

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202193253 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.30

(22) Дата подачи заявки
2020.06.26

(51) Int. Cl. *A61K 47/69* (2017.01)
A61K 47/56 (2017.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 31/4164 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(54) МИЦЕЛЛЯРНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/867,097; 63/043,693

(32) 2019.06.26; 2020.06.24

(33) US

(86) PCT/IB2020/056093

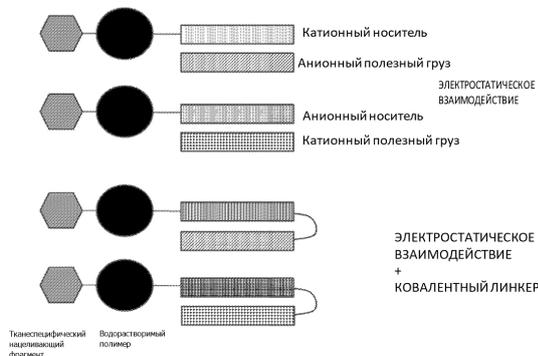
(87) WO 2020/261227 2020.12.30

(71) Заявитель:
БАЙОРКЕСТРА КО., ЛТД. (KR)

(72) Изобретатель:
Рю Джин-Хеоб, Лим Ю На, Мин Хён
Су, Кох Хан Сеок, Ким Даэ Хун, Чо
Хён-Джеонг (KR)

(74) Представитель:
Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Прищепный С.В.,
Парамонова К.В., Джермакян Р.В.,
Христофоров А.А., Угрюмов В.М.,
Костюшенкова М.Ю. (RU)

(57) Изобретение относится к молекулам катионного носителя, содержащим (i) водорастворимый полимер, (ii) положительно заряженный носитель и (iii) фрагмент адъюванта, причем при смешивании молекулы катионного носителя с анионной полезной нагрузкой (например, антисмысловым олигонуклеотидом), который электростатически взаимодействует с молекулой катионного носителя, полученная композиция самостоятельно собирается в мицеллу, заключающую в своей сердцевине анионную полезную нагрузку. Молекулы катионного носителя могут также содержать тканеспецифический нацеливающий фрагмент, который располагается на поверхности мицеллы. Изобретение также относится к мицеллам, содержащим молекулы катионного носителя данного изобретения, способам производства молекул катионного носителя и мицелл, фармацевтическим композициям, содержащим мицеллы, а также к способам лечения заболеваний или патологических состояний, включающих в себя введение мицелл нуждающемуся в этом субъекту.



A1

202193253

202193253

A1

МИЦЕЛЛЯРНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ,

ПРЕДСТАВЛЕННЫХ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0001] Содержание представленного в электронном виде перечня последовательностей в текстовом файле ASCII (название: 4366_002PC02_Seqlisting_ST25; размер: 5 392 байта; дата создания: 26 июня 2020 г.), поданного вместе с заявкой, включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Согласно настоящему изобретению представлены молекулы катионных носителей и мицеллярные системы, которые можно применять для доставки анионных полезных нагрузок (*например*, олигонуклеотидов) через физиологические проницаемые барьеры, *например*, гематоэнцефалический барьер.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] В организме существуют определенные барьеры, которые ограничивают проходимость лекарственного средства через мембрану. Таким образом, только избирательные вещества могут проникать через подобные мембраны. Важными и специализированными физиологическими барьерами являются гематоэнцефалический барьер и клеточная мембрана. Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) представляет собой высокоизбирательную полупроницаемую преграду, которая отделяет циркулирующую кровь от мозга и внеклеточной жидкости центральной нервной системы (ЦНС). Гематоэнцефалический барьер образован эндотелиальными клетками капиллярной стенки, обволакивающим капилляр отростком астроцита и перицитами, плотно упакованными на базальной мембране капилляра. Эта система обеспечивает проникновение воды, некоторых газов и жирорастворимых молекул посредством пассивной диффузии, а также избирательный транспорт молекул, таких как глюкоза и аминокислоты, которые имеют важное значение для функционирования нервной клетки.

[0004] Гематоэнцефалический барьер ограничивает проникновение патогенов, диффузию растворенных веществ в кровь, а также крупных или гидрофильных молекул в спинномозговую жидкость (СМЖ), при этом обеспечивая диффузию O₂, CO₂, гидрофобных молекул (*например*, гормонов) и мелких полярных молекул (Johansen et al., (2017) Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. Epub (4): 659-668). ГЭБ препятствует проникновению в головной мозг почти 100% макромолекулярных нейротерапевтических средств и более 98% молекул всех лекарственных средств (Daneman & Prat (2015) "The Blood Brain Barrier" Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 7(1):a020412). Преодоление

трудности доставки лекарственных средств к конкретным областям головного мозга представляет собой серьезную проблему для лечения большинства заболеваний головного мозга. Таким образом, терапевтические молекулы, которые в противном случае могли оказаться эффективными для постановки диагноза и лечения, не пересекают ГЭБ в адекватных количествах.

[0005] Также часто проблематичным оказывается внутриклеточное нацеливание, поскольку для того, чтобы добраться до цитоплазмы, экзогенные молекулы сначала должны преодолеть клеточную мембрану. Мембрана клетки обладает избирательной проницаемостью для неполярных лекарственных средств, которые являются жирорастворимыми и могут проникать через клеточную мембрану. С другой стороны, клеточная мембрана практически непроницаема для высокозаряженных лекарственных средств, таких как олигонуклеотиды.

[0006] Полинуклеотиды не способны легко проникать через клеточную мембрану из-за отталкивания зарядов между отрицательно заряженной мембраной и высоким отрицательным зарядом на полинуклеотиде. Это приводит к тому, что у полинуклеотидов низкие биологическая доступность и поглощение клетками, составляя обычно менее 1% (Dheur et al, *Nucleic Acid Drug Dev.*, 9:522 (1999); Park et al, *J Controlled Release*, 93:188 (2003)). Так как большинство полинуклеотидов превышают массу в 5 000 Да, они не могут с легкостью диффундировать через клеточные мембраны, а поглощение клетками ограничено главным образом процессами пиноцитоза и эндоцитоза. Оказавшись внутри клетки, полинуклеотиды могут накапливаться в лизосомальных компартментах, что ограничивает их доступ к цитоплазме или ядру. Парентерально вводимые полинуклеотиды также очень склонны к быстрой деградации под действием нуклеазы как внутри, так и вне цитоплазмы. В исследованиях показана быстрая деградация полинуклеотидов в крови после их *в/в* введения, с периодом полужизни, составляющим около 30 минут (Geary et al, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296:890-897 (2001)).

[0007] Таким образом, проблемы, связанные с доставкой полинуклеотидов, *например*, антисмыслового олигонуклеотида, в общем, могут быть разделены на две части. Во-первых, терапевтические полинуклеотиды должны быть изготовлены по такой рецептуре, чтобы обеспечить их доставку в цитоплазму, и, во-вторых, полинуклеотид должен достигнуть клеточного ядра интактным и с полноценной функцией. Несмотря на преимущества применения олигонуклеотидов и аналогов олигонуклеотида в качестве терапевтических средств, существует потребность в системах доставки, обеспечивающих улучшенные фармакологические свойства, например, стабильность в сыворотке крови, доставку к требуемому органу, ткани или клетке, и трансмембранную доставку.

[0008] Активные попытки, направленные на улучшение трансмембранной доставки нуклеиновых кислот и олигонуклеотидов, заключались в применении белковых носителей, антительных носителей, липосомальных систем доставки, электропорации, прямой инъекции, слияния клеток, вирусных векторов и трансформации с участием фосфата кальция. Однако многие из этих методик ограничены типом клеток, в которых добиваются трансмембранного транспорта, и условиями, необходимыми для обеспечения этого транспорта. Следовательно, существует потребность в системах доставки, способных избирательно направлять заряженные лекарственные средства (*например*, антисмысловые олигонуклеотиды, такие как антимиры) к конкретным клеткам или тканям и через проницаемые барьеры (*например*, цитоплазматическую мембрану или ГЭБ), при этом повышая их стабильность в сыворотке крови и/или устойчивость к эндогенным литическим ферментам (*например*, РНазам).

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0009] Согласно настоящему изобретению предложена молекула катионного носителя, содержащая

[WP]-L1-[CC]-L2-[AM] (схема I)

или

[WP]-L1-[AM]-L2-[CC] (схема II),

где

WP — фрагмент водорастворимого биополимера;

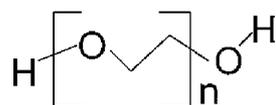
CC — фрагмент положительно заряженного носителя;

AM — фрагмент адьюванта; и

L1 и L2 — самостоятельные необязательные линкеры, и

при этом будучи смешанным с нуклеиновой кислотой в соотношении ионов около 1:1, молекула катионного носителя образует мицеллу.

[0010] В некоторых аспектах водорастворимый полимер содержит поли(алкиленгликоли), поли(оксиэтилированный полиол), поли(спирт олефинового ряда), поли(винилпирролидон), поли(гидроксиалкилметакриламид), поли(гидроксиалкилметакрилат), поли(сахариды), поли(α -гидроксикислоту), поли(виниловый спирт), полиглицерин, полифосфазен, полиоксазолины (POZ), поли(N-акрилоилморфолин) или любые их комбинации. В некоторых аспектах водорастворимый полимер содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ), полиглицерин или поли(пропиленгликоль) (ППГ). В некоторых аспектах водорастворимый полимер содержит:



где n составляет 1–1000.

[0011] В некоторых аспектах n составляет по меньшей мере около 110, по меньшей мере около 111, по меньшей мере около 112, по меньшей мере около 113, по меньшей мере около 114, по меньшей мере около 115, по меньшей мере около 116, по меньшей мере около 117, по меньшей мере около 118, по меньшей мере около 119, по меньшей мере около 120, по меньшей мере около 121, по меньшей мере около 122, по меньшей мере около 123, по меньшей мере около 124, по меньшей мере около 125, по меньшей мере около 126, по меньшей мере около 127, по меньшей мере около 128, по меньшей мере около 129, по меньшей мере около 130, по меньшей мере около 131, по меньшей мере около 132, по меньшей мере около 133, по меньшей мере около 134, по меньшей мере около 135, по меньшей мере около 136, по меньшей мере около 137, по меньшей мере около 138, по меньшей мере около 139, по меньшей мере около 140 или по меньшей мере около 141. В некоторых аспектах n составляет от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 140 до около 150 или от около 150 до около 160.

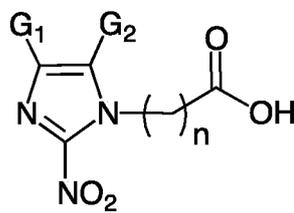
[0012] В некоторых аспектах водорастворимый полимер является линейным, разветвленным или дендритным. В некоторых аспектах фрагмент катионного носителя содержит одну или более основных аминокислот. В некоторых аспектах фрагмент катионного носителя содержит по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29, по меньшей мере 30, по меньшей мере 31, по меньшей мере 32, по меньшей мере 33, по меньшей мере 34, по меньшей мере 35, по меньшей мере 36, по меньшей мере 37, по меньшей мере 38, по меньшей мере 39, по меньшей мере 40, по меньшей мере 41, по меньшей мере 42, по меньшей мере 43, по меньшей мере 44, по меньшей мере 45, по меньшей мере 46, по меньшей мере 47, по меньшей мере 48, по меньшей мере 49 или по меньшей мере 50 основных аминокислот.

[0013] В некоторых аспектах фрагмент катионного носителя содержит от около 30 до около 50 основных аминокислот. В некоторых аспектах основная аминокислота содержит аргинин, лизин, гистидин или любую их комбинацию. В некоторых аспектах фрагмент катионного носителя содержит около 40 мономеров лизина.

[0014] В некоторых аспектах фрагмент адьюванта способен модулировать иммунный ответ, воспалительный ответ или микроокружение ткани. В некоторых аспектах фрагмент адьюванта способен модулировать иммунный ответ. В некоторых аспектах фрагмент адьюванта способен модулировать микроокружение опухоли у субъекта с опухолью.

