную смесь разбавляют с ДХМ, промывают насыщенным раствором NaHCO_3 , после этого соляным раствором; органический слой выделяют, высушивают MgSO_4 , концентрируют и очищают методом колонной хроматографии с силикагелем, с

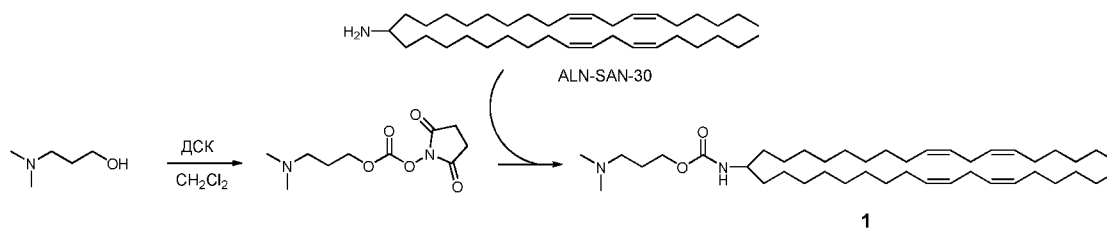
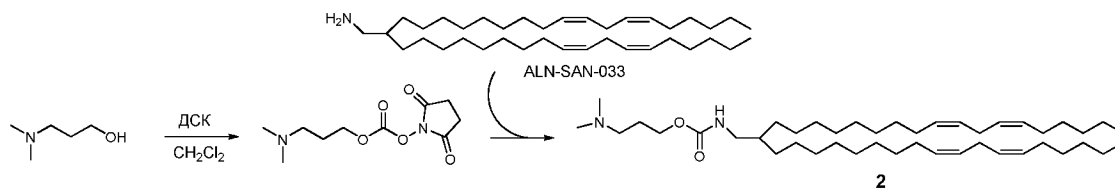
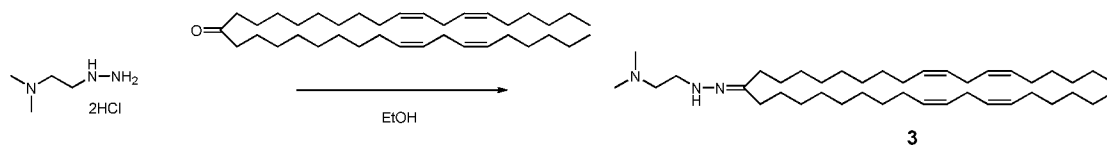
10 использованием ДХМ: MeOH (5%) в качестве градиентов для получения чистого маслянистого соединения **3** с 70% выходом. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,18 (brs, 1H), 5,47 – 5,19 (м, 8H), 3,18 – 3,07 (м, 4H), 2,76 (t, $J = 6,5$, 4H), 2,70 (s, 6H), 2,60 (t, $J = 6,0$, 2H), 2,04 (q, $J = 6,8$, 9H), 1,48 (brs, 1H), 1,40 – 1,14 (м, 43H), 0,88 (t, $J = 6,8$, 6H). Расчётная масса для $\text{C}_{43}\text{H}_{80}\text{N}_2\text{O}$: 640,6, Обнаруженная 641,5.

15

Синтез новых производных динолеила

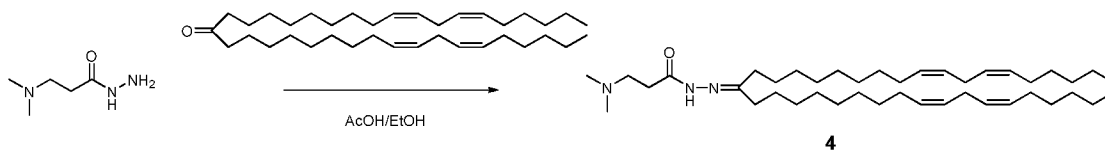
No	Соединение	Название
1		ALNY-192
2		ALNY-200
3		ALNY-175

4		ALNY-187
5		ALNY-149
6		ALNY-202

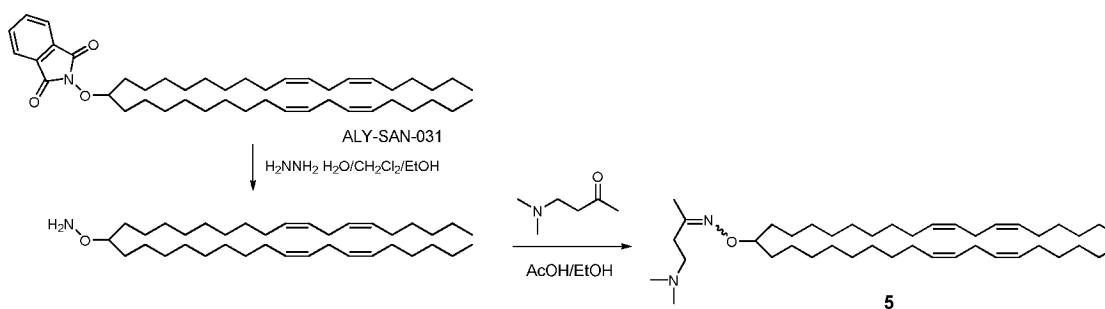
Соединение 1**5 Соединение 2****Соединение 3**

10

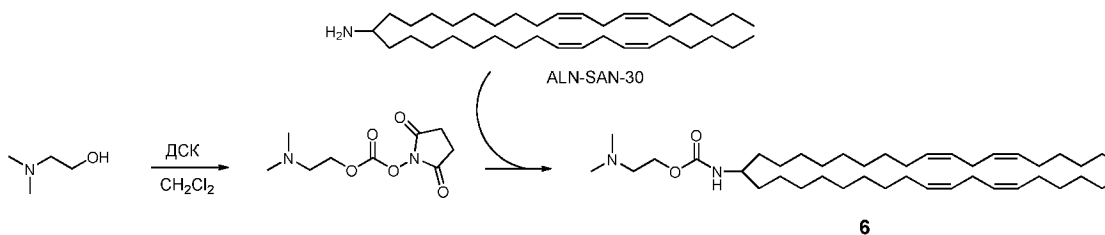
Соединение 4



Соединение 5



Соединение 6



Детали эксперимента

10 Соединение 1 (ALNY-192)

В раствор N, N'-дисуццинимидил карбоната (5,50 г, 21,5 ммоль) в CH₂Cl₂ (200 мл) добавляют по каплям 3-диметиламино-1-пропанол (2,43 г, 23,6 ммоль). Полученную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Отобранные 50 мл раствора, Et₃N (0,822 мл; 5,90 ммоль) и ALN-SAN-30 (2,08 г, 3,93 ммоль) добавляют в реакционную смесь и перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь разбавляют CH₂Cl₂ и промывают насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой высушивают безводным MgSO₄, фильтруют и концентрируют. Сырье очищают с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (0-5% MeOH в CH₂Cl₂) для получения соединения 1 (1,66 г, 2,53 ммоль, 64%, R_f = 0,22 с 5% MeOH в CH₂Cl₂). ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц) δ 5,30-5,41 (м, 8 H), 4,37 (d, J = 8,0 Гц, 1 H), 4,09 (t, J = 6,0 Гц, 2 H), 3,57 (brs, 1 H), 2,78 (t, J = 6,0 Гц, 4 H), 2,33 (t, J = 8,0 Гц, 2 H), 2,23 (s, 6 H), 2,02-2,06 (м, 8 H), 1,76-1,80 (м, 2 H), 1,27-1,45 (м, 40

H), 0,89 (t, $J = 8,0$ Гц, 6 H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3 , 100 МГц) δ 156,5, 130,4, 130,3, 128,2, 128,1, 63,2, 56,6, 51,4, 45,7, 35,7, 31,7, 29,9, 29,8, 29,7, 29,6, 29,5, 27,7, 27,5, 27,4, 26,0, 25,8, 22,8, 14,3. Расчетная молекулярная масса для $\text{C}_{43}\text{H}_{81}\text{N}_2\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 657,63, Обнаруженная 657,5.

Соединение 2 (ALNY-200)

- 5 В раствор N, N'-дисуцинимидил карбоната (5,50 г, 21,5 ммоль) в CH_2Cl_2 (200 мл) добавляют по каплям 3-диметиламино-1-пропанол (2,43 г, 23,6 ммоль). Полученную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Отобранные 50 мл раствора, Et_3N (0,697 мл; 5,00 ммоль) и ALN-SAN-033 (1,71 г, 3,15 ммоль) добавляют в реакционную смесь и перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь разбавляют
- 10 CH_2Cl_2 и промывают насыщенным водным раствором NaHCO_3 . Органический слой высушивают безводным MgSO_4 , фильтруют и концентрируют. Сырье очищают с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (0-5% MeOH в CH_2Cl_2) для получения соединения **2** (1,14 г, 1,70 ммоль, 54%, $R_f = 0,13$ с 5% MeOH в CH_2Cl_2). Расчетная молекулярная масса для $\text{C}_{44}\text{H}_{83}\text{N}_2\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 671,65, Обнаруженная 671,5.

Соединение 3 (ALNY-175)

- В колбу, содержащую EtOH (50 мл), добавляют диметиламиноэтила гидразин дигидрохлорид (1,00 г, 5,70 ммоль) и ALNY-SAN-003 (2,00 г, 3,80 ммоль). Полученную смесь нагревают при температуре 60° C в течение 16 часов. После добавления Et_3N (0,5 мл), реакционную смесь выпаривают. Остаток экстрагируют Et_2O и насыщенным водным NaHCO_3 и органический слой
- 20 высушивают MgSO_4 , фильтруют и концентрируют. Сырье очищают с помощью колоночной хроматографии на силикагеле ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}:\text{NH}_3$ водный = 95:5:0,5, $R_f = 0,29$) для получения соединения **3** (1,78 г, 2,91 ммоль, 76%). Расчетная молекулярная масса для $\text{C}_{41}\text{H}_{78}\text{N}_3$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 612,62, Обнаруженная 612,5.

Соединение 4 (ALNY-187)

- 25 Смешивают гидразид 3-диметиламино-пропионовой кислоты (Ryan Scientific, 500 мг, 3,89 ммоль) в этаноле (EtOH) (10 мл) и дилинолеила кетон (1,74 г, 3,31 ммоль) в EtOH (20 мл). К раствору добавляют уксусную кислоту (0,038 мл, 0,662 ммоль) и реакционную смесь нагревают при температуре 65° C в течение 5 часов. После добавления Et_3N (0,5 мл) реакционную смесь выпаривают. Остаток экстрагируют CH_2Cl_2 и насыщенным водным
- 30 NaHCO_3 и органический слой высушивают MgSO_4 , фильтруют и концентрируют. Полученное сырье очищают с помощью колоночной хроматографии на силикагеле ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}:\text{NH}_3$

водн. = 95:5:0,5, $R_f = 0,30$) для получения соединения **4** (1,40 г, 2,19 ммоль, 66%). Расчетная молекулярная масса для $C_{42}H_{78}N_3O$ $(M+H)^+$ 640,61, Обнаруженная 640,5.

Соединение 5 (ALNY-149)

ALY-SAN-031 (2,36 г, 3,50 ммоль) обрабатывают гидразина моногидратом (0,424 мл, 5,60 ммоль) в CH_2Cl_2 (36 мл) и EtOH (4 мл) в течение 2 часов. После фильтрации полученного белого осадка; фильтрат концентрируют. Остаток экстрагируют Et_2O и насыщенным водным $NaHCO_3$ и органический слой высушивают $MgSO_4$, фильтруют и концентрируют. Неочищенный материал используют на следующем этапе без дополнительной очистки. R_f : 0,44 (10% EtOAc в гексане). Молекулярная масса для $C_{37}H_{70}NO$ $(M+H)^+$ Расчетная 544,55, Обнаруженная 544,2.