[0015] В некоторых аспектах фрагмент адьюванта способен ингибировать или уменьшать гипоксию в микроокружении опухоли. В некоторых аспектах фрагмент адьюванта содержит производное имидазола, аминокислоту, витамин или любую их комбинацию.

[0016] В некоторых аспектах фрагмент адьюванта содержит:

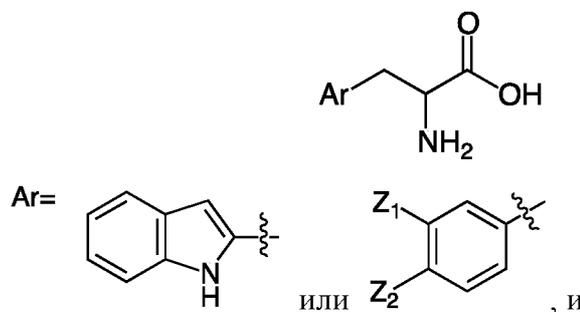


где

(i) G_1 и G_2 выбраны независимо друг от друга из H, ароматического кольца или 1–10 алкилов; или

(ii) G_1 и G_2 вместе образуют ароматическое кольцо; и где n составляет 1–10.

[0017] В некоторых аспектах фрагмент адьюванта содержит нитроимидазол. В некоторых аспектах фрагмент адьюванта содержит метронидазол, тинидазол, ниморазол, диметридазол, претоманид, орнидазол, мегазол, азанидазол, бензнидазол или любую их комбинацию. В некоторых аспектах фрагмент адьюванта содержит аминокислоту. В некоторых аспектах фрагмент адьюванта содержит



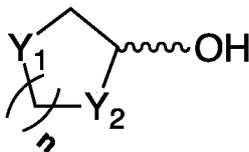
где Ar представлен

при этом Z_1 и Z_2 выбраны независимо друг от друга из H и OH.

[0018] В некоторых аспектах фрагмент адьюванта способен ингибировать или уменьшать воспалительный ответ. В некоторых аспектах фрагмент адьюванта представляет собой

витамин. В некоторых аспектах витамин содержит циклическое кольцо или циклическое кольцо с гетероатомом, и карбоксильную группу или гидроксильную группу.

[0019] В некоторых аспектах витамин содержит:



где Y_1 и Y_2 выбраны независимо друг от друга из C, N, O и S, и где n составляет 1 или 2.

[0020] В некоторых аспектах витамин выбран из группы, состоящей из витамина А, витамина В1, витамина В2, витамина В3, витамина В6, витамина В7, витамина В9, витамина В12, витамина С, витамина D2, витамина D3, витамина Е, витамина М, витамина Н и любой их комбинации. В некоторых аспектах витамин представляет собой витамин В3.

[0021] В некоторых аспектах фрагмент адьюванта содержит по меньшей мере около 2, по меньшей мере около 3, по меньшей мере около 4, по меньшей мере около 5, по меньшей мере около 6, по меньшей мере около 7, по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 11, по меньшей мере около 12, по меньшей мере около 13, по меньшей мере около 14, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 16, по меньшей мере около 17, по меньшей мере около 18, по меньшей мере около 19 или по меньшей мере около 20 молекул витамина В3. В некоторых аспектах фрагмент адьюванта содержит по меньшей мере около 25, по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 35, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 45 или по меньшей мере около 50 молекул витамина В3. В некоторых аспектах фрагмент адьюванта содержит около 10 молекул витамина В3. В некоторых аспектах фрагмент адьюванта содержит около 20 молекул витамина В3. В некоторых аспектах фрагмент адьюванта содержит около 30 молекул витамина В3. В некоторых аспектах фрагмент адьюванта содержит около 40 молекул витамина В3.

[0022] В некоторых аспектах молекула катионного носителя приблизительно содержит фрагмент водорастворимого биополимера с от около 120 до около 130 молекул ПЭГ, фрагмент катионного носителя, содержащего полилизин с от около 30 до около 40 молекул лизина, и фрагмент адьюванта с от около 5 до около 10 молекул витамина В3. В некоторых аспектах молекула катионного носителя дополнительно содержит анионную полезную нагрузку, которая взаимодействует с молекулой катионного носителя посредством ионной связи.

[0023] В некоторых аспектах молекула катионного носителя приблизительно содержит фрагмент водорастворимого биополимера с от около 120 до около 130 молекул ПЭГ,

фрагмент катионного носителя, содержащего полилизин с от около 70 до около 90 молекул лизина, например, около 80 молекул лизина, и фрагмент адьюванта с от около 20 до около 40 молекул витамина В3, например, около 30 молекул витамина В3. В некоторых аспектах молекула катионного носителя дополнительно содержит анионную полезную нагрузку, которая взаимодействует с молекулой катионного носителя посредством ионной связи.

[0024] Согласно настоящему изобретению также предложена мицелла, содержащая молекулу катионного носителя, раскрытого в настоящем изобретении, и анионная полезная нагрузка, причем фрагмент катионного носителя комплекса катионного носителя и анионная полезная нагрузка ассоциированы друг с другом. В некоторых аспектах ассоциация представляет собой ковалентную связь. В других аспектах ассоциация представляет собой нековалентную связь. В некоторых аспектах ассоциация представляет собой ионную связь.

[0025] В некоторых аспектах положительный заряд фрагмента катионного носителя молекулы катионного носителя достаточный для образования мицеллы при смешивании его с анионной полезной нагрузкой в растворе, причем общее соотношение ионов с положительными зарядами фрагмента катионного носителя молекулы катионного носителя и ионов с отрицательными зарядами анионной полезной нагрузки в растворе составляет около 1: 1. В некоторых аспектах молекула катионного носителя способна защищать анионную полезную нагрузку от деградации ДНазой и/или РНазой. В некоторых аспектах анионная полезная нагрузка не конъюгирована с молекулой катионного носителя с помощью ковалентной связи, и/или анионная полезная нагрузка взаимодействует с фрагментом катионного носителя молекулы катионного носителя только посредством ионного взаимодействия.

[0026] В некоторых аспектах время полужизни анионной полезной нагрузки увеличено по сравнению с временем полужизни свободного анионной полезной нагрузки, не включенной в мицеллу. В некоторых аспектах положительные заряды фрагмента катионного носителя молекулы катионного носителя и отрицательные заряды анионной полезной нагрузки в мицелле находятся в соотношении ионов около 3:1, около 2,9:1, около 2,8:1, около 2,7:1, около 2,6:1, около 2,5:1, около 2,4:1, около 2,3:1, около 2,2:1, около 2,1:1, около 2:1, около 1,9:1, около 1,8:1, около 1,7:1, около 1,6:1, около 1,5:1, около 1,4:1, около 1,3:1, около 1,2:1, около 1,1:1, около 1:1, около 1:1,1, около 1:1,2, около 1:1,3, около 1:1,4, около 1:1,5, около 1:1,6, около 1:1,7, около 1:1,8, около 1:1,9, около 1:2, около 1:2,1, около 1:2,2, около 1:2,3, около 1:2,4, около 1:2,5, около 1:2,6, около 1:2,7, около 1:2,8, около 1:2,9 или около 1:3. В некоторых аспектах положительные заряды фрагмента катионного носителя молекулы катионного носителя и отрицательные заряды анионной полезной нагрузки в мицелле

находятся в соотношении ионов от около 3:1 до около 1:3. В некоторых аспектах положительные заряды фрагмента катионного носителя молекулы катионного носителя и отрицательные заряды анионной полезной нагрузки в мицелле находятся в соотношении зарядов около 1: 1. В некоторых аспектах диаметр мицеллы составляет от около 1 нм до 100 нм, от около 10 нм до около 100 нм, от около 10 нм до около 90 нм, от около 10 нм до около 80 нм, от около 10 нм до около 70 нм, от около 20 нм до около 100 нм, от около 20 нм до около 90 нм, от около 20 нм до около 80 нм, от около 20 нм до около 70 нм, от около 30 нм до около 100 нм, от около 30 нм до около 90 нм, от около 30 нм до около 80 нм, от около 30 нм до около 70 нм, от около 40 нм до около 100 нм, от около 40 нм до около 90 нм, от около 40 нм до около 80 нм или от около 40 нм до около 70 нм.

[0027] В некоторых аспектах анионная полезная нагрузка содержит нуклеиновую кислоту. В некоторых аспектах нуклеиновая кислота содержит мРНК (матричная РНК, mRNA), миРНК (miRNA), миРНК-губку, прочную миРНК-ловушку, антимиР, малую РНК, рРНК (рибосомная РНК, rRNA), киРНК (короткая интерферирующая РНК, siRNA), кшРНК (короткая шпилечная РНК, shRNA), гДНК (геномная ДНК, gDNA), кДНК (комплементарная ДНК, cDNA), пДНК (плазмидная ДНК, pDNA), ПНК (пептид-нуклеиновая кислота, PNA), МНК (мостиковая нуклеиновая кислота, BNA), антисмысловый олигонуклеотид (ASO), аптамер, циклический динуклеотид или любую их комбинацию. В некоторых аспектах нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере один аналог нуклеозида. В некоторых аспектах аналог нуклеозида содержит закрытую нуклеиновую кислоту (LNA); 2'-0-алкил-РНК; 2'-амино-ДНК; 2'-фтор-ДНК; арабинонуклеиновую кислоту (ANA); 2'-фтор-ANA, гекситолнуклеиновую кислоту (HNA), интеркалирующую нуклеиновую кислоту (INA), затрудненный этилом нуклеозид (cEt), 2'-0-метилнуклеиновую кислоту (2'-OMe), 2'-0-метоксиэтилнуклеиновую кислоту (2'-MOE) или любую их комбинацию.

[0028] В некоторых аспектах нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность длиной от 5 до 30 нуклеотидов. В некоторых аспектах нуклеотидная последовательность имеет длину в 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 нуклеотидов. В некоторых аспектах нуклеотидная последовательность имеет остов, содержащий фосфодисложноэфирную связь, фосфотрисложноэфирную связь, метилфосфонатную связь, фосфорамидатную связь, фосфотиоатную связь и их комбинации. В некоторых аспектах молекула катионного носителя дополнительно содержит нацеливающий фрагмент, который связан с водорастворимым полимером необязательно посредством линкера.

[0029] В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент способен нацеливать на ткань. В некоторых аспектах ткань представляет собой печень, головной мозг, почку, легкое, яичник, поджелудочную железу, щитовидную железу, молочную железу, желудок или любую их комбинацию. В некоторых аспектах ткань представляет собой ткань злокачественной опухоли. В некоторых аспектах ткань представляет собой печень. В некоторых аспектах нацеливающий на печень фрагмент содержит холестерин. В некоторых аспектах ткань представляет собой поджелудочную железу. В некоторых аспектах нацеливающий на поджелудочную железу фрагмент содержит лиганд, связывающийся с интегриновыми рецепторами.

[0030] В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент нацелен на центральную нервную систему. В некоторых аспектах нацеливающий на головной мозг фрагмент способен транспортироваться переносчиком крупных нейтральных аминокислот типа 1 (LAT1). В некоторых аспектах нацеливающий на головной мозг фрагмент представляет собой аминокислоту. В некоторых аспектах нацеливающий на головной мозг фрагмент содержит аминокислоту с разветвленной цепью или ароматическую аминокислоту. В некоторых аспектах аминокислота представляет собой валин, лейцин и/или изолейцин. В некоторых аспектах аминокислота представляет собой триптофан и/или тирозин.

[0031] Согласно настоящему изобретению также предложена композиция, содержащая молекулу катионного носителя, раскрытого в настоящем документе, и отрицательно заряженную молекулу. Также предложены фармацевтическая композиция, содержащая молекулу катионного носителя, композиция или мицелла, раскрытая в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0032] Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения молекулы катионного носителя, раскрытого в настоящем документе, включающий в себя синтез молекулы катионного носителя. В некоторых аспектах способ получения мицеллы, раскрытой в настоящем документе, включает в себя смешивание молекулы катионного носителя с отрицательно заряженной молекулой в соотношении ионов 1:1 в растворе. В некоторых аспектах способ дополнительно включает в себя очищение мицеллы.

[0033] Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения заболевания или патологического состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий в себя введение субъекту мицеллы настоящего изобретения. В некоторых аспектах у анионной полезной нагрузки в сердцевине мицеллы время полужизни более длительное, чем у соответствующей анионной полезной нагрузки, не включенной в мицеллу. В некоторых аспектах субъект представляет собой млекопитающее.

[0034] Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения злокачественного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества мицеллы, раскрытой в настоящем документе. В некоторых аспектах злокачественное заболевание представляет собой глиому, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак печени, рак кожи или рак шейки матки. В некоторых аспектах рак поджелудочной железы представляет собой аденокарциному поджелудочной железы.

[0035] Согласно настоящему изобретению также предложен способ уменьшения воспаления у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества мицеллы, раскрытой в настоящем документе.

[0036] Согласно настоящему изобретению также предложен способ восстановления и/или индуцирования нейрогенеза у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества мицеллы, раскрытой в настоящем документе.

[0037] Согласно настоящему изобретению также предложен способ улучшения когнитивной функции у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества мицеллы, раскрытой в настоящем документе.

[0038] В некоторых аспектах нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера.

[0039] Согласно настоящему изобретению также предложен способ уменьшения выраженности амилоидных бляшек у субъекта, страдающего болезнью Альцгеймера, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества мицеллы, раскрытой в настоящем документе.

[0040] В некоторых аспектах мицелла содержит молекулу катионного носителя, нацеленную на LAT1, и полезную нагрузку, содержащую антисмысловой олигонуклеотид, нацеленный на миРНК-485-3р, *например*, антисмысловой олигонуклеотид SEQ ID NO: 18 или его фрагмент, вариант или производное. В некоторых аспектах фрагмент содержит 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 последовательный нуклеотид SEQ ID NO: 18. В некоторых аспектах вариант имеет последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную SEQ ID NO: 18. В некоторых аспектах производное содержит по меньшей мере одну модификацию сахара и/или по меньшей мере одну модификацию остова.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0041] **На ФИГ. 1** показаны примерные архитектуры молекул носителей настоящего изобретения. Примерные молекулы носителей содержат опциональный тканеспецифический нацеливающий фрагмент, водорастворимый полимер и молекулу катионного или анионного носителя (которые могут взаимодействовать, соответственно, с анионной или катионной полезной нагрузкой). В некоторых аспектах катионный/анионный носитель и анионная/катионная полезная нагрузка не связаны и взаимодействуют электростатически. В некоторых аспектах катионный/анионный носитель и анионная/катионная полезная нагрузка связаны и взаимодействуют электростатически. Для простоты фрагмент адьюванта, который может находиться между водорастворимым полимером и катионным/анионным носителем, или на конце после катионного/анионного носителя, не изображен на рисунке.

[0042] **На ФИГ. 2** показан альтернативный способ для загрузки нейтральной полезной нагрузки с помощью молекул носителя настоящего изобретения, в котором нейтральная полезная нагрузка (*например*, гидрофобное лекарственное средство) ковалентно связана с адаптером, который, в свою очередь, может взаимодействовать электростатически с фрагментом катионного или анионного носителя молекулы носителя.

[0043] **На ФИГ. 3** показана примерная архитектура молекулы носителя настоящего изобретения. Представленный пример включает в себя фрагмент катионного носителя, который может взаимодействовать электростатически с анионными полезными нагрузками, *например*, нуклеиновыми кислотами, такими как антисмысловые олигонуклеотиды, нацеленные на ген, *например*, миРНК (антимирны). В некоторых аспектах АМ может быть расположен между WP и СС. Для простоты компоненты СС и АМ изображены в линейном порядке. Однако как изображено, например, на ФИГ. 4, СС и АМ могут располагаться, формируя поддерживающий каркас.

[0044] **На ФИГ. 4** показаны характеристики $^1\text{H-NMR}$ молекулы носителя, содержащей нацеливающий на мозг фрагмент, который после связывания с анионной полезной нагрузкой может образовывать мицеллярные структуры. На графике $^1\text{H-NMR}$, относящемся к нацеливающему на мозг фрагменту (обозначен как «молекула, нацеленная на мозг»), показан успешно синтезированный нацеливающий на мозг фрагмент (аминокислотный фрагмент, содержащий кольцевую структуру, которая связывается с мишенью LAT1 на эндотелии в головном мозге). На втором графике $^1\text{H-NMR}$ (обозначен как «полимер») показан также успешно синтезированный катионный блок-сополимер ПЭГ (содержащий также фрагмент катионного носителя и фрагмент адьюванта).

[0045] **На ФИГ. 5** в схематическом виде показано каким образом молекулы носителя настоящего изобретения включены в мицеллу, в которой тканеспецифический нацеливающий фрагмент усеивает внешнюю ее поверхность, а полезная нагрузка в виде нуклеиновой кислоты находится, например, в сердцевине мицеллы (полиионный комплекс антисмыслового олигонуклеотида).

[0046] **На ФИГ. 6** показано как форма и размер, а значит и емкость загрузки мицелл настоящего изобретения можно модифицировать, изменяя соотношение между водорастворимым биополимером (*например*, ПЭГ) и катионным носителем (*например*, полилизин). В зависимости от соотношения молекулы носителя могут организоваться в виде мелких частиц, мелких мицелл, мицелл, стержневидных структур или полимерсом. Следует понимать, что фраза «мицеллы настоящего изобретения» охватывает не только классические мицеллы, но также и мелкие частицы, мелкие мицеллы, мицеллы, стержневидные структуры или полимерсомы.

[0047] **На ФИГ. 7** в схематическом виде представлен механизм доставки полезных нагрузок, содержащихся в мицеллах настоящего изобретения, к целевым местам в центральной нервной системе. Мицеллы проникают через гематоэнцефалический барьер путем рецепторно-опосредованного трансцитоза с последующей модификацией клетками головного мозга, *например*, нейронами, астроцитами или микроглией. Внутри цитоплазмы мицеллы распадаются, в результате чего высвобождается полезная нагрузка, *например*, анти-миРНК, которая, связываясь с мишенью мРНК, подавляет или отрицательно регулирует экспрессию белка, кодируемого целевой мРНК.

[0048] **На ФИГ. 8** показано увеличение стабильности (увеличение времени полужизни в плазме крови) благодаря инкапсуляции полезной нагрузки в мицелле настоящего изобретения. Без мицелл время полужизни анти-микроРНК (антимира) в плазме крови составляет менее 5 минут. После включения в мицеллу настоящего изобретения время полужизни антимира в плазме крови увеличивается до 80–120 минут. После инкапсуляции время полужизни антимира, раскрытого в примерах, увеличилось с менее 5 минут до приблизительно 93 минут (т. е. приблизительно 20-кратное увеличение времени полужизни в плазме).

[0049] **На ФИГ. 9** показано распределение частиц по крупности нагруженных олигонуклеотидами (*например*, анти-миРНК) мицелл настоящего изобретения в ФСБ. Нагруженные олигонуклеотидами (*например*, анти-миРНК) мицеллы демонстрируют размер частиц 32 нм с распределением с низким коэффициентом полидисперсности (PDI), что указывает на однородность популяции мицелл.

[0050] **На ФИГ. 10** показано распределение члена 5 семейства 7 переносчиков растворенных веществ LAT1(SLC7A5) [*Homo sapiens* (человек)] в различных тканях. Данные были получены из NCBI (Национального центра биотехнологической информации) и соответствуют РНК-секвенированию тотальной РНК из 20 тканей человека.

[0051] **На ФИГ. 11** показаны уровни экспрессии LAT1 *in vivo* в различных тканях мышей.

[0052] **На ФИГ. 12** показано нацеливание на LAT1 с помощью нацеливающего на мозг молекулы носителя настоящего изобретения. Меченная флуоресценцией (Cy5.5) нацеливающая на мозг молекула носителя связывается с LAT1, который экспрессируется в паренхиме головного мозга, и демонстрирует более высокое накопление, чем не нацеленная молекула Cy5.5.

[0053] **На ФИГ. 13** показано клеточное поглощение нагруженных меченной Cy5.5 анти-микроРНК мицелл микроглией, астроцитами, нейробластоподобными клетками SH-5Y и первичными гепатоцитами человека. После инкубации каждого типа клеток с Cy5.5 меченые анти-микроРНК были трансфецированы в клетки, и отслеживались флуоресцентные изображения в течение 48 часов с помощью платформы визуализации IncuCyte. Поглощение анти-микроРНК было значительным в клетках мозга человека (микроглия, астроцит, SH-5Y), при этом поглощение не наблюдалось в гепатоцитах, линии клеток печени.

[0054] **На ФИГ. 14** показано сравнение нацеленности на LAT1 в клетках GL-26, которые сверхэкспрессируют LAT1 на своей поверхности. На рисунке показаны клетки при лечении ингибитором LAT1 и без лечения. Поглощение нацеленных мицелл было в 3 раза выше, чем поглощение, наблюдаемое для ненацеленных мицелл. При ингибировании LAT1 не наблюдалось существенных различий в поглощении между нецелевыми и целевыми мицеллами.

[0055] **На ФИГ. 15** приведено сравнение биораспределения меченной Cy5.5 свободной анти-микроРНК и меченной Cy5.5 анти-микроРНК, загруженной в мицеллы настоящего изобретения (ASO-MDS; Антисмысловой олигонуклеотид — мицеллярная система доставки) после внутривенного введения. После введения мышам путем инъекции обоих образцов снимали изображения флуоресценции всего тела через интервалы времени в течение 16 ч.

[0056] **На ФИГ. 16** показано накопление в головном мозге нагруженных анти-миРНК мицелл настоящего изобретения (ASO-MDS) в сравнении с введением оголенной анти-миРНК (оголенный ASO). Мицеллы, нагруженные меченными Cy5.5 анти-миРНК, вводили внутривенно, и после лизиса ткани мозга измеряли интенсивность остаточной

флуоресценции. Наблюдалось существенное накопление в мозге мицелл, нацеленных на мозг, в отличие от ненацеленных мицелл.

[0057] **На ФИГ. 17** в схематическом виде представлена процедура эксперимента. Мицеллы ASO-MDS, *т. е.* мицеллы настоящего изобретения, содержащие нацеливающий на LAT1 фрагмент и антимиры против полезной нагрузки miR485-3p, вводили еженедельно в течение 4 недель 8-месячным трансгенным мышам 5XFAD. ASO-MDS содержит (i) антимиры против miR485-3p и (ii) 100 молекул катионного носителя, в которых каждая из 50 молекул катионного носителя связана с фенилаланином (нацеливающий фрагмент), и каждая из других 50 молекул катионного носителя не связана ни с каким нацеливающим фрагментом. Каждая из молекул катионного носителя в ASO-MDS содержит (ПЭГ)₅₀₀₀, соединенный с 47 молекулами лизина, из которых каждая из 10 молекул лизина связана с никотинамидом, *т. е.* всего 10 молекул никотинамида в молекуле катионного носителя.

[0058] **На ФИГ. 18А** показано усиление фагоцитоза A β в первичных глиальных клетках мышцы после лечения ASO-MDS.

[0059] **На ФИГ. 18В** показано усиление фагоцитоза A β в первичных микроглиальных клетках мышцы после лечения ASO-MDS.

[0060] **На ФИГ. 18С** показано усиление фагоцитоза A β в первичных микроглиальных клетках мышцы после лечения ASO-MDS. На изображениях представлена иммунная цитометрия Iba1 (микроглия) и β -амилоида 1-16 (6E10, для выявления бляшек A β) в контрольной или обработанной ASO-MDS первичной микроглии.

[0061] **На ФИГ. 19А** показано, что доставка ASO-MDS в гиппокамп мышей 5XFAD уменьшает нейровоспаление. На изображениях показано иммуногистохимическое окрашивание с применением анти-TNF-альфа (верхние панели) и GFAP (нижние панели) коронарных срезов мозга мышей 5XFAD контрольной группы (только miR и только мицеллы (левая и средняя панели, соответственно)) и мышей, получавших лечение ASO-MDS (правая панель). (x 20) n = 3.