Амино-окси соединение растворяют в EtOH (30 мл), и добавляют в раствор 4-(диметиламино)-бутан-2-один (Matrix Scientific, 500 мг, 4,34 ммоль) и уксусную кислоту (0,040 мл, 0,70 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 14 часов. После добавления Et_3N (0,5 мл) реакционную смесь выпаривают. Остаток экстрагируют Et_2O и насыщенным водным $NaHCO_3$ и органический слой высушивают $MgSO_4$, фильтруют и концентрируют. Полученное сырье очищают с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (гексан: EtOAc = 1:1) для получения соединения **5** в виде смеси *E/Z*-изомеров (1,90 г, 2,96 ммоль; 85%, 2 шага, $R_f = 0,39, 0,21$ разработанный с гексан:EtOAc = 1:1). Молекулярная масса для $C_{43}H_{81}N_2O$ $(M+H)^+$ Расчетная 641,63, Обнаруженная 641,5.

Соединение 6 (ALNY-202)

В раствор *N,N'*-дисуцинимидил карбоната (5,50 г, 21,5 ммоль) в CH_2Cl_2 (200 мл) добавляют по каплям 3-диметиламино-1-пропанол (2,37 г, 23,6 ммоль). Полученную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Отобранные 50 мл раствора, Et_3N (0,822 мл; 5,90 ммоль) и ALN-SAN-30 (2,07 г, 3,93 ммоль) добавляют и перемешивают реакционную смесь при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь разбавляют CH_2Cl_2 и промывают насыщенным водным раствором $NaHCO_3$. Органический слой высушивают безводным $MgSO_4$, фильтруют и концентрируют. Полученное сырье очищают с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (0-5% MeOH в CH_2Cl_2) для получения соединения **6**. Молекулярная масса для $C_{42}H_{79}N_2O_2$ $(M+H)^+$ Расчетная 643,61, Обнаруженная 643,5.

Соединения, представленные в настоящем изобретении, в дальнейшем можно синтезировать с помощью процедур, описанных в следующих работах, которые включены здесь в полном объеме:

1. Schlueter, Urs; Lu, Jun; Fraser-Reid, Bert. **Synthetic Approaches To Heavily Lipidated**
5 **Phosphoglyceroinositides.** *Organic Letters* (2003), 5(3), 255-257
2. King, J. F.; Allbutt, A. D. *Can. J. Chem.* 1970, 48, 1754-1769
3. Mach, Mateusz; Schlueter, Urs; Mathew, Felix; Fraser-Reid, Bert; Hazen, Kevin C. **Comparing**
n-pentenyl orthoesters and n-pentenyl glycosides as alternative glycosyl donors. *Tetrahedron*
(2002), 58(36), 7345-7354.

10

Пример 20: Определение эффективности композиций липидных частиц, содержащих различные катионные липиды, используемые in vivo в модели сайленсинга фактора VII грызунов.

15

Фактор VII (FVII), известный белок каскада коагуляции, синтезируется в печени (в гепатоцитах) и выделяется в плазму. Уровень FVII в плазме определяют методом простого колориметрического анализа на пластинах. Таким образом, FVII представляет собой убедительную модель для определения миРНК-опосредованного снижения экспрессии протеинов, продуцируемых гепатоцитами, в той же степени, как и мониторинг концентрации

20

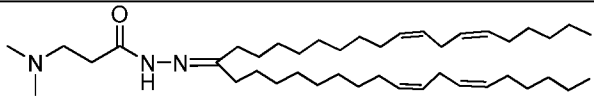
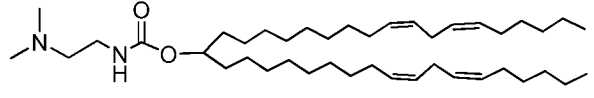
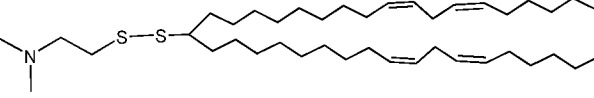
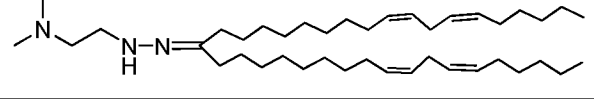
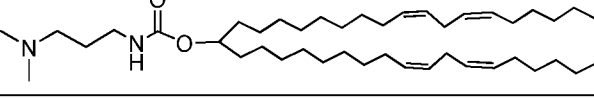
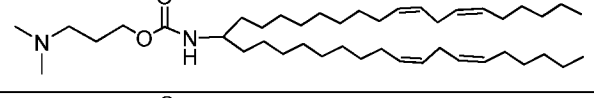
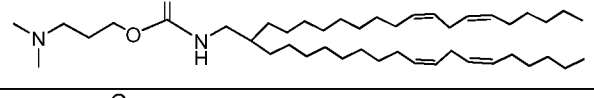
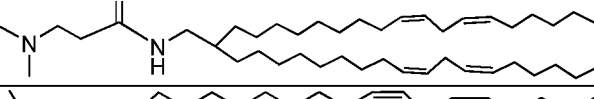
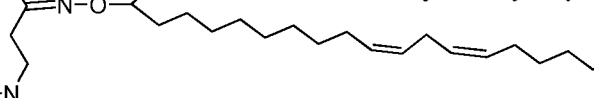
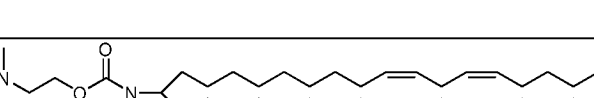
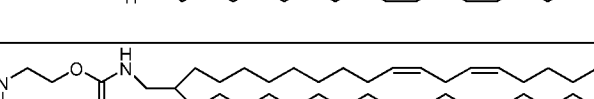
в плазме и распределения в тканях частиц нуклеиновая кислота/липид и миРНК.

Дуплекс	Последовательность 5'-3'	идентификационный № последовательности:	Мишень
AD-1661	GGAfUfCAfUfCfUfCAAGfUfCfUfUAfCdTsdT		FVII
	GfUAAGAfCfUfUGAGAfUGAfUfCfCdTsdT		

Нижний пример — это 2'ОМе модификация: Nf — это 2'модифицированное основание нуклеотида, dT — дезокситимидин, S — фосфотиоат.

Следующие катионные липиды были протестированы:

Соединение	Формула соединения	Molecular data
------------	--------------------	----------------

A		$C_{42}H_{77}N_3O$ Молекулярная масса : 640,08
B		$C_{42}H_{78}N_2O_2$ Молекулярная масса : 643,08
C		$C_{41}H_{77}NS_2$ Молекулярная масса : 648,19
D		$C_{41}H_{77}N_3$ Молекулярная масса : 612,07
E		$C_{43}H_{80}N_2O_2$ Молекулярная масса: 657,11
F		$C_{43}H_{80}N_2O_2$ Молекулярная масса: 657,11
G		$C_{44}H_{82}N_2O_2$ Молекулярная масса: 671,134
H		$C_{43}H_{80}N_2O$ Молекулярная масса: 641,108
I		$C_{43}H_{80}N_2O$ Молекулярная масса: 641,11
J		$C_{42}H_{78}N_2O_2$ Молекулярная масса: 643,081
K		$C_{43}H_{80}N_2O_2$ Молекулярная масса: 657,107

Катионные липиды, продемонстрированные выше, используют для формирования липосом, содержащих AD-1661 дуплекс, используемые в методике линейного смешивания, как описано в предварительной заявке на патент США 61/228373. Липидные частицы формируют, используя следующее молярное соотношение: 50% катионный липид / 10% дистеароилфосфатидилхолин (ДСФХ) / 38,5% холестерол / 1,5% ПЭГ-ДМГ (1-

(монометоксиполиэтиленгликоль)-2,3-димиристоилглицерол, со средней молекулярной массой ПЭГ 2000).

Мыши C57BL/6 (Charles River Labs, M. A.) получают либо изотонический раствор хлорида натрия либо миРНК-соединение посредством инъекции в хвостовую вену. Образцы сыворотки получают из периорбитального кровотока в различные моменты времени после введения. Сывороточные уровни белка Фактора VII определяют в образцах с использованием хромогенного анализа (Biophen FVII, Aniaga Corporation, OH). Чтобы определить уровни печеночной мРНК фактора VII, животных умерщвляют; печень получают и сразу же замораживают в жидком азоте. Тканевые лизаты приготавливают из замороженной печеночной ткани; и количественно определяют уровни печеночной мРНК фактора VII, используя разветвленный ДНК тест (QuantiGene Assay, Panomics, CA).

Через 48 часов после внутривенного (болюсного) введения оценивают активность FVII у мышей C57BL/6, которым вводили FVII миРНК. FVII измеряют с помощью имеющегося в продаже набора для определения уровня белка в сыворотке крови или тканях, следуя инструкции завода-изготовителя к микропланшетной шкале. Определяют снижение FVII по сравнению с контрольной группой мышей, которым не вводили вещество; результаты выражают как % остаточного FVII. Два уровня дозировки (0,05 мг/кг и 0,005 мг/кг FVII миРНК) используют при скрининге каждой новой липосомной композиции. Фигура 3 демонстрирует график, иллюстрирующий сравнительные уровни белка FVII у животных, которым вводили дозу 0,05 мг/кг или 0,005 мг/кг липидных частиц, содержащих различные катионные липиды.

Пример 21; технология приготовления миРНК с использованием подготовленных везикул

Частицы, содержащие катионные липиды, создают, используя способ подготовленных везикул. Катионные липиды, ДСФХ, холестерол и ПЭГ-липиды растворяют в этаноле с молярным соотношением 40/10/40/10 соответственно. Липидную смесь добавляют к водному буферу (50мМ цитрата, pH 4), перемешивают до конечной концентрации этанола и липидов 30% (об./об.) и 6,1 мг/мл, соответственно, и оставляют для уравнивания смеси при комнатной температуре в течение 2 мин перед экструзией. Гидратированные липиды

экструдировать при температуре 22° С через дважды сложенный фильтр, с пористостью 80 нм (Nuclepore), с использованием Lipex экстрадера (Northern Lipids, Vancouver, BC) до получения пузырьков диаметром 70-90 нм, как определено с помощью Nicomp анализа. Для этого обычно требуется 1-3 прохода. Для некоторых смесей катионных липидов, которые не образуют мелкие пузырьки, гидратирование липидной смеси буфером с более низким pH (50 мМ цитрат, pH 3) для протонирования фосфатной группы на ДСФХ головной группы способствует формированию стабильных пузырьков 70-90 нм.

FVII миРНК (растворенный в 50 мМ цитрата, pH 4 водном растворе, содержащем 30% этанола) добавляют к везикулам, предварительно уравновешенным до 35° С, при скорости ~ 5мл/мин, со смешиванием. После конечного отношения целевая миРНК / липид, которое составляет 0,06 (масса/масса) смесь инкубируют последующие 30 мин при температуре 35° С для реорганизации пузырьков и инкапсулирования FVII миРНК. Этанол затем удаляют и внешний буфер заменяют PBS (155мМ NaCl, 3мМ Na₂HPO₄, 1мМ KH₂PO₄, pH 7,5) либо с помощью диализа либо тангенциальной проточной диафильтрацией. Окончательное соотношение инкапсулированной миРНК к липиду определяют после удаления неинкапсулированной миРНК с использованием размер-эксклюзионных спин-колонок либо ионно-обменных спин-колонок.