[0062] **На ФИГ. 19В** показана гистограмма тех же данных, представленных на ФИГ. 19А. Левый столбец — только miR, средний столбец — только мицеллы, правый столбец — мицеллы + miR.

[0063] **На ФИГ. 20А** показано, что доставка ASO-MDS в кору головного мозга мышей 5XFAD уменьшает нейровоспаление. На изображениях показано иммуногистохимическое окрашивание с применением анти-TNF-альфа (верхние панели) и GFAP (нижние панели) коронарных срезов мозга мышей 5XFAD контрольной группы (только miR и только мицеллы (левая и средняя панели, соответственно)) и мышей, получавших лечение ASO-MDS (правая панель). (x 20) n = 3.

[0064] **На ФИГ. 20В** показана гистограмма тех же данных, представленных на ФИГ. 20А. Левый столбец — только miR, средний столбец — только мицеллы, правый столбец — мицеллы + miR.

[0065] **На ФИГ. 21А** показано, что доставка ASO-MDS уменьшает выраженность амилоидных бляшек у 5XFAD. Иммуногистохимический анализ зубчатой извилины в гиппокампе после введения имитатора (только miR и только мицеллы (левая и средняя панели, соответственно)) или ASO-MDS (правая панель). Диффузные бляшки в срезах мозга были окрашены анти-бета-амилоидом (клон 6E10) и ядром.

[0066] **На ФИГ. 21В** показана гистограмма тех же данных, представленных на ФИГ. 21А. Левый столбец — только miR, средний столбец — только мицеллы, правый столбец — мицеллы + miR.

[0067] **На ФИГ. 22А** показано, что введение ASO-MDS восстанавливает нейрогенез у 5XFAD. Иммуногистохимический анализ бокового желудочка после введения имитатора (только miR и только мицеллы (левая и средняя панели, соответственно)) или ASO-MDS (правая панель). Нейрогенез на срезах головного мозга выявляли окрашиванием анти-DCX. На графике показано среднее число окрашенных DCX клеток на мм². Верхние панели окрашены красителем анти-DCX, *т. е.* маркером нейрогенеза. Нижние панели окрашены DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол).

[0068] **На ФИГ. 22В** показана гистограмма тех же данных, представленных на ФИГ. 22А.

[0069] **На ФИГ. 23А** показано, что доставка ASO-MDS улучшает когнитивную функцию (Y-лабиринт) у мышей 5XFAD.

[0070] **На ФИГ. 23В** показано, что доставка ASO-MDS улучшает когнитивную функцию (тест пассивного избегания) у мышей 5XFAD. Тесты Y-лабиринта и пассивного избегания на ФИГ. 23А и ФИГ. 23В выполняли на мышах 5XFAD, которым инъецировали имитатор (только miR и только мицеллы (левая и средняя панели, соответственно)) и ASO-MDS (правая панель) (n=5 для мышей 5XFAD, получавших лечение имитатором на протяжении 8~10 месяцев, n=7 для мышей 5XFAD, которым на протяжении 8~10 месяцев выполняли инъекции ASO-MDS).

[0071] **На ФИГ. 24** показана роль miRНК 485-3p для болезни Альцгеймера.

[0072] **На ФИГ. 25** в схематическом виде показано нацеленное на злокачественную опухоль применение мицеллярной системы доставки настоящего изобретения. Мицеллярная система доставки, раскрытая в настоящем документе, представляет собой универсальную систему доставки для лечения злокачественной опухоли, а также заболевания головного мозга. Различные нацеленные на злокачественную опухоль лиганды

можно применять для доставки этой системой-носителем лекарственных средств, *например*, полинуклеотидов, к клеткам злокачественной опухоли.

[0073] **На ФИГ. 26А** показывает эффективность выключения гена K-Ras при раке поджелудочной железы с помощью мицеллярной системы доставки настоящего изобретения. На ФИГ. 26А показана временная шкала эффективности выключения гена K-Ras.

[0074] **На ФИГ. 26В** показана гистограмма относительного содержания мРНК K-Ras после процедуры выключения гена K-Ras на ФИГ. 26А. На обоих ФИГ. 26А и 26В в мицеллярную систему доставки настоящего изобретения загружали олигонуклеотид, способный ингибировать K-Ras. Для нацеливания на различные ткани мицеллярную систему доставки настоящего изобретения гибридизировали с циклическим пептидом RGD (нацеленным на $\alpha(v)\beta(3)$ интегрин) или с X (мишенью).

[0075] **На ФИГ. 27** приведено сравнение биораспределения меченных Cy5.5 анти-микроРНК (оголенный ASO; левые мыши) и мицелл, нагруженных мечеными Cy5.5 анти-микроРНК (ASO-MDS; правые мыши) после внутримышечной инъекции. После инъекции мышам обоих образцов получали флуоресцентные изображения всего тела вплоть до 120 часов.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0076] Настоящее изобретение относится к молекулам носителя, содержащим фрагмент водорастворимого биополимера (*например*, ПЭГ) и заряженный фрагмент (*например*, полилизин). В результате электростатического взаимодействия между заряженным фрагментом и заряженной полезной нагрузкой (*например*, олигонуклеотидом) с противоположным зарядом и нагрузкой с одинаковым или идентичным зарядом (*например*, число зарядов на заряженном фрагменте молекулы носителя и на заряженной полезной нагрузке одинаковое или идентичное) заряды заряженного фрагмента молекулы носителя и заряды заряженной полезной нагрузки нейтрализуют друг друга, образуя комплекс из молекулы носителя и полезной нагрузки. Комплексы из молекул носителя и полезной нагрузки могут самостоятельно ассоциироваться с образованием мицелл, в которых полезная нагрузка находится в сердцевине мицеллы, а фрагмент водорастворимого биополимера обращен к растворителю. В некоторых аспектах молекула носителя содержит заряженный катионный фрагмент, который может взаимодействовать с анионными полезными нагрузками. И наоборот, молекула носителя может содержать заряженный анионный фрагмент, который взаимодействует с катионными полезными нагрузками. Неограничивающие примеры различных аспектов представлены в настоящем изобретении.

[0077] Перед подробным описанием настоящего изобретения следует понимать, что это изобретение не ограничено конкретными композициями или описанными этапами процесса, и следовательно может, конечно, варьироваться. Как будет очевидно специалистам в данной области техники после прочтения этого раскрытия, каждый из отдельных аспектов, описанных и проиллюстрированных в настоящем документе, имеет дискретные компоненты и особенности, которые могут быть легко отделены или объединены с особенностями любого из нескольких других аспектов без отклонения от объема или сущности настоящего раскрытия. Любой изложенный способ может выполняться в порядке перечисления событий или в любом другом логически возможном порядке.

[0078] Заголовки, представленные в настоящем документе, не являются ограничениями различных аспектов настоящего раскрытия, которые могут быть определены со ссылкой на описание в целом. Следует также понимать, что используемая в настоящем документе терминология применяется только для описания конкретных аспектов и не имеет ограничительного характера, поскольку объем настоящего раскрытия будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

[0079] В соответствии с этим термины с непосредственно ниже приведенными определениями более полно определены путем ссылки на спецификацию в полном объеме.

I. Определения

[0080] Для упрощения понимания настоящего описания сначала приведены определения некоторых терминов. Дополнительные определения приведены в подробном описании.

[0081] Следует отметить, что сущность термина в форме единственного числа относится к одной или нескольким таким сущностям; например, «нуклеотидная последовательность» означает одну или несколько нуклеотидных последовательностей. Следовательно, термины в форме единственного числа, а также выражения «один или несколько» и «по меньшей мере один» могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо. Следует также отметить, что в формулу настоящего изобретения могут вноситься правки с целью исключения любых необязательных элементов. Следовательно, данное утверждение должно служить в качестве предварительного основания для использования такой исчерпывающей терминологии, как «исключительно, только» и т. п. в связи с указанием элементов формулы изобретения, или использования отрицательного ограничения.

[0082] Кроме того, в контексте настоящего изобретения «и/или» следует рассматривать как конкретное описание каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом, термин «и/или» в контексте используемой в настоящем документе фразы, такой как «А и/или В», предназначен для включения в себя «А и В», «А или В», «А»

(только) и «В» (только) Аналогичным образом термин «и/или» в контексте используемой фразы, такой как «А, В и/или С», предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (только); В (только); и С (только).

[0083] Предполагается, что везде, где аспекты описаны в настоящем документе с использованием формулировки «содержащий», также предусмотрены аналогичные аспекты, описанные в терминах «состоящий из» и/или «по существу состоящий из».

[0084] Если не определено иное, все технические и научные термины, применяемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Например, в Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press специалистам предложен общий словарь множества терминов, применяемых в настоящем изобретении.

[0085] Единицы, префиксы и символы обозначаются в принятой в Международной системе единиц (СИ) форме. Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. При приведении диапазона значений следует понимать, что каждое промежуточное целочисленное значение и каждая его часть между указанными верхним и нижним пределами этого диапазона также конкретно раскрывается вместе с каждым поддиапазоном между такими значениями. Верхний и нижний пределы любого диапазона могут независимо включаться в этот диапазон или исключаться из него, и каждый диапазон, в который включены любой из пределов, ни один из пределов либо оба предела, также охватывается настоящим раскрытием. Таким образом, под указанными в настоящем документе диапазонами понимается сокращение для всех значений в пределах диапазона, включая указанные конечные точки. Например, диапазон от 1 до 10 означает, что он включает в себя любое число, комбинацию чисел или поддиапазон из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

[0086] Если значение указано в явном виде, следует понимать, что значения, которые примерно равны количеству или сумме с указанным значением, также входят в объем раскрытия. При раскрытии комбинации, каждая подкомбинация элементов этой комбинации также конкретно раскрывается и находится в пределах объема настоящего раскрытия. И наоборот, если по отдельности раскрываются различные элементы или группы элементов, также раскрываются их комбинации. Если любой элемент настоящего раскрытия раскрывается как имеющий множество альтернатив, также в настоящем документе раскрываются примеры этого раскрытия, в которых каждая альтернатива

исключена по отдельности или в любой комбинации с другими альтернативами; более чем один элемент настоящего раскрытия может иметь такие исключения, и тем самым раскрываются все комбинации элементов, имеющих такие исключения.

[0087] Нуклеотиды обозначаются их общепринятыми однобуквенными кодами. Если не указано иное, нуклеиновые кислоты записываются слева направо в ориентации от 5'- до 3'-конца. Нуклеотиды в настоящем документе обозначаются общеизвестными однобуквенными символами, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Соответственно, «а» обозначает аденин, «с» обозначает цитозин, «g» обозначает гуанин, «t» обозначает тимин, а «u» обозначает урацил.

[0088] Аминокислотные последовательности записываются слева направо в направлении от amino- к карбокси-концу. Аминокислоты обозначаются в настоящем документе либо своими обычно известными трехбуквенными символами, либо однобуквенными символами, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB.

[0089] Термин «около» применяется в настоящем документе для обозначения приблизительно, примерно, порядка или в области. Если около термин «приблизительно» применяется в сочетании с числовым диапазоном, то он изменяет этот диапазон, расширяя границы выше и ниже указанных числовых значений. В целом, термин «около» может изменять числовое значение выше и ниже указанного значения на величину отклонения, *например*, в 10 процентов, вверх или вниз (выше или ниже).

[0090] Термины «введение», «применение» и их грамматические варианты относятся к введению субъекту композиции, такой как мицеллы настоящего изобретения, фармацевтически приемлемым путем. Введение субъекту композиции, такой как мицеллы настоящего изобретения, осуществляется любым подходящим способом, в том числе интратуморально, перорально, легочно, интраназально, парентерально (внутривенно, внутриартериально, внутримышечно, внутрибрюшинно или подкожно), ректально, интралимфатически, интратекально, периокулярно или местно. Введение включает в себя самостоятельное введение и введение другим лицом. Подходящий путь введения позволяет композиции или агенту выполнять свою предполагаемую функцию. Например, если подходящим способом является внутривенный, то композицию применяют путем введения композиции или средства в вену субъекта.

[0091] В контексте настоящего документа термин «приблизительно» применительно к одному или более интересующим значениям относится к значению, которое похоже на указанное эталонное значение. В некоторых аспектах термин «приблизительно» относится к диапазону значений, которые находятся в пределах 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или меньше в любом направлении (больше или меньше) от указанного эталонного

значения, если не указано иное или иное не следует из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышает 100% возможного значения).

[0092] В контексте настоящего документа термин «консервативный» относится к нуклеотидам или аминокислотным остаткам полинуклеотидной последовательности или полипептидной последовательности, соответственно, которые встречаются без изменений в одном и том же положении двух или более сравниваемых последовательностей. Нуклеотиды или аминокислоты, которые являются сравнительно консервативными, представляют собой такие, которые консервативны в наиболее родственных последовательностях по сравнению с нуклеотидами или аминокислотами, встречающимися в других местах в последовательности.

[0093] В некоторых аспектах две или более последовательности являются «полностью консервативными» или «идентичными», если они на 100% идентичны друг другу. В некоторых аспектах две или более последовательностей считаются «высококонсервативными», если они по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны друг другу. В некоторых аспектах две или более последовательностей считаются «высококонсервативными», если они на около 70%, около 80%, около 90%, около 95%, около 98% или около 99% идентичны друг другу. В некоторых аспектах две или более последовательностей считаются «консервативными», если они по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны друг другу. В некоторых аспектах две или более последовательности являются «консервативными», если они на приблизительно 30% идентичны, приблизительно 40% идентичны, приблизительно 50% идентичны, приблизительно 60% идентичны, приблизительно 70% идентичны, приблизительно 80% идентичны, приблизительно 90% идентичны, приблизительно 95% идентичны, приблизительно 98% идентичны или приблизительно 99% идентичны друг другу. Сохранение последовательности может относиться ко всей длине полинуклеотида или полипептида, или к его части, области или отличительному признаку.

[0094] Термин «полученный из» в контексте настоящего документа относится к компоненту, который выделен из указанной молекулы или организма, или изготовлен с использованием указанной молекулы или организма, или информации (*например*, аминокислотной или нуклеотидной последовательности) из указанной молекулы или организма. Например, последовательность нуклеиновых кислот, полученная из второй последовательности нуклеиновых кислот, может включать в себя нуклеотидную последовательность, которая идентична или по существу аналогична нуклеотидной

последовательности второй последовательности нуклеиновых кислот. В случае нуклеотидов или полипептидов производные виды могут быть получены, например, путем естественного мутагенеза, искусственного направленного мутагенеза или искусственного случайного мутагенеза. Мутагенез, применяемый для получения нуклеотидов или полипептидов, может быть намеренно направленным или намеренно случайным, или смесью каждого из них. Мутагенез нуклеотида или полипептида для образования другого нуклеотида или полипептида, производного от первого, может быть случайным событием (*например*, вызванным погрешностью полимеразы), а идентификация производного нуклеотида или полипептида может быть осуществлена соответствующими способами скрининга, *например*, как описано в настоящем документе. Мутагенез полипептида обычно подразумевает манипуляции с полинуклеотидом, который кодирует полипептид. В некоторых аспектах нуклеотидная или аминокислотная последовательность, которая получена из второй нуклеотидной или аминокислотной последовательности, имеет последовательность, на по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 51%, по меньшей мере около 52%, по меньшей мере около 53%, по меньшей мере около 54%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 56%, по меньшей мере около 57%, по меньшей мере около 58%, по меньшей мере около 59%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 61%, по меньшей мере около 62%, по меньшей мере около 63%, по меньшей мере около 64%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 66%, по меньшей мере около 67%, по меньшей мере около 68%, по меньшей мере около 69%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 71%, по меньшей мере около 72%, по меньшей мере около 73%, по меньшей мере около 74%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 76%, по меньшей мере около 77%, по меньшей мере около 78%, по меньшей мере около 79%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 81%, по меньшей мере около 82%, по меньшей мере около 83%, по меньшей мере около 84%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 86%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 88%, по меньшей мере около 89%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичную второй нуклеотидной или аминокислотной последовательности, соответственно, причем первая нуклеотидная или аминокислотная последовательность сохраняет биологическую активность второй нуклеотидной или аминокислотной последовательности.

[0095] Термины «комплементарный» и «комплементарность» используются в отношении двух или более олигомеров (*m. e.* каждый из которых содержит последовательность нуклеотидных оснований), или между олигомером и геном-мишенью, которые связаны друг с другом по правилам спаривания оснований Уотсона-Крика. Например, последовательность нуклеотидных оснований «Т-G-A (5'→3')» комплементарна последовательности нуклеотидных оснований «А-С-T (3'→5')». Комплементарность может быть «частичной», когда менее чем все нуклеотидные основания данной последовательности нуклеотидных оснований соответствуют другой последовательности нуклеотидных оснований в соответствии с правилами спаривания оснований. Например, в некоторых аспектах комплементарность между данной последовательностью нуклеотидных оснований и другой последовательностью нуклеотидных оснований может составлять около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90% или около 95%. В продолжение примера также возможна «полная» или «совершенная» (100%) комплементарность между данной последовательностью нуклеотидных оснований и другой последовательностью нуклеотидных оснований. Степень комплементарности между последовательностями нуклеотидных оснований оказывает значительное влияние на эффективность и интенсивность гибридизации между последовательностями.

[0096] Термин «по ходу транскрипции» обозначает нуклеотидную последовательность, которая расположена 3'-концом к эталонной нуклеотидной последовательности. В некоторых аспектах нуклеотидные последовательности, расположенные по ходу транскрипции, относятся к последовательностям, которые следуют за точкой начала транскрипции. Например, кодон инициации трансляции гена расположен по ходу транскрипции от сайта начала транскрипции.

[0097] Термины «эксципиент» и «носитель» применяются взаимозаменяемо и обозначают инертное вещество, добавляемое в фармацевтическую композицию для дополнительного облегчения введения соединения.

[0098] В контексте настоящего документа термин «гомология» относится к общему родству между полимерными молекулами, *например*, между молекулами нуклеиновых кислот (*например*, молекулами ДНК и/или молекулами РНК) и/или между молекулами полипептидов. Обычно термин «гомология» подразумевает эволюционные отношения между двумя молекулами. Таким образом, две гомологичные молекулы будут иметь общего эволюционного предка. В контексте настоящего изобретения термин гомология охватывает как идентичность, так и сходство.

[0099] В некоторых аспектах полимерные молекулы считаются «гомологичными» друг другу, если по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере

около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 99% мономеров в молекуле идентичны (точно такой же мономер) или схожи (консервативные замены). Термин «гомологичный» обязательно относится к сравнению по меньшей мере двух последовательностей (полинуклеотидных или полипептидных последовательностей).

[0100] В контексте настоящего документа термин «идентичность» относится к общей сохранности мономеров между полимерными молекулами, *например*, между полипептидными молекулами или полинуклеотидными молекулами (*например*, молекулами ДНК и/или молекулами РНК). Термин «идентичный» без каких-либо дополнительных определителей, *например* белок А идентичен белку В, подразумевает, что последовательности идентичны на 100% (100% идентичность последовательностей). Описание двух последовательностей как, *например*, «на 70% идентичных» эквивалентно описанию их как имеющих, *например*, «70% идентичность последовательности».

[0101] Расчет процента идентичности двух полипептидных или полинуклеотидных последовательностей, *например*, может быть выполнен путем выравнивания двух последовательностей для оптимального сравнения (*например*, могут быть образованы гэпы в одной или обеих из первой и второй полипептидных или полинуклеотидных последовательностей для оптимального выравнивания, при этом в целях сравнения неидентичные последовательности могут быть проигнорированы). В некоторых аспектах длина последовательности, выровненной для целей сравнения, составляет по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или около 100% длины эталонной последовательности. После этого сравнивают аминокислоты в соответствующих позициях аминокислот, или основания в случае полинуклеотидов.

[0102] Если позиция в первой последовательности занята той же аминокислотой, что и соответствующая позиция во второй последовательности, то молекулы идентичны в этой позиции. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией от числа совпадающих положений в последовательностях с учетом числа гэпов и длины каждого гэпа, которые необходимо вносить для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента

идентичности между двумя последовательностями может быть выполнено с помощью математического алгоритма.

[0103] Подходящие программы доступны из различных источников и предназначены для выравнивания как белковых, так и нуклеотидных последовательностей. Одной из подходящих программ для определения процента идентичности последовательности является *bl2seq*, входящая в пакет программ BLAST, доступных на сайте BLAST Национального центра биотехнологической информации США (blast.ncbi.nlm.nih.gov). *Bl2seq* выполняет сравнение двух последовательностей с помощью алгоритма BLASTN или BLASTP. BLASTN применяют для сравнения нуклеотидных последовательностей, а BLASTP — для сравнения аминокислотных последовательностей. Другими подходящими программами являются, *например*, Needle, Stretcher, Water или Matcher, входящие в пакет программ биоинформатики EMBOSS и также доступные в Европейском институте биоинформатики (EBI) по адресу www.ebi.ac.uk/Tools/psa.

[0104] Выравнивание последовательностей можно проводить с использованием способов, известных в данной области техники, таких как MAFFT, Clustal (ClustalW, Clustal X или Clustal Omega), MUSCLE и т.д.

[0105] Каждая из различных областей в одной полинуклеотидной или полипептидной целевой последовательности, которая выравнивается с полинуклеотидной или полипептидной референтной последовательностью, может иметь свой собственный процент идентичности последовательностей. Отмечают, что процентное значение идентичности последовательности округляют до ближайшей десятой. Например, 80,11, 80,12, 80,13 и 80,14 округляются до 80,1, а 80,15, 80,16, 80,17, 80,18 и 80,19 округляются до 80,2. Также следует отметить, что значение длины всегда будет представлять собой целое число.

[0106] В некоторых аспектах процент идентичности (% ID) первой аминокислотной последовательности (или последовательности нуклеиновой кислоты) к второй аминокислотной последовательности (или последовательности нуклеиновой кислоты) рассчитывается как $\% \text{ ID} = 100 \times (Y/Z)$, где *Y* представляет собой количество аминокислотных остатков (или азотистых оснований), оцененных как идентичные совпадения при выравнивании первой и второй последовательностей (при выравнивании путем визуального осмотра или конкретной программы выравнивания последовательностей), а *Z* представляет собой общее количество остатков во второй последовательности. Если длина первой последовательности больше, чем длина второй последовательности, процент идентичности первой последовательности к второй

последовательности будет выше, чем процент идентичности второй последовательности к первой последовательности.

[0107] Специалисту в данной области техники будет понятно, что получение выравнивания последовательностей для вычисления процента идентичности последовательностей не ограничивается сравнениями бинарных последовательностей, обусловленными исключительно данными первичной последовательности. Также будет понятно, что выравнивания последовательностей могут быть получены путем интеграции данных последовательностей с данными из гетерогенных источников, таких как структурные данные (*например* кристаллографические структуры белков), функциональные данные (*например* местоположение мутаций) или филогенетические данные. Подходящей программой, которая объединяет разнородные данные для получения множественного выравнивания последовательностей, является T-Coffee, доступная на сайте www.tcoffee.org или в качестве альтернативы доступная, *например*, в EBI. Следует также отметить, что окончательное выравнивание, применяемое для расчета процента идентичности последовательности, может быть выполнено автоматически или вручную.

[0108] В контексте настоящего документа термины «выделенный», «очищенный», «экстрагированный» и их грамматические варианты применяются взаимозаменяемо и относятся к состоянию препарата желаемой композиции настоящего изобретения, прошедшего один или более процессов очистки. В некоторых аспектах выделение или очищение в контексте настоящего документа представляет собой процесс удаления, частичного удаления (*например*, фракции) композиции настоящего изобретения из образца, содержащего загрязняющие вещества. В некоторых аспектах выделенная композиция не имеет выявляемой нежелательной активности или, в альтернативном варианте, уровень или количество нежелательной активности находится на приемлемом уровне или ниже приемлемого уровня или количества. В других аспектах выделенная композиция имеет количество и/или концентрацию желаемой композиции настоящего изобретения на уровне или выше приемлемого количества и/или концентрации и/или активности. В других аспектах выделенная композиция обогащена по сравнению с исходным материалом, из которого получена композиция. Такое обогащение может составлять по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99%, по меньшей мере около 99,9%, по меньшей мере около 99,99%, по меньшей мере около 99,999%, по меньшей мере около 99,9999% или более

99,9999% по сравнению с исходным материалом. В некоторых аспектах выделенные препараты практически не содержат остаточных биологических продуктов. В некоторых аспектах выделенные препараты на 100%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 91% или по меньшей мере на 90% свободны от любых загрязняющих биологических веществ. Остаточные биологические продукты могут включать в себя абиотические материалы (включая химические вещества) или нежелательные нуклеиновые кислоты, белки, липиды или метаболиты.