Пример 22: Определения эффективности липидных формул *in vivo*

Тестовые композиции первоначально оценивают по их FVII разрушению у самок мышей C57Bl/6 в возрасте 7-9 недель, с массой 15-25г в дозировках 0,1, 0,3, 1,0 и 5,0 мг/кг с 3 особями мышей в каждой группе лечения. Все исследования включают животных, получающих либо фосфатный буферный раствор (ФБР, контрольная группа) либо тестируемую композицию. Соединение разбавляют до необходимой концентрации в ФБР непосредственно перед проведением испытания. Мышей взвешивают и рассчитывают соответствующий объем вводимой дозы (10 мл/г массы тела). Тестируемые и контрольные композиции, то есть ФБР (для контрольной группы животных), вводят внутривенно через латеральную хвостовую вену. Спустя 24 часа животных анестезируют посредством внутрибрюшинного введения Кетамина/Ксилазина и у них набирают 500-700 мл крови посредством внутрисердечной пункции в пробирку для сепарации сыворотки крови (BD

Microtainer). Кровь центрифугируют при 2000 об. в течение 10 мин при температуре 15° С; сыворотку собирают и хранят при -70° С до проведения анализа. Образцы сыворотки размораживают при 37° С в течение 30 мин, разводят в ФБР и разделяют на 96-луночных планшетов для анализа. Уровни фактора VII оценивают хромогенным анализом (Biophen FVII набор, Nyphen BioMed) в соответствии с инструкциями производителя; абсорбция измеряется в микропланшетном счетчике, оснащенный фильтром с длиной волны 405 нм. Уровни плазменного FVII измеряют количественно и уровни ED50 (доза, обеспечивающая 50% снижение уровней FVII в плазме по сравнению с контрольной группой животных) рассчитывают по стандартной кривой, построенной, основываясь на объединенных результатах образцов сыворотки от контрольных животных. Композиции, представляющие интерес демонстрируют высокие уровни FVII нокдауна (ED50 <<0,1 мг/кг) повторно тестируют в независимых исследованиях в более низком диапазоне доз для подтверждения эффективности и установления ED50.

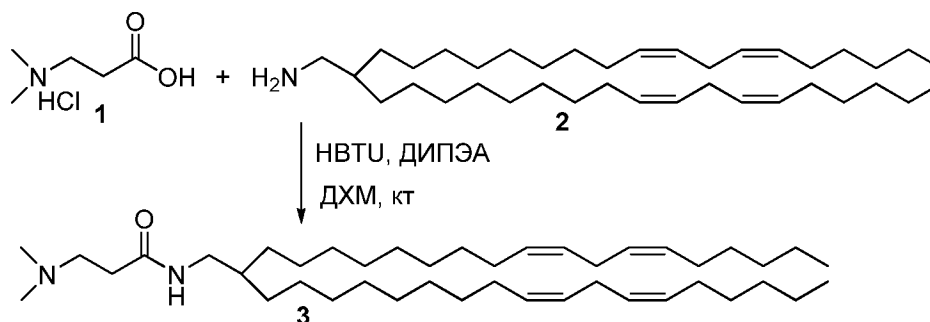
Фигура 4 представляет таблицу EC50 типичных соединений, которые тестируют с помощью этого метода.

Пример 22А: Определение рКа липидных соединений

рКа различных ионизируемых катионных липидов по существу определяют, как описано в работах (Eastman et al 1992 Biochemistry 31:4262–4268), с помощью флуоресцентного зонда 2-(p-толуидино)-6-нафталенсульфоновой кислоты (ТНС), который является не-флуоресцентным в воде, но становится заметно флуоресцентным, когда связан с мембранами. Пузырьки, состоящие из катионного липида / ДСФХ / СН / ПЭГ-с-ДОМГ (40:10:40:10 молярное соотношение) разбавляют до 0,1 мМ в буферах (130мМ NaCl, 10 мМ CH₃COONH₄, 10 мМ МЭС, 10мМ HEPES) при различных рН, от 2 до 11. Аликвоту водного раствора ТНС (1 мкМ конечный) добавляют в разбавленные пузырьки и после 30-секундного периода уравнивания флуоресцент ТНС-содержащего раствора измеряется при возбуждении и излучении длины волны 321 нм и 445 нм, соответственно.. рКа везикул, содержащих катионные липиды, определяют путем построения зависимости измеряемой флуоресценции от рН растворов и приведение данных к сигмоидальной кривой с использованием коммерческой графической программы IgorPro.

Фигура 4 представляет таблицу изображающую рКа типичных соединений, которые тестируют с помощью этого метода.

Пример 23: Синтез амид-связанных липидов



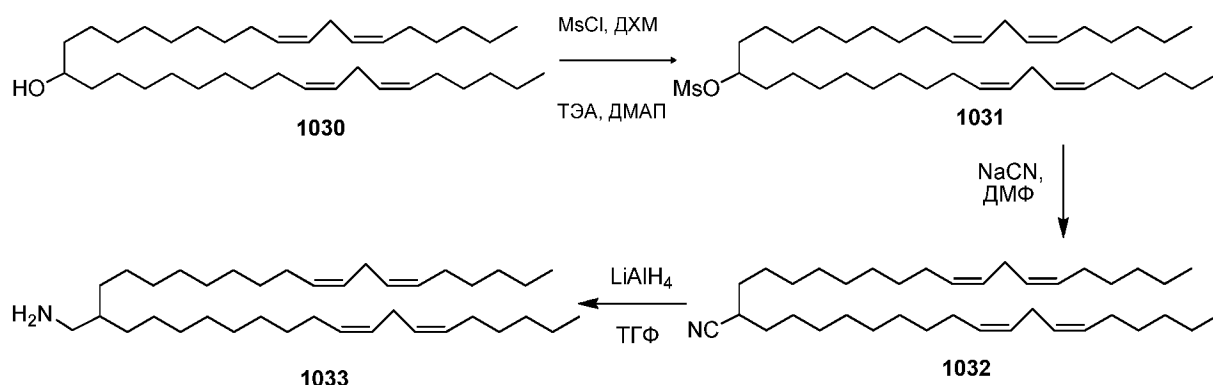
Пептид связывающий реагент (HBTU) (0,59 г, 1,56 ммоль, 1,2 экв) и ДИПЭА (0,71 мл, 3,9 ммоль, 3,0 экв) добавляют в перемешанную суспензию гидрохлорида *N,N*-диметиламинопропионовой кислоты (**1**, 0,198 г, 1,3 ммоль, 1,0 экв) в ДХМ при комнатной температуре. После перемешивания в течение 10 минут, добавляют по каплям раствор амина (**2**, 0,7 г 1,3 ммоль, 1,0 экв) в ДХМ при комнатной температуре и продолжают перемешивать до завершения реакции. Реакционную смесь разбавляют с ДХМ, промывают насыщенным раствором NaHCO_3 , затем соляным раствором; органический слой выделяют и высушивают MgSO_4 , концентрируют и очищают с помощью колоночной хроматографии с силикагелем, используя ДХМ:MeOH (5%) в качестве градиентов, чтобы получить очищенное маслянистое соединение **3 (ALNY-201)** с выходом 70%.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,18 (brs, 1H), 5,47 – 5,19 (м, 8H), 3,18 – 3,07 (м, 4H), 2,76 (t, $J = 6,5$, 4H), 2,70 (s, 6H), 2,60 (t, $J = 6,0$, 2H), 2,04 (q, $J = 6,8$, 9H), 1,48 (brs, 1H), 1,40 – 1,14 (м, 43H), 0,88 (t, $J = 6,8$, 6H). ^{13}C ЯМР (101 МГц, CDCl_3) δ 172,26, 130,41, 130,36, 128,17, 128,15, 77,54, 77,22, 76,90, 55,70, 43,85, 43,02, 37,90, 31,99, 31,74, 30,25, 29,92, 29,86, 29,81, 29,57, 27,47, 27,42, 26,84, 25,85, 22,79, 14,29. Расчетная масса для $\text{C}_{43}\text{H}_{80}\text{N}_2\text{O}$: 640,6, обнаруженная 641,5.

Пример 24: Синтез карбамат- и карбамид- связанных липидов

Соединение 1033

Схема 1

Стадия-1:

С. №о	Химикаты / Реактивы и растворители	М. масса.	Мол.	Экв.	Кол-во.
1	Спирт 1030	528	0,095	1	50 г
2	ДХМ				500 мл
3	Триэтиламин (ТЭА)	101,2	0,378	4	53 мл
4	ДМАП	122,17	0,0095	0,1	1,2 г
5	Мезил хлорид	114,55	0,19	2	15 мл

ТЭА и ДМАП добавляют в атмосфере аргона в раствор спирта **1030** в ДХМ (400 мл) и перемешивают при комнатной температуре в атмосфере аргона. Реакционную массу охлаждают до -5°C ; раствор мезил хлорида в ДХМ (100 мл) медленно добавляют при температуре ниже -5°C и после этого дают нагреться до комнатной температуры. Через 30 минут (ТСХ), реакционную массу гасят ледяной водой (20 мл). Органический слой отделяют, промывают 1N HCl (30 мл), водой, соляным раствором, высушивают сульфатом натрия и выпаривают при пониженном давлении для получения чистого продукта **1031** (55 г, выход 95,5%) в виде желтой жидкости. ВЭЖХ : 99,8%; ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 0,89 (t, 6H, J = 6,8 Гц), 1,2-1,5 (м, 36H), 1,67 (м, 4H), 2,05 (q, 8H, J = 6,8 Гц), 2,77 (t, 4H, J = 6,4 Гц), 2,99 (s, 3H), 4,71(м, 1H) and 5,36 (м, 8H). ^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3): δ 14,0, 22,5, 24,9, 25,6, 27,2, 29,2, 29,3, 29,4, 29,5, 29,6, 31,5, 34,4, 38,6, 45,9, 84,3, 127,9, 128,0, 130,0, 130,1

Стадия-2:

С. №о	Химикаты / Реактивы и растворители	М. масса.	Мол.	Экв.	Кол-во.
1	Мезилат 1031	606	0,0165	1	10 г

2	Диметилформамид (ДМФА)				100 мл
3	Цианид натрия	49	0,0330	2	1,617 г

В раствор цианида натрия в ДМФ в атмосфере аргона медленно добавляют продукт стадии-1 в ДМФ и нагревают до 55°C в течении 24 часов (ВЭЖХ). Затем охлаждают до комнатной температуры, разбавляют водой и экстрагируют этилацетатом (несколько раз). Смешанные органические слои промывают водой, соляным раствором, высушивают сульфатом натрия и выпаривают при пониженном давлении для получения неочищенного продукта, который очищают с помощью колоночной хроматографии с силикагелем, используя 1% эфир/гексан в качестве элюента, для получения очищенного продукта **1032** (5,8 г, выход: (62%) в виде светло-желтой жидкости. ¹ Н ЯМР (400 Гц, CDCl₃): δ 0,87 (t, 6H, J = 6,8 Гц), 1,25 (м, 38H), 1,52 (м, 4H), 2,03 (q, 8H, J = 6,8 Гц), 2,47(м, 1H), 2,76 (t, 4H, J = 6,4 Гц), 5,32 (м, 8H). ¹ Н-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 0,87 (т, 6H, J = 6,8 Гц), 1,25 (м, 38H), 1,52 (м, 4H), 2,03 (д, 8H, J = 6,8 Гц), 2,47 (м, 1H), 2,76 (т, 4H, J = 6,4 Гц), 5,32 (м, 8H).