[0109] В контексте настоящего документа термин «связанный» относится к первой аминокислотной последовательности или полинуклеотидной последовательности, ковалентно или нековалентно соединенной со второй аминокислотной последовательностью или полинуклеотидной последовательностью, соответственно. Первая аминокислотная или полинуклеотидная последовательность может быть непосредственно присоединена или соединена со второй аминокислотной или полинуклеотидной последовательностью, или, в альтернативном варианте, промежуточная последовательность может ковалентно присоединять первую последовательность ко второй последовательности. Термин «связанный» означает не только слияние первой полинуклеотидной последовательности со второй полинуклеотидной последовательностью на 5'-конце или 3'-конце, но также включает в себя вставку всей первой полинуклеотидной последовательности (или второй полинуклеотидной последовательности) в любые два нуклеотида во второй полинуклеотидной последовательности (или первой полинуклеотидной последовательности, соответственно). Первая полинуклеотидная последовательность может быть связана со второй полинуклеотидной последовательностью фосфодисложноэфирной связью или линкером. Линкер может представлять собой, *например*, полинуклеотид.

[0110] Термины «миРНК», «миР» или «микроРНК» применяются взаимозаменяемо и означают молекулу микроРНК, встречающуюся у эукариот, которая участвует в регуляции генов на основе РНК. Этот термин применяют для обозначения одноцепочечной молекулы РНК, полученной из предшественника. В настоящем документе приведены названия миРНК и их последовательностей, относящихся к настоящему изобретению. МикроРНК распознают и связываются с целевыми мРНК посредством несовершенного спаривания оснований, что приводит к дестабилизации или ингибированию трансляции целевой мРНК, и тем самым снижают экспрессию целевого гена. И наоборот, нацеливание на миРНК с помощью молекул, содержащих сайт связывания миРНК (обычно молекула, содержащая

последовательность, комплементарную затравочной области миРНК), может уменьшить или подавить вызванное миРНК ингибирование трансляции, что приведет к повышению экспрессии целевого гена.

[0111] Термины «несоответствие» или «несоответствия» относятся к одной или более нуклеотидным основаниям (непрерывным или обособленным) в последовательности нуклеотидных оснований олигомера, которые не соответствуют целевой пре-мРНК в соответствии с правилами спаривания оснований. Несмотря на то, что часто предпочитают совершенную комплементарность, однако некоторые аспекты могут включать в себя одно или более, но предпочтительно 6, 5, 4, 3, 2 или 1 несоответствие по отношению к целевой пре-мРНК. Вариации встречаются в различных местах олигомера. В некоторых аспектах антисмысловые олигомеры настоящего изобретения включают в себя вариации последовательности нуклеотидных оснований вблизи концов, вариации во внутренней части, и если они присутствуют, то обычно находятся в пределах около 6, 5, 4, 3, 2 или 1 субъединицы 5'- и/или 3'-концов. В некоторых аспектах можно удалить одно, два или три нуклеотидных оснований и при этом обеспечить связывание с мишенью.

[0112] В контексте настоящего документа термины «модулировать», «модифицировать» и их грамматические варианты при их применении, как правило, относятся к конкретной концентрации, уровню, экспрессии, функции или поведению, к способности изменять, увеличивая или уменьшая, *например*, непосредственно или опосредованно провоцируя/стимулируя/повышая регуляцию или препятствуя/ингибируя/понижая регуляцию конкретной концентрации, уровня, экспрессии, функции или поведения, *например*, в виде действия в качестве антагониста или агониста. В некоторых случаях модулятор может увеличивать и/или уменьшать определенную концентрацию, уровень, активность или функцию относительно контроля, или относительно среднего уровня активности, который обычно ожидается, или относительно контрольного уровня активности.

[0113] «Нуклеиновая кислота», «молекула нуклеиновой кислоты», «нуклеотидная последовательность», «полинуклеотид» и их грамматические варианты применяются взаимозаменяемо и относятся к фосфатносложноэфирной полимерной форме рибонуклеозидов (аденозин, гуанозин, уридин или цитидин; «молекулы РНК») или дезоксирибонуклеозидов (дезоксиаденозин, дезоксигуанозин, дезокситимидин или дезоксицитидин; «молекулы ДНК»), или любым их фосфосложноэфирным аналогам, таким как фосфоротиоаты и сложные тиоэфиры, в форме одноцепочечной или двухцепочечной спирали. Одноцепочечные нуклеотидные последовательности относятся к одноцепочечным ДНК (оцДНК) или одноцепочечным РНК (оцРНК). Возможны

двухцепочечные спирали ДНК-ДНК, ДНК-РНК и РНК-РНК. Термин молекула нуклеиновой кислоты, и в частности молекула ДНК или РНК, относится только к первичной и вторичной структурам молекулы и не ограничивает ее какими-либо конкретными третичными формами. Таким образом, этот термин включает в себя двухцепочечную ДНК, содержащуюся, *помимо прочего*, в молекулах линейных или кольцевых ДНК (*например*, в рестрикционных фрагментах), плаزمидях, суперспиральных ДНК и хромосомах. При обсуждении структуры конкретных двухцепочечных молекул ДНК последовательности могут быть описаны в настоящем документе в соответствии с обычной конвенцией, согласно которой приводится только последовательность в направлении от 5'- к 3'-концу вдоль нетранскрибируемой нити ДНК (*т. е.* нити, имеющей последовательность, гомологичную мРНК). «Молекула рекомбинантной ДНК» представляет собой молекулу ДНК, подвергшуюся молекулярно-биологической манипуляции. ДНК включает в себя, помимо прочего, кДНК, геномную ДНК, плазмидную ДНК, синтетическую ДНК и полусинтетическую ДНК. «Композиция нуклеиновой кислоты» изобретения содержит одну или более нуклеиновых кислот, как описано в настоящем документе.

[0114] Выражения «парентеральное введение» и «введено парентерально» в контексте настоящего документа означают способы введения, отличные от энтерального введения и местного применения, обычно путем инъекции, и включают в себя, помимо прочего, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсулярную, внутриорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную и интрастернальную инъекцию и инфузию.

[0115] Термины «фармацевтически приемлемый носитель», «фармацевтически приемлемый эксципиент» и их грамматические вариации охватывают любой из агентов, одобренных регулирующим органом федерального правительства США или включенных в Фармакопею США для применения у животных, в том числе человека, а также любой носитель или разбавитель, который не вызывает нежелательных физиологических эффектов такой выраженности, при которой запрещают введение композиции субъекту, и не подавляет биологическую активность и свойства вводимого соединения. Имеются эксципиенты и носители, которые полезны при приготовлении фармацевтической композиции и, как правило, безопасны, нетоксичны и желательны.

[0116] В контексте настоящего документа термин «фармацевтическая композиция» относится к одному или более соединениям, описанным в настоящем документе, таким как, *например*, мицелла настоящего изобретения, смешанным или перемешанным, или

суспендированным в одном или более других химических компонентах, таких как фармацевтически приемлемые носители и эксципиенты. Одна из целей фармацевтической композиции представляет собой облегчение введения препаратов мицелл субъекту.

[0117] Термин «полинуклеотид» в контексте настоящего документа относится к полимерам нуклеотидов любой длины, в том числе рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды, их аналоги или смеси. Этот термин относится к первичной структуре молекулы. Таким образом, термин включает трех-, двух- и одноцепочечную дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), а также трех-, двух- и одноцепочечную рибонуклеиновую кислоту (РНК). Он также включает модифицированные, например, путем алкилирования и/или кэппирования, и немодифицированные формы полинуклеотида.

[0118] В частности, термин «полинуклеотид» включает в себя полидезоксирибонуклеотиды (содержащие 2-дезокси-D-рибозу), полирибонуклеотиды (содержащие D-рибозу), в том числе сплайсированные или несплайсированные тРНК, рРНК, гРНК, киРНК и мРНК, любой другой тип полинуклеотида, который является N- или C-гликозидом пуринового или пиримидинового основания, и другие полимеры, содержащие ненуклеотидные остовы, например, полиамид (*например*, пептидные нуклеиновые кислоты «PNA») и полиморфолинополимеры, а также другие синтетические полимеры с заданной последовательностью нуклеиновых кислот, при условии, что полимеры содержат нуклеотидные основания в конфигурации, позволяющей спаривание и стэкинг-взаимодействие оснований, как это происходит в ДНК и РНК.

[0119] В некоторых аспектах настоящего изобретения полинуклеотид может представлять собой, *например*, олигонуклеотид, такой как антисмысловой олигонуклеотид. В некоторых аспектах олигонуклеотид представляет собой РНК. В некоторых аспектах РНК представляет собой синтетическую РНК. В некоторых аспектах синтетическая РНК содержит по меньшей мере одно нуклеотидное основание не природного происхождения. В некоторых аспектах все нуклеотидные основания определенного класса заменены на нуклеотидные основания не природного происхождения (*например*, все молекулы уридина в полинуклеотиде, раскрытом в настоящем документе, могут быть заменены на нуклеотидное основание не природного происхождения, *например*, 5-метоксиуридин).

[0120] Термины «полипептид», «пептид» и «белок» в настоящем документе применяются взаимозаменяемо и относятся к полимерам аминокислот любой длины. Полимер может содержать модифицированные аминокислоты. Термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован естественным образом или путем вмешательства; например, образованием дисульфидной связи, гликозилированием, липидированием, ацетилением, фосфорилированием или любой другой манипуляцией

или модификацией, такой как конъюгация с метящим компонентом. Определение также включает в себя, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов аминокислот (в том числе, например, аминокислоты не природного происхождения, такие как гомоцистеин, орнитин, p-ацетилфенилаланин, D-аминокислоты и креатин), а также другие модификации, известные в данной области. Термин «полипептид» в контексте настоящего документа относится к белкам, полипептидам и пептидам любого размера, структуры или функции. Полипептиды включают в себя продукты генов, полипептиды природного происхождения, синтетические полипептиды, гомологи, ортологи, паралоги, фрагменты и другие эквиваленты, варианты и аналоги приведенных выше веществ. Полипептид может представлять собой один полипептид или мультимолекулярный комплекс, такой как димер, тример или тетрамер. Они также могут содержать одноцепочечные или многоцепочечные полипептиды. Чаще всего в многоцепочечных полипептидах встречаются дисульфидные связи. Термин «полипептид» также может относиться к аминокислотным полимерам, в которых один или более аминокислотных остатков являются искусственными химическими аналогами соответствующей аминокислоты природного происхождения. В некоторых аспектах «пептид» может иметь длину менее или равную 50 аминокислотам, *например*, около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот.

[0121] Термины «предотвращать», «предотвращение» и их варианты в контексте настоящего документа относятся к частичной или полной отсрочке начала заболевания, расстройства и/или патологического состояния; частичной или полной отсрочке начала одного или более симптомов, признаков или клинических проявлений конкретного заболевания, расстройства и/или патологического состояния; частичной или полной отсрочке начала одного или более симптомов, признаков или проявлений конкретного заболевания, расстройства и/или патологического состояния; частичной или полной отсрочке прогрессирования конкретного заболевания, расстройства и/или патологического состояния; и/или снижению риска развития патологии, связанной с заболеванием, расстройством и/или патологическим состоянием. В некоторых аспектах предотвращение исхода достигается путем профилактического лечения.

[0122] В контексте настоящего документа «профилактический» относится к терапии или курсу действий, применяемых для предотвращения начала заболевания или патологического состояния, или для предотвращения или отсрочки симптома, связанного с заболеванием или патологическим состоянием.

[0123] В контексте настоящего документа «профилактика» означает меру, принятую для поддержания здоровья и предотвращения или отсрочки начала эпизода кровотечения, или

для предотвращения или отсрочки симптомов, связанных с заболеванием или патологическим состоянием.

[0124] В контексте настоящего документа термин «сходство» относится к общему родству между полимерными молекулами, *например*, между молекулами полинуклеотидов (*например*, молекулами ДНК и/или молекулами РНК) и/или между молекулами полипептидов. Расчет процента сходства полимерных молекул друг с другом может быть выполнен таким же образом, как и расчет процента идентичности, за исключением того, что при расчете процента сходства учитывают консервативные замены, как известно в данной области. Понятно, что процент сходства зависит от применяемой шкалы сравнения, *т. е.* сравниваются ли аминокислоты, *например*, по их эволюционной близости, заряду, объему, гибкости, полярности, гидрофобности, ароматичности, изоэлектрической точке, антигенности или их комбинациям.

[0125] Термины «субъект», «пациент», «индивидуум», «хозяин» и их варианты применяются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к любым млекопитающим субъектам, включая, помимо прочего, людей, домашних животных (*например*, собак, кошек и им подобных), сельскохозяйственных животных (*например*, коров, овец, свиней, лошадей и им подобных) и лабораторных животных (*например*, обезьян, крыс, мышей, кроликов, морских свинок и им подобных), для которых желательны диагностика, лечение или терапия, в частности людей. Способы, описанные в настоящем документе, применимы как в терапии человека, так и в ветеринарии.

[0126] В контексте настоящего документа выражение «нуждающийся в этом субъект» включает в себя субъектов, таких как млекопитающие субъекты, на которых введение мицелл изобретения окажет положительный эффект, *например*, в виде улучшения гемостаза.

[0127] Выражения «системное введение», «введенный системно», «периферическое введение» и «введенный периферически» в контексте настоящего документа означают введение соединения, лекарственного средства или другого материала не непосредственно в центральную нервную систему, а так, чтобы он попал в организм пациента и, таким образом, подвергся метаболизму и другим подобным процессам, например, подкожное введение.

[0128] В контексте настоящего изобретения термин «терапевтически эффективное количество» представляет собой количество реагента или фармацевтического состава, включающего мицеллу настоящего изобретения, достаточное для получения желаемого терапевтического эффекта, фармакологического и/или физиологического воздействия на нуждающийся в этом субъект. Терапевтически эффективное количество может быть

«профилактически эффективным количеством», поскольку профилактика может считаться терапией.

[0129] Термины «лечить», «лечение» или «обработка» в контексте настоящего документа относятся, *например*, к уменьшению тяжести заболевания или патологического состояния; уменьшению продолжительности течения заболевания; облегчению или устранению одного или более симптомов, связанных с заболеванием или патологическим состоянием; оказанию благоприятного воздействия на субъекта с заболеванием или патологическим состоянием, без обязательного излечения заболевания или патологического состояния. Этот термин также включает в себя профилактику или предотвращение заболевания или патологического состояния или их симптомов. В одном аспекте термин «обработка» или «лечение» обозначает индуцирование иммунного ответа у субъекта против антигена.

[0130] Термин «по ходу транскрипции» обозначает нуклеотидную последовательность, которая расположена 5'-концом к эталонной нуклеотидной последовательности.

II. Молекулы носителей

[0131] Согласно настоящему изобретению предложены молекулы носителей, способные самостоятельно собираться в мицеллы или включаться в мицеллы. Молекулы носителей настоящего изобретения содержат фрагмент водорастворимого биополимера (*например*, ПЭГ) и заряженный фрагмент носителя. В некоторых аспектах заряженный фрагмент носителя является катионом (*например*, полилизин), а в других аспектах заряженный фрагмент носителя является анионом (*например*, полиглутаминовая кислота), как показано на **ФИГ. 1**.

[0132] Молекулы носителей настоящего изобретения можно применять для доставки заряженных полезных нагрузок (*например*, терапевтических или диагностических средств). Молекулы носителей с заряженным катионным фрагментом носителя можно применять для доставки анионных полезных нагрузок, *например*, полинуклеотидов. Молекулы носителей с заряженным анионным фрагментом носителя можно применять для доставки катионных полезных нагрузок, *например*, положительно заряженных низкомолекулярных лекарственных средств. См. **ФИГ. 1**.

[0133] Нейтральные или гидрофобные полезные нагрузки также можно доставить с помощью молекул носителей настоящего изобретения путем использования адаптера (*например*, катионного или анионного адаптера, как показано на **ФИГ. 2**). Адаптеры ковалентно связываются, *например*, с гидрофобной полезной нагрузкой и обеспечивают такой полезной нагрузке соответствующий заряд для взаимодействия с заряженным фрагментом носителя молекулы носителя настоящего изобретения. Таким образом, в некоторых аспектах полезная нагрузка настоящего изобретения может содержать

заряженный фрагмент («адаптерный» фрагмент), который может взаимодействовать с заряженным фрагментом носителя молекулы носителя настоящего изобретения (например, посредством электростатического взаимодействия), и биологически активный фрагмент (например, фрагмент в виде лекарственного вещества). В некоторых аспектах адаптерный фрагмент и биологически активный фрагмент связаны непосредственно, в то время как в некоторых других аспектах они могут быть связаны посредством линкера.

[0134] В результате электростатического взаимодействия между

(i) заряженным фрагментом носителя и
(ii) заряженной полезной нагрузкой (*например*, нуклеотидной последовательностью, *например*, олигонуклеотидом, кРНК, кшРНК и т. д.) или его заряженной частью (например, адаптерным фрагментом), в котором

a. заряженный фрагмент носителя и заряженная полезная нагрузка или ее заряженная часть имеют разные суммарные заряды (*т. е.* один из них является катионным, а другой — анионным), а

b. суммарные заряды сходны или идентичны (*т. е.* количество зарядов на заряженном фрагменте молекулы носителя и на заряженной полезной нагрузке или ее заряженной части сходно или идентично),

заряды заряженного фрагмента и заряды заряженной полезной нагрузки или адаптера нейтрализуют друг друга, образуя комплекс из молекулы носителя и полезной нагрузки.

[0135] Полученный комплекс из молекулы носителя и полезной нагрузки является амфипатическим, с гидрофильной «головкой», содержащей фрагмент водорастворимого биополимера, и гидрофобным «хвостиком», содержащим заряженный фрагмент носителя, электростатически связанного с полезной нагрузкой.

[0136] Комплексы из молекул носителя и полезной нагрузки могут самостоятельно ассоциироваться, отдельно или в сочетании с другими амфипатическими молекулами, образуя мицеллы, в которых полезная нагрузка находится в сердцевине мицеллы, а фрагмент водорастворимого биополимера обращен к растворителю. Термин «мицеллы настоящего изобретения» охватывает не только классические мицеллы, но также и мелкие частицы, мелкие мицеллы, мицеллы, стержневидные структуры или полимерсомы. Учитывая то, что в полимерсомах имеется люминальное пространство, следует понимать, что все изобретения, касающиеся «сердцевины» классических мицелл, в равной степени применимы к люминальному пространству в полимерсомах, содержащих молекулы носителя настоящего изобретения. Таким образом, в некоторых аспектах мицеллы настоящего изобретения могут содержать молекулы полезной нагрузки, присоединенные к молекулам носителя настоящего изобретения, и молекулы полезной нагрузки в

люминальном пространстве мицеллы (например, в просвете полимерсомы). В некоторых аспектах полезная нагрузка, присоединенная к молекулам носителя, и полезная нагрузка в люминальном пространстве одинаковые. В некоторых аспектах полезная нагрузка, присоединенная к молекулам носителя, и полезная нагрузка в люминальном пространстве отличаются.

[0137] Молекулы носителя настоящего изобретения могут также содержать нацеливающий фрагмент, ковалентно связанный с фрагментом водорастворимого биополимера посредством одного или более необязательных линкеров. После образования мицеллы нацеливающий фрагмент располагается на поверхности мицеллы и может доставлять мицеллу в конкретную ткань-мишень, к конкретному типу клеток и/или способствовать переносу через физиологический барьер (*например*, плазматическую мембрану клетки или ГЭБ). В некоторых аспектах мицеллы настоящего изобретения могут содержать более одного типа нацеливающего фрагмента.

[0138] Молекулы носителя настоящего изобретения могут также содержать фрагмент адьюванта, ковалентно связанный с заряженным фрагментом носителя. Фрагмент адьюванта может служить двойной цели: он может обеспечивать заряд для электростатического взаимодействия с полезной нагрузкой, и/или может оказывать, *например*, терапевтический эффект, совместный с терапевтическим эффектом, или положительно влиять на гомеостаз клетки-мишени или ткани-мишени.

[0139] Как схематично показано на **ФИГ. 1**, в некоторых аспектах полезная нагрузка не связана ковалентно с молекулой носителя. Однако в других аспектах полезная нагрузка может быть ковалентно связана с молекулой носителя, *например*, с помощью линкера, такого как расщепляемый линкер.

[0140] Неограничивающие примеры различных аспектов представлены в настоящем изобретении. Изобретение, в частности, относится к применению молекул катионных носителей, *например*, для доставки анионных полезных нагрузок, таких как нуклеиновые кислоты. Однако специалисту в данной области будет очевидно, что раскрытые изобретения могут быть в равной степени применены для доставки катионных полезных нагрузок или для доставки нейтральных полезных нагрузок путем изменения зарядов фрагмента носителя и полезной нагрузки (*т. е.* применением фрагмента анионного носителя в молекуле носителя для доставки катионной полезной нагрузки), или путем применения нейтральной полезной нагрузки, связанного с катионным или анионным адаптером, который будет электростатически взаимодействовать с фрагментом анионного или катионного носителя, соответственно.

[0141] Соответственно, в одном аспекте согласно настоящему изобретению предложены молекулы катионных носителей по схеме I или схеме II:

[WP]-L1-[CC]-L2-[AM] (схема I),

[WP]-L1-[AM]-L2-[CC] (схема II),

где

WP — фрагмент водорастворимого биополимера (*например*, ПЭГ);

CC — фрагмент катионного носителя, например, полилизин;

AM — фрагмент адьюванта, например, витамин, например, витамин B3; и

L1 и L2 — самостоятельные необязательные линкеры.

[0142] Согласно настоящему изобретению также предложены молекулы анионных носителей по схеме III или схеме IV:

[WP]-L1-[AC]-L2-[AM] (схема III),

[WP]-L1-[AM]-L2-[AC] (схема IV),

где

WP — фрагмент водорастворимого биополимера (*например*, ПЭГ);

AC — фрагмент анионного носителя;

AM — фрагмент адьюванта; и

L1 и L2 — самостоятельные необязательные линкеры.

[0143] Согласно настоящему изобретению также предложены молекулы катионных и анионных носителей по схемам V–VIII:

[WP]-L1-[AC]-L2-[AM]-L3-[P] (схема V),

[WP]-L1-[AM]-L2-[AC]-L3-[P] (схема VI),

[WP]-L1-[AC]-L2-[AM]-L3-[P] (схема VII),

[WP]-L1-[AM]-L2-[AC]-L3-[P] (схема VIII),

где

WP — фрагмент водорастворимого биополимера (*например*, ПЭГ);

AC — фрагмент анионного носителя;

CC — фрагмент катионного носителя;

AM — фрагмент адьюванта;

L1 и L2 — самостоятельные необязательные линкеры;

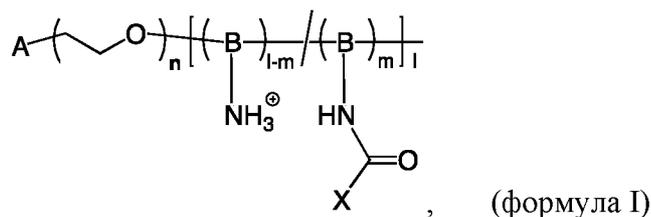
L3 — необязательный линкер, который может быть расщепляемым; и

P — полезная нагрузка.