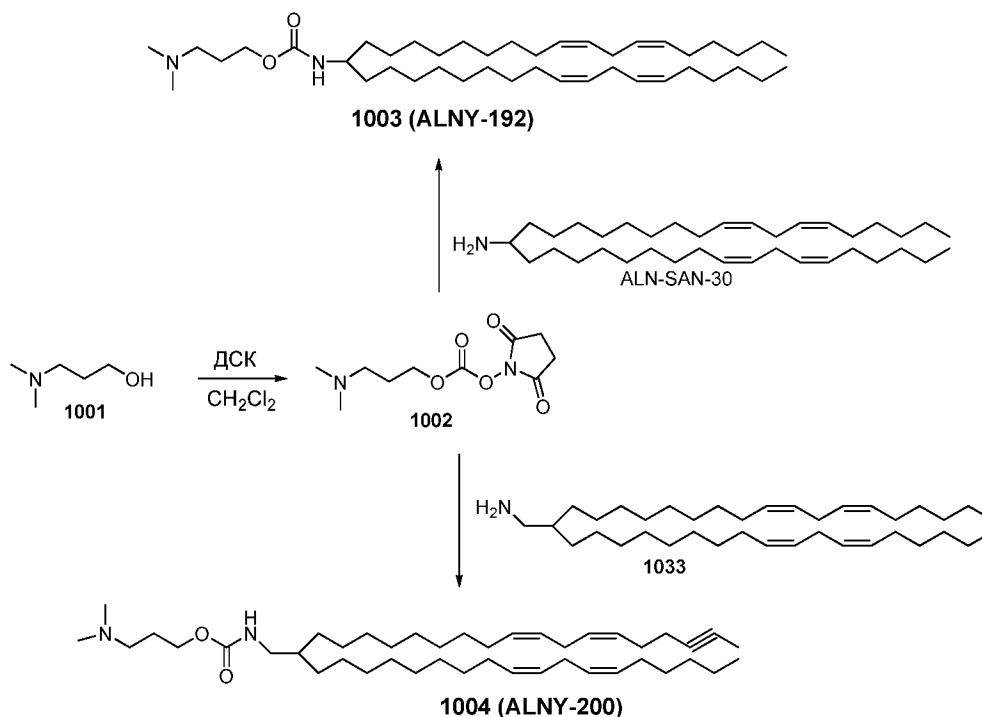
Стадия-3:

С. №	Химикаты / Раактивы и растворители	М. масса.	Мол.	Экв.	Кол-во.
1	Нитрил 1032	538	0,0097	1	5,2 г
2	Лития алюминий гидроксид	38	0,0387	4	1,5 г
3	Тетрагидрофуран (ТГФ)				52 мл

В суспензию лития алюминийгидрата в сухом ТГФ в атмосфере аргона капельно добавляют при температуре 0° С продукт стадии-1 в ТГФ. Затем смеси позволяют нагреться до комнатной температуры и перемешивают при данной температуре в течении 20 часов (ТСХ). После этого охлаждают до 0° С, гасят реакцию насыщенным раствором сульфата натрия. Гашенную реакционную массу фильтруют через целитовые пластины, промывают этилацетатом. Смешанный фильтрат выпаривают при пониженном давлении для получения неочищенного продукта, который очищают с помощью колоночной хроматографии с силикагелем, используя 10% этилацетат в гексане для получения очищенного продукта **1033** (3,7 г, выход: 71%) в виде светло-коричневой жидкости, ВЭЖХ: 93,8 % . ¹Н ЯМР (400М Гц, CDCl₃): δ 0,87 (t, 6H, J = 6,8 Гц), 1,27 (м, 48H), 2,03 (q, 8H, J = 6,8 Гц), 2,60 (d, 2H, J = 4,0 Гц),

2,76 (t, 4H, $J = 6,4$ Гц), 5,31 (м, 8H). $^{13}\text{СЯМР}$ (100М Гц, CDCl_3): δ 14,1, 22,6, 25,6, 26,8, 27,1, 27,2, 29,3, 29,5, 29,6, 30,1, 31,5, 40,9, 45,2, 128,0, 130,1. ЖХ/МС: 543(M+).

5 Схема 2



Соединение 1003 (ALNY-192)

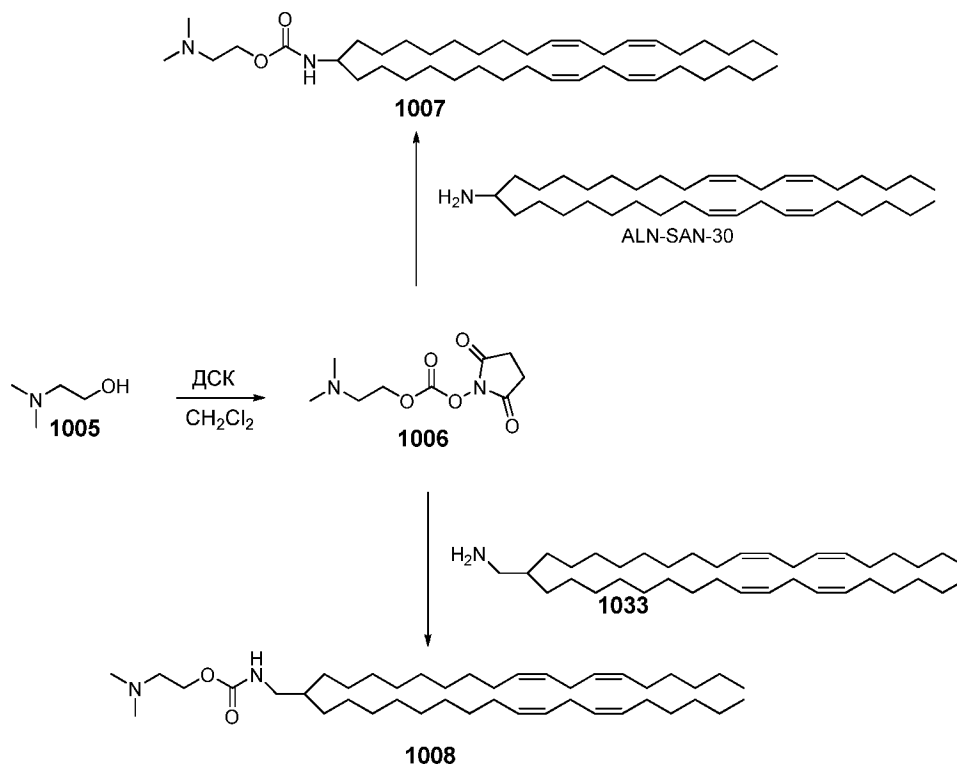
В раствор N,N'-дисуцинимидил карбоната (5,50 г, 21,5 ммоль) в CH_2Cl_2 (200 мл) добавляют капельно 3-диметиламино-1-пропанол (**1001**, 2,43 г, 23,6 ммоль). Полученную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Отобранные 50 мл раствора, Et_3N (0,822 мл; 5,90 ммоль) и ALN-SAN-30 (2,08 г, 3,93 ммоль) добавляют в реакционную смесь и перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь разбавляют CH_2Cl_2 и промывают насыщенным водным раствором NaHCO_3 . Органический слой высушивают безводным MgSO_4 , фильтруют и концентрируют. Сырье очищают с помощью колоночной хроматографией на силикагеле (0-5% MeOH в CH_2Cl_2) для получения соединения **1003** (1,66 г, 2,53 ммоль, 64%, $R_f = 0,22$ с 5% MeOH в CH_2Cl_2). ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ 5,30-5,41 (м, 8 H), 4,37 (d, $J = 8,0$ Гц, 1 H), 4,09 (t, $J = 6,0$ Гц, 2 H), 3,57 (brs, 1 H), 2,78 (t, $J = 6,0$ Гц, 4 H), 2,33 (t, $J = 8,0$ Гц, 2 H), 2,23 (s, 6 H), 2,02-2,06 (м, 8 H), 1,76-1,80 (м, 2 H), 1,27-

1,45 (м, 40 Н), 0,89 (t, $J = 8,0$ Гц, 6 Н). ^{13}C ЯМР (CDCl_3 , 100 МГц) δ 156,5, 130,4, 130,3, 128,2, 128,1, 63,2, 56,6, 51,4, 45,7, 35,7, 31,7, 29,9, 29,8, 29,7, 29,6, 29,5, 27,7, 27,5, 27,4, 26,0, 25,8, 22,8, 14,3. Молекулярная масса для $\text{C}_{43}\text{H}_{81}\text{N}_2\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ Расчетная 657,63, Обнаруженная 657,5.

5 Соединение 1004 (ALNY-200)

В раствор N,N'-дисуцинимидил карбоната (5,50 г, 21,5 ммоль) в CH_2Cl_2 (200 мл) добавляют капельно 3-диметиламино-1-пропанол (**1001**, 2,43 г, 23,6 ммоль). Полученную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Отобранные 50 мл раствора, Et_3N (0,697 мл; 5,00 ммоль) и амин **1033** (1,71 г, 3,15 ммоль,) добавляют в реакционную смесь и перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь разбавляют CH_2Cl_2 и промывают насыщенным водным раствором NaHCO_3 . Органический слой высушивают безводным MgSO_4 , фильтруют и концентрируют. Полученное сырье очищают методом колоночной хроматографией на силикагеле (0-5% MeOH в CH_2Cl_2) для получения соединения **1004** (1,14 г, 1,70 ммоль, 54%, $R_f = 0,13$ с 5% MeOH в CH_2Cl_2), молекулярная масса для $\text{C}_{44}\text{H}_{83}\text{N}_2\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ Расчетная 671,65, Обнаруженная 671,5.

Схема 3



Соединение 1007

В раствор N,N'-дисуцинимидил карбоната (5,50 г, 21,5 ммоль) в CH₂Cl₂ (200 мл) добавляют капельно 2-диметиламиноэтанол (**1005**, 2,37 г, 23,6 ммоль). Полученную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Отобранные 50 мл раствора, Et₃N (0,822 мл; 5,90 ммоль) и ALN-SAN-30 (2,07 г, 3,92 ммоль) добавляют в реакционную смесь и перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь разбавляют CH₂Cl₂ и промывают насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой высушивают безводным MgSO₄, фильтруют и концентрируют. Сырье очищают с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (0-5% MeOH в CH₂Cl₂) для получения соединения **1007** (1,78 г, 2,77 ммоль, 71%, 2 шага, R_f = 0,26 с 5% MeOH в CH₂Cl₂). Молекулярная масса для C₄₂H₇₉N₂O₂ (M+H)⁺ Расчетная 643,61, Обнаруженная 643,5.

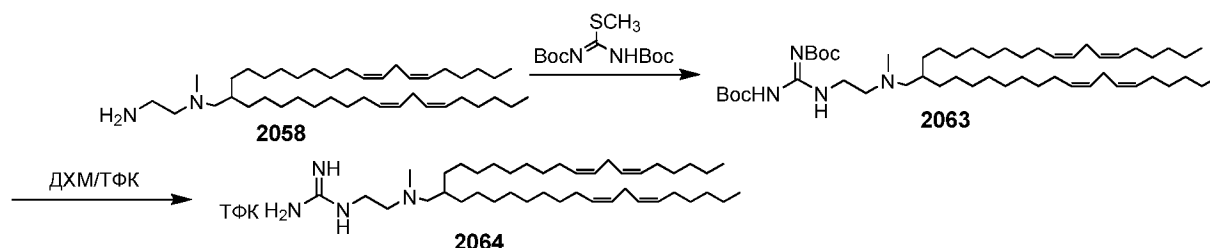
Соединение 1008

В раствор N,N'-дисуцинимидил карбоната (5,50 г, 21,5 ммоль) в CH₂Cl₂ (200 мл) добавляют капельно 2-диметиламиноэтанол (**1005**, 2,37 г, 23,6 ммоль). Полученную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Отобранные 50 мл раствора, Et₃N (0,697 мл; 5,00 ммоль) и **1033** (440 мг, 0,812 ммоль) добавляют в реакционную смесь и перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь разбавляют CH₂Cl₂ и промывают насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой высушивают безводным MgSO₄, фильтруют и концентрируют. Сырье очищают с помощью колоночной хроматографией на силикагеле (0-5% MeOH в CH₂Cl₂) для получения соединения **8** (332 мг, 0,505 ммоль, 62%, R_f = 0,30 с 5% MeOH в CH₂Cl₂). Молекулярная масса для C₄₃H₈₁N₂O₂ (M+H)⁺ Расчетная 657,63 Обнаруженная 657,5.

Пример 25: Синтез гуанидин-связанных липидов

Аналоги гуанидина

Синтез 2064

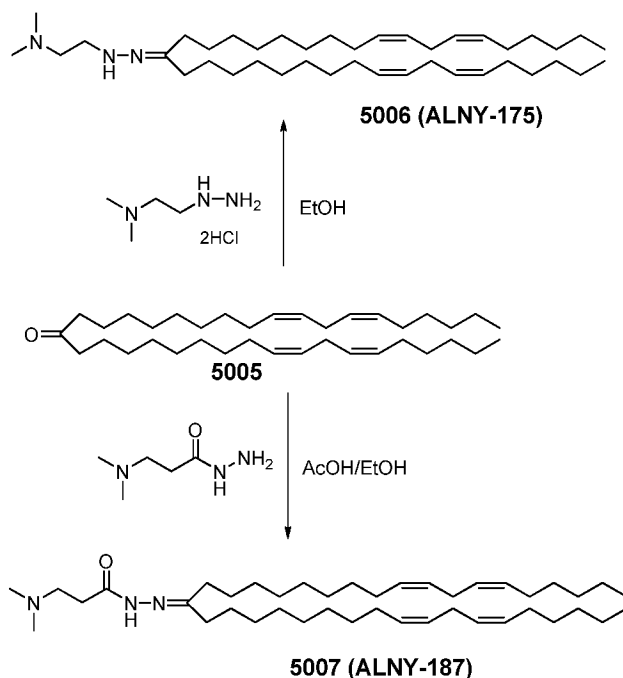


Синтез **2063**: Бис-Бок-С-метилизотиомочевина (3,4 г, 0,0118 моль) и триэтиламин (3,5 мл, 0,246 моль) добавляют в раствор **2058** (6,7 г, 0,0112 моль) в ДМФА/этилацетатной смеси при температуре 0° С. HgCl₂ (3,3 г, 0,0123 моль) добавляют в полученный гомогенный раствор при температуре 0° С и перемешивают при комнатной температуре в течение 1 часа. ТСХ указывает на отсутствие исходного материала. Реакционную массу разбавляют этилацетатом (100 мл). Фильтруют через целитовый слой и промывают этилацетатом. Фильтрат промывают водой (2x150 мл) и солевым раствором (200 мл). Мутный органический слой снова фильтруют через целитовый слой /230-400 меш силикагель/целит. Фильтрат выпаривают при пониженном давлении для получения неочищенного продукта, который очищают методом нейтральной хроматографии с глиноземом, в качестве элюента используют ДХМ/гексан. Получают продукт, элюированный 40% ДХМ в гексане, в виде желтой жидкости (выход 5,2 г, 55%). ¹H ЯМР (400М Гц, CDCl₃): 0,89 (t, 6H, J=6,8 Гц), 1,27 – 1,46 (м, 43H), 1,49 (s, 9H), 1,50(s,9H), 2,02 (q,8H, J₁=6,8 Гц, J₂=6,8 Гц), 2,12 (d, 2H, J=7,2 Гц), 2,16 (s,3H), 2,46 (t, 2H, J = 5,6 Гц), 2,77 (t, 4H, J=6 Гц), 3,47 (м, 2H), 5,30(м, 8H), 8,67 (s,1H),11,48 (9s,1H).

Синтез **2064 (ALNY-139)**: 10 мл ТФА в 60 мл дихлорметана медленно добавляют в раствор **2063** (5,2 г, 0,0062 моль) в 10 мл ДХМ при 0° С. После добавления реакцию перемешивают при комнатной температуре в течение 3 часов. ТСХ показывает отсутствие исходного материала. Излишки ТФА удаляют в вакууме для получения необходимого продукта в виде коричневой вязкой жидкости (5,3 г, 78%). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): 0,89 (t, 6H, J=6,8 Гц), 1,27 – 1,46 (м, 44H), 1,78 (s,1H), 2,02 (q,8H, J₁=6,4 Гц, J₂=6,8 Гц), 2,77 (t, 4H, J=6,4 Гц), 2,86 (s,3H), 2,92 – 3,01 (м, 2H), 3,27-3,39 (м,2H), 3,76-3,9 (м,2H), 5,30(м, 8H), 7,12 (м,2H), 8,41(м,1H), 10,02(м,3H). ¹³C ЯМР (100М Гц, CDCl₃): 14,0, 22,5, 25,6, 25,8, 26,0, 27,17, 27,19, 27,6, 29,3, 29,33, 29,5, 29,6, 31,0, 31,5, 33,9, 36,3, 41,0, 54,1, 55,2, 62,0, 62,19, 111,4, 114,3, 117,1, 119,9, 127,9, 127,95, 130,1, 130,2, 152,1, 155,0, 157,4, 161,2, 161,6, 161,96, 162,3. MS: 1093 (соль тетра ТФА).

ПРИМЕР 26: Синтез оксим- и гидразон- связанных липидов

30 Схема 1



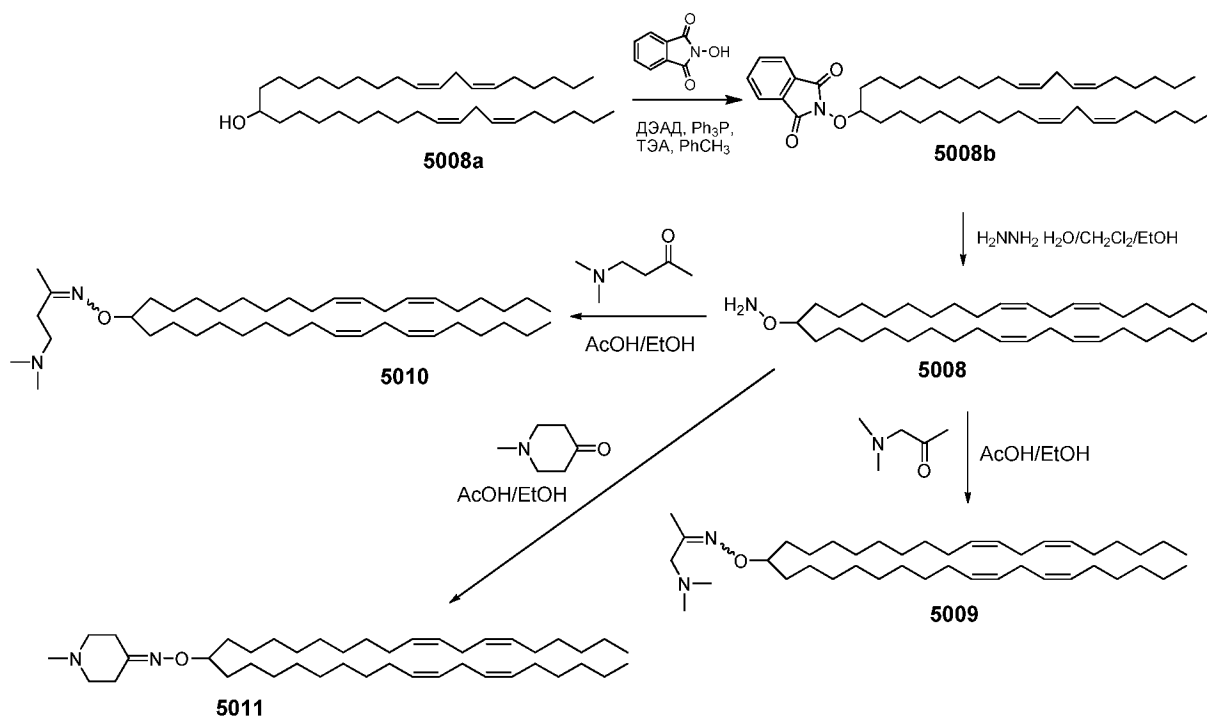
Детали эксперимента

Соединение 5006 (ALNY-175): в колбу, содержащую EtOH (50 мл) добавляют диметиламиноэтил гидразин дигидрохлорид (1,00 г, 5,70 ммоль) и кетон **5005** (2,00 г, 3,80 ммоль). Полученную смесь нагревают при 60°C в течении 16 часов. После добавления Et₃N (0,5 мл) реакционную смесь выпаривают. Остаток экстрагируют Et₂O, насыщают водным раствором NaHCO₃ и органический слой высушивают безводным MgSO₄, фильтруют и концентрируют. Полученное сырье очищают с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (CH₂Cl₂:MeOH:NH₃ aq. = 95:5:0,5, R_f = 0,29) для получения соединения **3** (1,78 г, 2,91 ммоль, 76%). Молекулярная масса для C₄₁H₇₈N₃ (M+H)⁺ Расчетная 612,62, Обнаруженная 612,5.

Соединение 5007 (ALNY-187): Смешивают 3-диметиламино-пропионовой кислоты гидразид (Ryan Scientific, 500 мг, 3,89 ммоль) в EtOH (10 мл) и дилинолеил кетон **5005** (1,74 г, 3,31 ммоль) в EtOH (20 мл). Добавляют в раствор уксусную кислоту (0,038 мл, 0,662 ммоль) и нагревают реакционную смесь при 65° C в течение 5 часов. После добавления Et₃N (0,5 мл), выпаривают реакционную смесь. Остаток экстрагируют CH₂Cl₂ и насыщают водным раствором NaHCO₃. Органический слой высушивают MgSO₄, фильтруют и концентрируют. Сырье очищают с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (CH₂Cl₂:MeOH:NH₃водн. = 95:5:0,5, R_f = 0,30) для получения соединения **5007** (1,40 г,

2,19 ммоль, 66%). Молекулярная масса для $C_{42}H_{78}N_3O(M+H)^+$ Расчетная 640,61, Обнаруженная 640,5.

Схема 2.



- 5 **Соединение 5008b**: в раствор **5008a** (30 г, 56,8 ммоль) в толуоле добавляют в среде аргона N-гидроксифталиимид (13,9 г, 85 ммоль) и ТЭС (22,30 г, 85 ммоль). Реакционную массу охлаждают до $-5^\circ C$, добавляют ТЭА (11,84 мл), а затем ДЭАД (13,14 мл). Реакционную массу перемешивают в течении 12 часов при комнатной температуре (ТСХ). Затем фильтруют через целитовую пластину. Фильтрат выпаривают при пониженном давлении для
- 10 получения неочищенного продукта, который затем очищают с помощью хроматографии на силикагеле для получения очищенного продукта, который элюируют 3% диэтиловым эфиром и гексаном для получения продукта **5008b** (22,90 г, 60,50%) в виде светло-желтой жидкости
- 1H ЯМР (400МГц, $CDCl_3$): δ 0,90 (6H, t, $J = 7,2$ Гц), 1,2-1,4 (34H, м), 1,66-1,70 (4H, м), 2,03-2,08 (8H, м), 2,78 (4H, t, $J = 12,8$ Гц), 4,22 (1H, м), 5,29-5,43 (8H, м), 7,74-7,76 (2H, м), 7,83-7,85 (2H, м).
- 15 ^{13}C ЯМР (100МГц, $CDCl_3$): δ 14,3, 22,5, 24,9, 25,6, 27,2, 27,20, 29,3, 29,3, 29,5, 29,5, 29,6, 29,7, 31,5, 32,4, 88,3, 123,3, 127,9, 129,0, 130,1, 134,3, 164,3. МС: Молекулярная масса для $C_{45}H_{71}NO_3$ Расчетная 673,54, Обнаруженная: 674,55(M+H).

Соединение 5010 (ALY-SAN-031): (2,36 г, 3,50 ммоль) обрабатывают моногидрат гидразином (0,424 мл, 5,60 ммоль) в CH_2Cl_2 (36 мл) и EtOH (4 мл) в течение 2 часов. После фильтрации полученного белого осадка, фильтрат концентрируют. Остаток экстрагируют Et_2O и насыщают водным раствором NaHCO_3 и органический слой высушивают MgSO_4 , фильтруют и концентрируют. Неочищенный **5008** используют для следующего этапа без дополнительной очистки. $R_f = 0,44$ (10% EtOAc в гексане). $R_F = 0,44$ (10% этилацетата в гексане). Молекулярная масса для $\text{C}_{37}\text{H}_{70}\text{NO}$ (M+H)⁺ Расчетная 544,55, Обнаруженная 544,2.

Соединение 5008 растворяют в EtOH (30 мл); в раствор добавляют 4-(диметиламино)бутан-2-один (Matrix Scientific, 500 мг, 4,34 ммоль) и уксусную кислоту (0,040 мл, 0,70 ммоль).

Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 14 часов. После добавления Et_3N (0,5 мл), реакционную смесь выпаривают. Остаток экстрагируют Et_2O и насыщенным водным раствором NaHCO_3 и органический слой высушивают MgSO_4 , фильтруют и концентрируют. Сырье очищают с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (гексан:этилацетат = 1:1) для получения соединения **5010** в виде смеси *E/Z*-изомеров (1,90 г, 2,96 ммоль, 85%, 2 шага, $R_f = 0,39, 0,21$ разработанный с гексан:EtOAc = 1:1). Молекулярная масса для $\text{C}_{43}\text{H}_{81}\text{N}_2\text{O}$ (M+H)⁺ Расчетная 641,63, Обнаруженная 641,5.

Соединение 5009: Соединение **5006** (800 мг, 1,47 ммоль) растворяют в EtOH (15 мл); в полученный раствор добавляют (диметиламино)ацетон (Aldrich, 0,220 мл, 1,91 ммоль) и уксусную кислоту (0,017 мл, 0,294 ммоль) и затем реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 14 часов. После добавления Et_3N (0,5 мл), реакционную смесь выпаривают. Остаток экстрагируют Et_2O и насыщают водным раствором NaHCO_3 и органический слой высушивают MgSO_4 , фильтруют и концентрируют. Сырье очищают с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (гексан: EtOAc = 9:1) для получения соединения **5009** (868 мг, 1,38 ммоль, 94%, $R_f = 0,22$ разработан с гексан: EtOAc = 9:1).

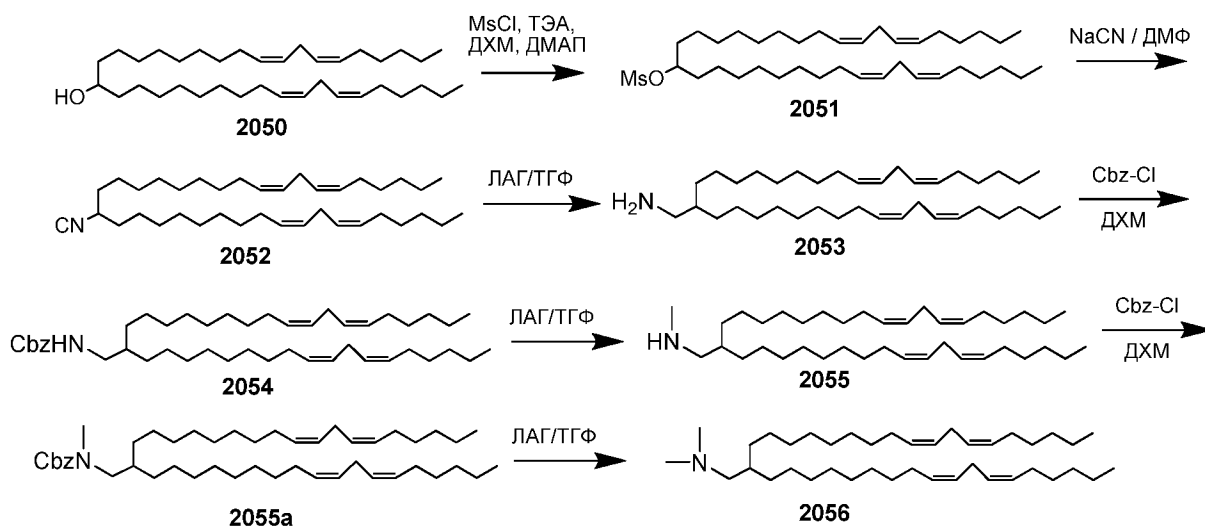
Молекулярная масса для $\text{C}_{42}\text{H}_{79}\text{N}_2\text{O}$ (M+H)⁺ Расчетная 627,62, Обнаруженная 627,5.

Соединение 5011: Соединение **5006** (1,09 г, 2,00 ммоль) растворяют в EtOH (20 мл); в полученный раствор добавляют 1-метил-4-пиперидон (Aldrich, 0,320 мл, 2,60 ммоль) и уксусную кислоту (0,40 мл, 0,400 ммоль) и затем реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 14 часов. После добавления Et_3N (0,5 мл), реакционную смесь выпаривают. Остаток экстрагируют Et_2O и насыщают водным раствором NaHCO_3 .

Органический слой высушивают MgSO_4 , фильтруют и концентрируют. Сырье очищают с помощью колоночной хроматографии на силикагеле ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH} = 97:3:0,3$) для получения соединения **5011** (1,11 г, 1,74 ммоль, 87%, $R_f = 0,20$ при $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH} = 97:3:0,3$). Молекулярная масса для $\text{C}_{43}\text{H}_{79}\text{N}_2\text{O}$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺ Расчетная 639,62, Обнаруженная 639,5.

5 ПРИМЕР 27: Синтез прочих липидов

Синтез соединения **2056** (ALNY-181)



Синтез **2051**: в раствор **2004** (50 г, 95 ммоль) в ДХМ (400 мл) добавляют в среде аргона ТЭА (53 мл, 378 ммоль) и ДМАП (1,2 г, 9,5 ммоль) и перемешивают при комнатной температуре в атмосфере аргона. Реакционную массу охлаждают до -5°C , медленно добавляют раствор мезил хлорида (15 мл, 190 ммоль) в ДХМ (100 мл) при температуре -5°C , после чего оставляют нагреваться до комнатной температуры. Спустя 30 минут (ТСХ), реакционную массу гасят ледяной водой (20 мл). Органический слой разделяют, промывают 1N HCl (30 мл), водой, соляным раствором, высушивают сульфатом натрия и выпаривают при пониженном давлении для получения чистого продукта (55 г, 95,5%), в виде желтой жидкости. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 0,89 (t, 6H, $J = 6,8$), 1,2-1,5 (м, 36H), 1,67 (м, 4H), 2,05 (q, 8H, $J_1 = 6,8$, $J_2 = 6,8$), 2,77 (t, 4H, $J = 6,4$), 2,99 (s, 3H), 4,71(м, 1H) и 5,36 (м, 8H).

Синтез **2052**: к взболтанному раствору цианида натрия (1,70 г, 0,0330 моль) в ДМФА медленно добавляют соединение **2051** (10 г, 0,0165 моля) в ДМФА (100 мл) и нагревают до 55°C в течение 24 часов (ТСХ). Полученную смесь охлаждают до комнатной температуры, разбавляют водой и экстрагируют этилацетатом несколько раз. Смешанные органические

слои промывают водой, соляным раствором, высушивают сульфатом натрия и выпаривают при пониженном давлении для получения неочищенного продукта, который очищают с помощью хроматографии на силикагеле с использованием 1% эфир/гексана для получения продукта в виде светло-желтой жидкости (5,80 г, 62%): ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 0,87 (t, 6H, $J = 6,8$ Гц), 1,25 (м, 38H), 1,52 (м, 4H), 2,03 (q, 8H, $J = 6,8$ Гц, $J = 6,8$ Гц), 2,47 (м, 1H), 2,76 (t, 4H, $J = 6,4$ Гц), 5,32 (м, 8H).

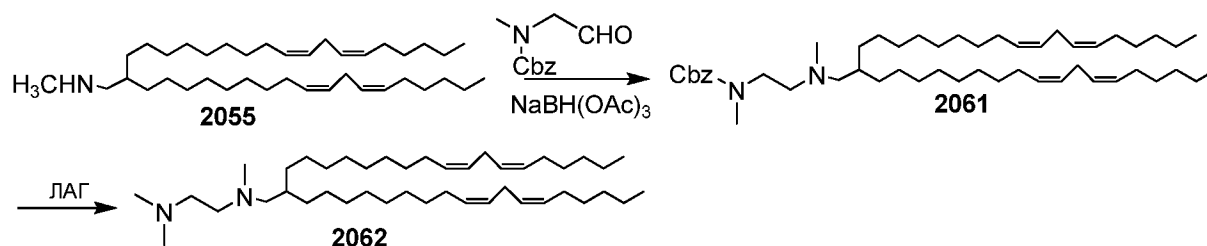
Синтез **2053**: в охлажденную суспензию LiAlH_4 (1,50 г, 0,0387 моль) в ТГФ (52 мл) при температуре 0°C добавляют в среде аргона соединение **2052** (5,2 г, 0,0097 моль) в ТГФ капельно. После добавления, смесь оставляют нагреваться до комнатной температуры и перемешивают в течение 20 часов (ТСХ). Охлаждают до 0°C и гасят сначала насыщенным раствором сульфата натрия (10 мл), а затем этилацетатом. Фильтруют через целитовую пластину и промывают этилацетатом. Смешанный органический фильтрат выпаривают при пониженном давлении до получения неочищенного продукта, который очищают с помощью хроматографии на силикагеле с использованием 10% этилацетата в гексане; получают конечный продукт в виде светло-коричневой жидкости (3,70 г, 71%). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 0,87 (t, 6H, $J = 6,8$ Гц), 1,27 (м, 48H), 2,03 (q, 8H, 6,8 Гц, 6,8 Гц), 2,60 (d, 2H, $J = 4,0$ Гц), 2,76 (t, 4H, $J = 6,4$ Гц), 5,31 (м, 8H), ^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3): δ 14,1, 22,6, 25,6, 26,8, 27,1, 27,2, 29,3, 29,5, 29,6, 30,1, 31,5, 40,9, 45,2, 128,0, 130,1. Масса 543 (M+).

Синтез **2054**: в раствор с соединением 2053 (45 г, 0,083 моль) в ДХМ (450 мл) в среде аргона при температуре 0°C добавляют капельно 2,6-лутидин (19,3 мл, 0,166 моль) и затем бензилхлорформиата (12,1 мл, 0,0847 моль). Нагревают полученную смесь до 20°C и перемешивают в течение одного часа при постоянной температуре (ТСХ). Затем полученную смесь разводят ДХМ (200 мл), промывают 10% лимонной кислотой (2x200 мл), водой, соляным раствором, высушивают безводным сульфатом натрия и выпаривают при пониженном давлении для получения неочищенного продукта, который очищают с помощью хроматографии на силикагеле с использованием 3% эфир/гексана для получения конечного продукта в виде светло-коричневой жидкости (36 г, 64%): ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 0,87 (t, 6H, $J = 6$ Гц), 1,28 (м, 44H), 2,02 (q, 8H, $J_1 = 6,8$ Гц, $J_2 = 6,8$ Гц), 2,76 (t, 4H, $J = 6,4$ Гц), 3,11 (t, 2H, $J = 5,6$ Гц), 4,67 (s, 1H), 5,18 (s, 2H), 5,30 (м, 8H), 7,31 (м, 4H).

- Синтез **2055**: Раствор соединения **2054** (36 г, 0,0533 моль) в ТГФ добавляют капельно в среде аргона при температуре 0° С в суспензию литий алюминий гидрида (4,05 г, 0,1066 моль) в ТГФ (360 мл). После добавления данную смесь нагревают до комнатной температуры и перемешивают в течении 15 часов (ТСХ). Реакционную массу охлаждают до 0° С и гасят
- 5 сначала насыщенным раствором сульфата натрия, а затем этилацетатом. Фильтруют через целитовую пластину и промывают этилацетатом. Объединенный фильтрат выпаривают и очищают силикагелем, используя 100% метанола, для получения конечного продукта (26 г, 87%): ¹Н ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 0,87 (t, 6Н, J = 6,8 Гц), 1,27 (м, 42Н), 2,03 (q, 8Н, J₁ = 6,8 Гц, J₂ = 6,8 Гц), 2,45 (s, 3Н), 2,49 (d, 2Н, J = 6 Гц), 2,76 (t, 4Н, J = 6,4 Гц), 5,30 (м, 8Н).
- 10 Синтез **2055a**: Соединение **2055** (4 г, 0,0072 ммоль) растворяют в ДХМ (40 мл) в среде аргона и охлаждают до 0° С. В полученный раствор по каплям добавляют сначала 2,6-лутидин (1,7 мл, 0,0144 моль), а затем бензилхлорформиат (1,0 мл, 0,0074 моль). Раствор оставляют нагреться до 20° С и перемешивают в течение одного часа (ТХС). Затем разбавляют ДХМ (200 мл), промывают 10% лимонной кислотой (2x200 мл), водой и соевым раствором.
- 15 Органический слой высушивают безводным сульфатом натрия и выпаривают при пониженном давлении для получения неочищенного продукта, который очищают силикагелем с использованием 3% эфир/гексана, чтобы получить конечный продукт (3,80 г, 76%). ¹Н ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 0,87(t, 6Н, J=6,8 Гц), 1,20 (м, 44Н), 2,02 (q, 8Н, J₁ = 6,8 Гц, J₂ = 6,8 Гц), 2,76 (t, 4Н, J = 6,4 Гц), 2,89 (d, 3Н, J = 6 Гц), 3,14 (м, 2Н), 5,12 (s, 2Н), 5,30 (м, 8Н),
- 20 7,26 (м, 4Н).
- Синтез **2056**: Раствор **2055a** (3,80 г, 0,0055 моль) в ТГФ (38 мл) добавляют капельно в среде аргона при температуре 0° С в суспензию литий алюминий гидрида (0,52 г, 0,0138 моль) в ТГФ. После добавления данной смеси позволяют нагреться до комнатной температуры и перемешивают в течении 15 часов (ТСХ). Реакционную массу охлаждают до 0°С и гасят
- 25 сначала насыщенным раствором сульфата натрия, а затем этилацетатом. Всю массу фильтруют через целитовую пластину и промывают этилацетатом. Объединенные фильтраты выпаривают при пониженном давлении для получения неочищенного продукта, который очищают с помощью хроматографии с силикагелем, используя 100% метанол, для получения конечного продукта в виде бесцветной жидкости (2,20 г, 70%) ¹Н ЯМР (400М Гц, CDCl₃): δ
- 30 0,87 (t, 6Н, J = 6,8 Гц), 1,21 (м, 44Н), 2,03(q, 8Н, J = 6,8 Гц, J = 6,4 Гц), 2,18 (s, 6Н), 2,76 (t, 4Н,

$J = 6,4$ Гц), 5,30 (м, 8H). ^{13}C ЯМР (100М Гц, CDCl_3): δ 14,0, 22,4, 25,5, 26,5, 27,0, 27,1, 29,2, 29,4, 29,6, 30,0, 31,4, 32,1, 35,6, 45,9, 64,8, 127,8, 130,0. ELSD (испарительный детектор светорассеивания): 99,0% Масса: 570,2(M⁺).

Синтез 2062 (ALNY-141):



5

Синтез **2061**: к раствору **2055** (5 г, 0,0089 моль) в 100 мл ДХМ добавляют в среде аргона при температуре 0° С NaBH(OAc)_3 (2,30 г, 0,0106 моль) перемешивают в течение 20 минут. К реакционной массе в течение 45 минут медленно добавляют альдегид (1,70 г, 0,0082 моль) в 700 мл дихлорметана. После добавления реакционную массу перемешивают при комнатной температуре в течение 15-20 минут. ТХС показывает отсутствие исходного материала. Реакционную массу промывают насыщенным NaHCO_3 (2x500 мл) и водой (500 мл). Водный слой повторно экстрагируют ДХМ (500 мл). Смешанный органический слой промывают соляным раствором (500 мл). Затем органический слой высушивают Na_2SO_4 , фильтруют и концентрируют. Полученное сырье очищают с помощью хроматографии на силикагеле; в качестве элюента используют гексан/диэтиловый эфир. Полученный продукт элюируют 8% эфиром в гексане в виде коричневой жидкости (выход 6,40 г, 96%): ^1H ЯМР: (400М Гц, CDCl_3): 0,89 (t, 6H, $J = 7,2$ Гц), 1,26 – 1,43 (м, 40H), 1,85 (м, 1H), 2,06 (q, 8H, $J_1 = 6,8$ Гц, $J_2 = 6,8$ Гц), 2,15 (s, 2H), 2,20 (s, 3H), 2,45 (м, 2H), 2,77 (t, 4H, $J = 6$ Гц), 2,95 (s, 3H), 3,35 (м, 2H), 5,12 (s, 2H), 5,32 (м, 8H), 7,35 (м, 5H).

10

15

20

25

Синтез **2062**: в суспензию литий алюминий гидрида (0,751 г, 0,0198 моль) в ТГФ добавляют капельно в среде аргона при температуре 0°С раствор **2061** (5,7 г, 0,0076 моль) в ТГФ. После добавления данную смесь оставляют нагреваться до комнатной температуры и перемешивают в течении 15 часов (ТСХ). Реакционную массу охлаждают до 0° С и гасят сначала насыщенным раствором сульфата натрия (50 мл), а затем этилацетатом (100 мл). Полученную массу фильтруют через целитовую пластину и промывают этилацетатом. Объединенные фильтраты выпаривают при пониженном давлении для получения неочищенного продукта, очищают его с помощью хроматографии с силикагелем с

использованием ДХМ/етилацетата/хлороформа/метанола в качестве элюента. Продукт элюируют 3% хлороформом в метаноле для получения конечного продукта в виде коричневой жидкости (выход 3,80 г, 80%) ^1H ЯМР: (400 МГц, CDCl_3): 0,89 (t, 6H, $J=6,8$ Гц), 1,26-1,37 (м, 40H), 1,42 (м, 1H), 2,06 (q, 8H, $J_1=6,8$ Гц, $J_2=6,8$ Гц), 2,15 (d, 2H, $J=7,2$ Гц), 2,20 (s, 3H), 2,29 (s, 6H), 2,45 (s, 4H), 2,78 (t, 4H, $J=6,4$ Гц), 5,36 (м, 8H). ^{13}C ЯМР: (100 МГц, CDCl_3): 14,1, 22,6, 25,6, 26,6, 27,2, 27,22, 28,9, 29,3, 29,6, 29,7, 30,1, 31,5, 32,2, 35,8, 43,2, 45,7, 56,2, 57,2, 63,3, 127,9, 130,2. ВЭЖХ-ДИСР (детектор испарительного светорассеивания): 100%
 Масса: 627,53

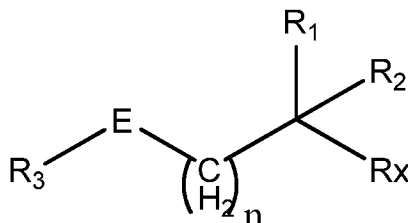
- 10 Различные варианты экспериментов, описанные выше, могут быть скомбинированы чтобы обеспечить дальнейшие варианты. Все публикации патентов США, заявок на патент США, иностранные патенты, иностранные патентные заявки и непатентные публикации, упомянутые в данной спецификации и/или перечисленные в листе заявок (Application Data Sheet), включают, не ограничиваясь представлены здесь в качестве ссылок, в полном объеме.
- 15 Аспекты вариантов могут быть модифицированы, если необходимо использовать концепции различных патентов, заявок и публикаций чтобы обеспечить дальнейшие варианты.

 Те или иные изменения могут быть выполнены в вариантах, в свете информации, подробно изложенной выше. Таким образом, в изобретениях, заявленных в последующем, используемые здесь термины должны рассматриваться не для ограничения таких заявок в конкретных областях/вариантах открытий, представленных в описании изобретения, а для того, чтобы включить все возможные варианты при рассмотрении полного спектра аналогичных вариантов, к которым такие заявленные открытия имеют отношение. Соответственно, заявленные изобретения не ограничиваются данным открытием.

20

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Липид, имеющий формулу



XXXVIII

5 где

E — это O, S, N(Q), C(O), N(Q)C(O), C(O)N(Q), (Q)N(CO)O, O(CO)N(Q), S(O), NS(O)₂N(Q), S(O)₂, N(Q)S(O)₂, SS, O=N, арил, гетероарил, циклический или гетероциклический;

10 Q — это H, алкил, ω-аминоалкил, ω-(замещенный) аминоалкил, ω- фосфоалкил или ω-тиофосфоалкил;

15 R₁ и R₂ и R_x являются каждый самостоятельно для каждого проявления H, произвольно замещенный C₁-C₁₀ алкил, произвольно замещенный C₁₀-C₃₀ алкил, произвольно замещенный C₁₀-C₃₀ алкенил, произвольно замещенный C₁₀-C₃₀ алкинил, произвольно замещенный C₁₀-C₃₀ ацил или линкер лиганд; при условии, что по крайней мере один из R₁, R₂ и R_x не является H;

20 R₃ —это H, произвольно замещенный C₁-C₁₀ алкил, произвольно замещенный C₂-C₁₀ алкенил, произвольно замещенный C₂-C₁₀ алкинил, алкилгетероцикл, алкилфосфат, алкилфосфоротиоат, алкилфосфородитионат, алкилфосфонаты, алкиламины, гидроксиалкилы, ω-аминоалкилы, ω - (замещенные) аминоалкилы, ω- фосфоалкилы, ω-тиофосфоалкилы, произвольно замещенный полиэтиленгликоль (ПЭГ, мм 100-40 К), произвольно замещенный мПЭГ (мм 120-40 К), гетероарил, гетероцикл, или линкер-лиганд;

n равняется 0, 1, 2, или 3.

2. Липидная частица для доставки терапевтического агента, содержащая липид по п. 1.

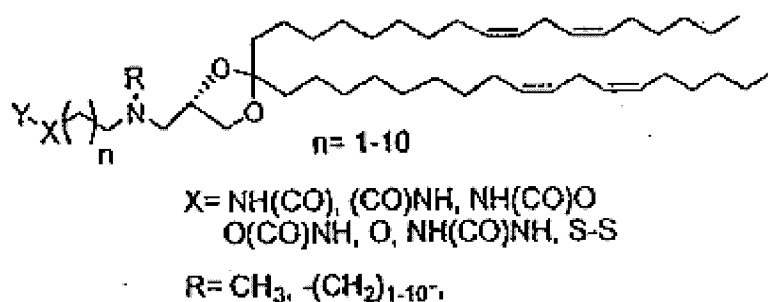
25

3. Липидная частица по п. 2, отличающаяся тем, что дополнительно содержит нейтральный липид.

4. Липидная частица по п. 2, отличающаяся тем, что указанная частица дополнительно содержит стерин.
- 5 5. Липидная частица по п. 4, отличающаяся тем, что стерин представляет собой холестерин.
6. Липидная частица по любому из п.п. 1-5, отличающаяся тем, что указанная липидная частица дополнительно содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ) или ПЭГ-модифицированный липид.
- 10 7. Липидная частица по любому из п.п. 1-6, отличающаяся тем, что указанная липидная частица дополнительно содержит:
 - а. нейтральный липид, выбранный из дистеароилфосфатидилхолина, дипальмитоилфосфатидилхолина, пальмитоилолеилфосфатидилхолина, диолеилфосфатидилэтаноламина и сфингомиелина;
 - 15 б. стерин; и
 - с. полиэтиленгликоль-димиристоилглицерин (ПЭГ-ДМГ),
 в молярном соотношении около 20-60% липида по любому из п.п. 1-12 : 5-25% нейтрального
- 20 липида : 25-55% стерина : 0,5-15% полиэтиленгликоль-димиристоилглицерола (ПЭГ-ДМГ).
8. Липидная частица по любому из п.п. 1-7, дополнительно содержащая терапевтическое средство.
- 25 9. Липидная частица по п. 8, отличающаяся тем, что терапевтическое средство является нуклеиновой кислотой.
10. Липидная частица по п. 9, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота является плазмидой.

11. Липидная частица по п. 9, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота является иммуностимулирующим олигонуклеотидом.
12. Липидная частица по п. 9, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота выбрана из группы, состоящей из миРНК, антисмыслового олигонуклеотида, микроРНК, антагомира, аптамера и рибозима.
13. Липидная частица по п. 12, где нуклеиновая кислота является миРНК.
14. Липидная частица по п. 8, где указанное терапевтическое средство является мРНК.
15. Липидная частица по п. 7, отличающаяся тем, что молярное соотношение составляет 52% липида по любому из п.п. 1-12 : 5% нейтрального липида : 30% стерина : 13% ПЭГ-ДМГ.
16. Фармацевтическая композиция для доставки терапевтического агента, содержащая липидную частицу по любому из п.п. 1-12 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель.
17. Применение липидной частицы по любому из п.п. 9-14 для модуляции экспрессии гена-мишени в клетке.
18. Применение по п. 17, отличающееся тем, что терапевтическое средство липидной частицы выбрано из миРНК, антагомира, антисмыслового олигонуклеотида и плазмиды, которая экспрессирует миРНК, рибозима, аптамера или антисмыслового олигонуклеотида.
19. Применение липидной частицы по п. 9 для модулирования экспрессии гена-мишени в клетке, отличающееся тем, что нуклеиновая кислота является плазмидой, которая кодирует полипептид или его функциональный вариант или фрагмент, таким образом, что экспрессия полипептида или функционального варианта или его фрагмента увеличивается.

20. Применение по любому из п.п. 17-19, отличающееся тем, что ген-мишень выбирают из группы, состоящей из фактора VII, Eg5, PCSK9, TPX2, апоВ, SAA, TTR, RSV, PDGF бета-гена, Erb-B гена, Src гена, CRK гена, Grb2 гена, RAS гена, MEKK гена, JNK гена, RAF гена, ERK1/2 гена, PCNA (p21) гена, MYB гена, JUN гена, FOS гена, BCL-2 гена, циклин D гена, VEGF гена, EGFR гена, циклин A гена, циклин E гена, WNT-1 гена, бета-катенина гена, C-MET гена, PKC гена, NFkB гена, STAT3 гена, сурвивина гена, HER2/ Neu гена, SORT1 гена, XBP1 гена, топоизомеразы I гена, топоизомеразы II альфа-гена, p73 гена, p21 (WAF1/CIP1) гена, p27 (KIP1) гена, гена PPM1D, RAS гена, кавеолин I гена, MIB I гена, MTA1 гена, M68 гена, генов супрессоров опухолей и p53 гена супрессора опухоли.



$Y = (\text{CH}_2)_n\text{-GalNAc, Манноза, Лактоза, Глюкоза, Фукоза}$

$Y = (\text{CH}_2)_n\text{-(GalNAc)}_2, (\text{Манноза})_2, (\text{Лактоза})_2, (\text{Глюкоза})_2, (\text{Фукоза})_2$

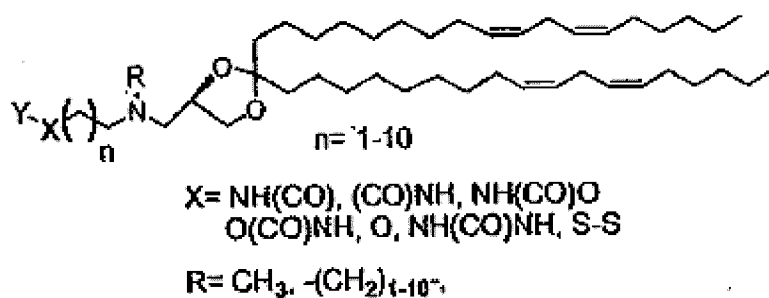
$Y = (\text{CH}_2)_n\text{-(GalNAc)}_3, (\text{Манноза})_3, (\text{Лактоза})_3, (\text{Глюкоза})_3, (\text{Фукоза})_3$

$Y = (\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_a\text{-GalNAc, Манноза, Лактоза, Глюкоза, Фукоза}$

$Y = (\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_a\text{-(GalNAc)}_2, (\text{Манноза})_2, (\text{Лактоза})_2, (\text{Глюкоза})_2, (\text{Фукоза})_2$

$Y = (\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_a\text{-(GalNAc)}_3, (\text{Манноза})_3, (\text{Лактоза})_3, (\text{Глюкоза})_3, (\text{Фукоза})_3$

$a = 1-100$



$Y = (\text{CH}_2)_n\text{-GalNAc, Манноза, Лактоза, Глюкоза, Фукоза}$

$Y = (\text{CH}_2)_n\text{-(GalNAc)}_2, (\text{Манноза})_2, (\text{Лактоза})_2, (\text{Глюкоза})_2, (\text{Фукоза})_2$

$Y = (\text{CH}_2)_n\text{-(GalNAc)}_3, (\text{Манноза})_3, (\text{Лактоза})_3, (\text{Глюкоза})_3, (\text{Фукоза})_3$

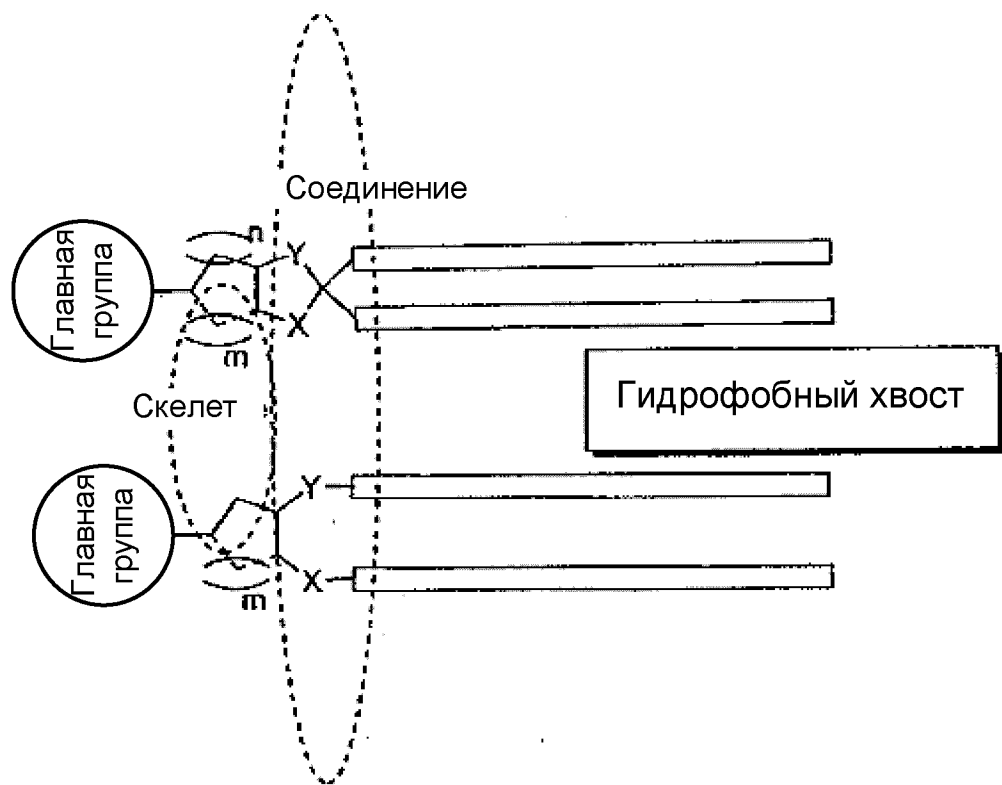
$Y = (\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_a\text{-GalNAc, Манноза, Лактоза, Глюкоза, Фукоза}$

$Y = (\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_a\text{-(GalNAc)}_2, (\text{Манноза})_2, (\text{Лактоза})_2, (\text{Глюкоза})_2, (\text{Фукоза})_2$

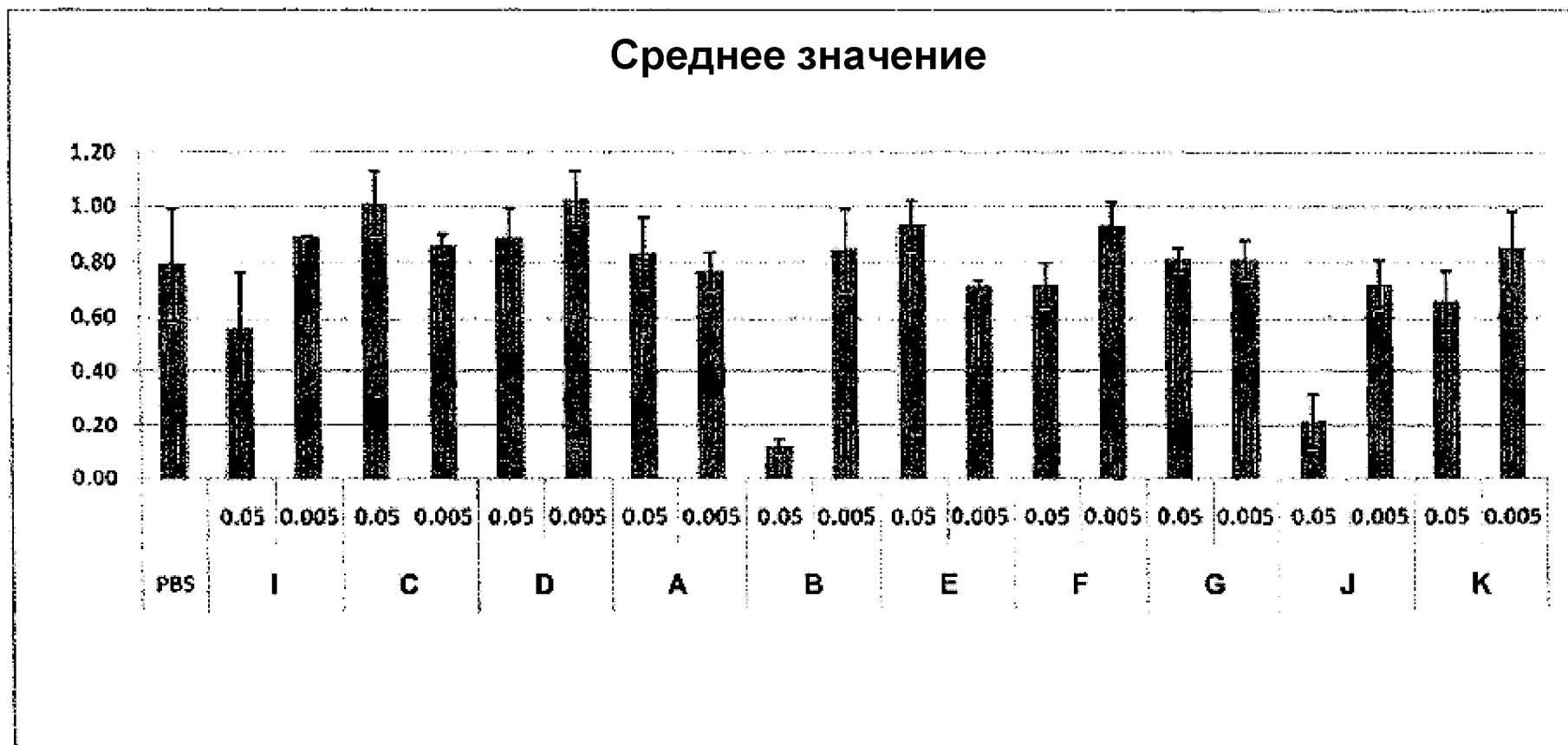
$Y = (\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_a\text{-(GalNAc)}_3, (\text{Манноза})_3, (\text{Лактоза})_3, (\text{Глюкоза})_3, (\text{Фукоза})_3$

$a = 1-100$

Фигура 1



Фигура 2



Фигура 3

Соединение	Структура	ED50	pKa
ALNY-190		0.47	6.49
ALNY-192		2.1	7.21
ALNY-200		>5.00	7.57
ALNY-202		0.12	6.52
ALNY-175		2.7	
ALNY-149		0.1	5.81
ALNY-160		2.00	5.18
ALNY-201		>5.0	8.02
ALNY-141		0.14	6.62
ALNY-181		0.25	

Фигура 4

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202190028

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

A61K 47/28 (2006.01)
A61K 31/01 (2006.01)
A61K 31/015 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
C12N 15/88 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

A61K 31/7088, 31/7115, 31/713, C12N 15/09, 15/11, 15/113

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	US 2005/124069 A1 (CHU YONGLIANG et al.) 09.06.2005, реферат, параграфы [0005]-[0017], [0019]-[0074], [0097]-[0336], примеры, формула	1-20
Y	US 5744625 A (THE REAGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 28.04.1998, реферат, колонка 2, строка 35-колонка 3, строки 15, 45-колонка 4, строка 30, примеры, формула	1-20
Y	WO 2006/138380 A2 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY et al.) 28.12.2006, реферат, параграфы [0005]-[0008], [0055]-[0072], [0076]-[0087], [0120], [0123]-[0213], [0234], [0238]-[0242], [0249]-[0263], формула	1-20
Y	WO 2008/079982 A2 (CENTOCOR, INC et al.) 03.07.2008, реферат, страница 24, строка 20- страница 37, строка 22, примеры, формула	1-20

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"Р" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

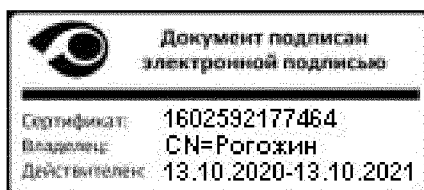
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **07/09/2021**

Уполномоченное лицо:

Начальник Управления экспертизы



Д.Ю. Рогожин