[0144] В некоторых аспектах конструкций по представленным выше схемам I–VIII компонент [WP] может быть соединен по меньшей мере с одним нацеливающим фрагментом, т. е. $[T]_n\text{-[WP]-...}$, где n — целое число, например, 1, 2 или 3.

[0145] На **ФИГ. 3** представлено схематическое изображение молекулы катионного носителя настоящего изобретения. Для простоты молекула на **ФИГ. 3** была представлена в линейном виде. Однако в некоторых аспектах молекулы носителя могут содержать фрагменты СС и АМ, расположенные таким образом, что образуют разветвленный каркас (см. **ФИГ. 4** и **ФИГ. 5**), например, с полимерным фрагментом СС, состоящим из положительно заряженных молекул, и АМ, присоединенным в одной или более точках вдоль фрагмента СС. В других аспектах СС и АМ могут быть присоединены к поддерживающему фрагменту, как показано на **ФИГ. 5**.

[0146] В некоторых аспектах молекулы носителя настоящего изобретения содержат:



A — нацеливающий фрагмент, *например*, молекула, нацеленная на переносчик LAT1,

B — блоки катионного полимера в фрагменте катионного носителя,

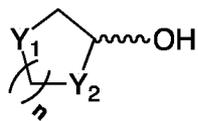
где

(i) l — целое число от около 1 до около 200; *например*, от около 2 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50 до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150, от около 150 до около 160, от около 160 до около 170, от около 170 до около 180, от около 180 до около 190 или от около 190 до около 200;

(ii) m — целое число от 1 до 150, *например*, от около 2 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50 до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150; и

(iii) n — целое число от около 1 до около 200; *например*, от около 2 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50 до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150, от около 150 до около 160, от около 160 до около 170, от около 170 до около 180, от около 180 до около 190 или от около 190 до около 200;

и при этом X представляет собой фрагмент адьюванта, например, витамин, *например*,



(формула II);

причем Y1 представляет собой C, N, O или S, Y2 — C, N O или S, a n — 1 или 2. В некоторых аспектах X может представлять собой —SH (например, сульфонильную группу, алканетиолы или алкилтиолы). В некоторых аспектах мицелла настоящего изобретения содержит один тип молекул катионных носителей, конъюгированных с витамином, например, витамином В3, и другой тип молекул катионных носителей, конъюгированных с сульфонильной группой (например, алканетиолами или алкилтиолами). В некоторых аспектах мицелла настоящего изобретения содержит первый тип молекул катионных носителей, конъюгированных с витамином, например, витамином В3, второй тип молекул катионных носителей, конъюгированных с сульфонильной группой (например, алканетиолами или алкилтиолами), а также третий тип молекул катионных носителей, представляющие собой свободные основания.

[0147] При смешении молекул катионных носителей настоящего изобретения с анионной полезной нагрузкой (*например*, нуклеиновой кислотой) при соотношении ионов примерно 1:1, *т. е.* количество отрицательных зарядов в анионной полезной нагрузке и количество положительных зарядов в фрагменте катионного носителя примерно одинаково, нейтрализация отрицательных зарядов в анионной полезной нагрузке положительными зарядами в фрагменте катионного носителя в основном посредством электростатического взаимодействия приводит к образованию комплекса молекулы катионного носителя и анионной полезной нагрузки, имеющей неизменную гидрофильную часть (содержащую фрагмент WP) и значительно более гидрофобную часть (образующуюся в результате ассоциации фрагмента катионного носителя с фрагментом адьюванта и анионной полезной нагрузкой).

[0148] В некоторых аспектах фрагмент адьюванта может добавить свои положительные заряды к положительным зарядам фрагмента катионного носителя, которые взаимодействуют с отрицательными зарядами анионной полезной нагрузки. Следует понимать, что указания на взаимодействия (*например*, электростатические взаимодействия) между фрагментом катионного носителя и анионной полезной нагрузкой также включают в себя взаимодействия между зарядами фрагмента катионного носителя с фрагментом адьюванта и зарядами анионной полезной нагрузки.

[0149] Увеличение гидрофобности фрагмента катионного носителя молекулы катионного носителя в результате нейтрализации его положительных зарядов за счет

электростатического взаимодействия с отрицательными зарядами анионной полезной нагрузки приводит к образованию амфипатического комплекса. Такие амфипатические комплексы могут самостоятельно организовываться, отдельно или в сочетании с другими амфипатическими компонентами, в мицеллы. Полученные мицеллы содержат фрагменты WP, обращенные к растворителю (*т. е.* фрагменты WP обращены к внешней поверхности мицеллы), тогда как фрагменты СС и АМ, а также ассоциированная полезная нагрузка (*например*, нуклеотидная последовательность, *например*, олигонуклеотид, кшРНК, кшРНК, «антимир» или любая их комбинация) находятся в сердцевине мицеллы.

[0150] В некоторых конкретных аспектах молекула катионного носителя содержит:

- (а) фрагмент WP, в котором водорастворимый биополимер представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ) формулы III (см. ниже), где n составляет от около 120 до около 130 ПЭГ (*например*, ПЭГ представляет собой PEG5000 или PEG6000);
- (b) фрагмент СС, в котором фрагмент катионного носителя содержит, *например*, от около 30 до около 40 молекул лизина (*например*, линейный поли(L-лизин) n , где n составляет от около 30 до около 40), полиэтиленимин (PEI) или хитозан; и
- (c) фрагмент АМ, в котором фрагмент адъюванта имеет от около 5 до около 10 молекул витамина B3 (*например*, от около 5 до около 10 сцепленных молекул витамина B3).

[0151] В некоторых аспектах молекула катионного носителя содержит:

- (а) фрагмент WP, в котором водорастворимый биополимер представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ) формулы III (см. ниже), где n составляет от около 120 до около 130 ПЭГ (*например*, ПЭГ представляет собой PEG5000 или PEG6000);
- (b) фрагмент СС, в котором фрагмент катионного носителя содержит, *например*, от около 60 до около 100 молекул лизина (*например*, линейный поли(L-лизин) n , где n составляет от около 60 до около 100), *например*, от около 70 до около 90 молекул лизина, около 80 молекул лизина, полиэтиленимин (PEI) или хитозан; и
- (c) фрагмент АМ, в котором фрагмент адъюванта имеет от около 10 до около 50 молекул витамина B3 (*например*, от около 10 до около 50 сцепленных молекул витамина B3, *например*, от около 20 до около 40 молекул, *например*, около 30 молекул).

[0152] В некоторых аспектах молекула катионного носителя дополнительно содержит по меньшей мере один нацеливающий фрагмент, присоединенный к фрагменту WP молекулы катионного носителя. В некоторых аспектах количество и/или плотность нацеливающих фрагментов, представленных на поверхности мицеллы, можно регулировать с помощью определенного соотношения молекул катионного носителя с нацеливающими фрагментами и молекул катионного носителя без нацеливающих фрагментов. В некоторых аспектах соотношение молекул катионного носителя с нацеливающими фрагментами и молекул

катионного носителя без нацеливающих фрагментов составляет по меньшей мере около 1:5, по меньшей мере около 1:10, по меньшей мере около 1:20, по меньшей мере около 1:30, по меньшей мере около 1:40, по меньшей мере около 1:50, по меньшей мере около 1:60, по меньшей мере около 1:70, по меньшей мере около 1:80, по меньшей мере около 1:90, по меньшей мере около 1:100, по меньшей мере около 1:120, по меньшей мере около 1:140, по меньшей мере около 1:160, по крайней мере около 1:180, по крайней мере около 1:200, по крайней мере около 1:250, по крайней мере около 1:300, по крайней мере около 1:350, по крайней мере около 1:400, по крайней мере около 1:450, по крайней мере около 1:500, по крайней мере около 1:600, по крайней мере около 1:700, по крайней мере около 1:800, по крайней мере около 1:900 или по крайней мере около 1:1000.

[0153] В некоторых аспектах молекула катионного носителя содержит:

- (i) нацеливающий фрагмент (A), который нацелен на переносчик LAT1 (*например*, фенилаланин);
- (ii) водорастворимый полимер, представленный ПЭГ;
- (iii) фрагмент катионного носителя, содержащий блоки катионного полимера, представленные лизином; и
- (iv) два или более фрагментов адьюванта, представленные витамином B3.

[0154] В некоторых аспектах молекула катионного носителя содержит:

- (i) нацеливающий фрагмент (A), который нацелен на переносчик LAT1 (*например*, фенилаланин);
- (ii) водорастворимый полимер, представленный ПЭГ, где $n = 100-200$, например, 100–150, например, 120–130;
- (iii) фрагмент катионного носителя, содержащий блоки катионного полимера, например, полилизин; и
- (iv) два или более фрагментов адьюванта, например, витамин B3.

[0155] В некоторых аспектах молекула катионного носителя содержит:

- (i) нацеливающий фрагмент (A), который нацелен на переносчик LAT1 (*например*, фенилаланин);
- (ii) водорастворимый полимер, представленный ПЭГ, где $n = 100-200$, например, 100–150, например, 120–130;
- (iii) фрагмент катионного носителя, содержащий блоки катионного полимера, например 10–100 молекул лизина, например, 10–50 молекул лизина, например, 30–40 молекул лизина, например, 70–80 молекул лизина; и
- (iv) два или более фрагментов адьюванта, например, витамин B3, например, 25–30 молекул витамина B3.

[0156] В некоторых аспектах молекула катионного носителя содержит:

- (i) нацеливающий фрагмент (А), который нацелен на переносчик LAT1 (*например*, фенилаланин);
- (ii) водорастворимый полимер, представленный ПЭГ, где $n = 100-200$, например, 100–150, например, 120–130;
- (iii) фрагмент катионного носителя, содержащий блоки катионного полимера, например 10–100 молекул лизина, например, 10–50 молекул лизина, например, 30–40 молекул лизина, например, 70–80 молекул лизина; и
- (iv) два или более фрагментов адъюванта, например, 5–50 молекул витамина В3, например, 5–30 молекул витамина В3, например, 5–20 молекул витамина В3, например, 5–15 молекул витамина В3, например, 5–10 молекул витамина В3, например, 25–30 молекул витамина В3.

[0157] Как показано на примере (схема I), фрагмент СС может быть полимером, содержащим несколько молекул В (причем каждая молекула В может представлять собой, *например*, лизин), а фрагмент АМ может представлять собой недискретное химическое соединение, содержащее несколько молекул Х (*например*, молекул витамина), ковалентно присоединенных к точкам присоединения боковой цепи на фрагменте СС. Таким образом, в конкретном аспекте молекула катионного носителя содержит:

- (i) нацеливающий фрагмент (А), который нацелен на переносчик LAT1 (*например*, фенилаланин);
- (ii) водорастворимый полимер, представленный ПЭГ, причем $n = 120-130$;
- (iii) фрагмент катионного носителя, содержащий 30–40, 40–50, 50–60 или 70–80 блоков катионного полимера В, представленных лизином; и
- (iv) 5–10, 10–20, 20–25 или 25–30 фрагментов адъюванта Х, представленных витамином В3.

[0158] В некоторых аспектах молекула катионного носителя настоящего изобретения взаимодействует с полезной нагрузкой в виде антисмыслового олигонуклеотида, нацеленного на miR-485-3p, *например*, AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC (SEQ ID NO: 18). В некоторых аспектах молекула носителя в комплексе с полезной нагрузкой образует мицеллу.

[0159] В некоторых аспектах молекулы витамина В3 вводят в боковые цепи фрагмента СС, *например*, путем реакции сочетания между группами NH₂ в молекулах лизина и группами COOH витамина В3 в присутствии подходящих конъюгирующих реагентов, например, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимид (NHS).

[0160] Согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая молекулу носителя (*например*, молекулу катионного носителя) настоящего изобретения. В других

аспектах согласно настоящему изобретению предложены комплексы, содержащие молекулу носителя (*например*, молекулу катионного носителя) настоящего изобретения, нековалентно присоединенную к полезной нагрузке (*например*, анионной полезной нагрузке, такой как нуклеотидная последовательность, *например*, олигонуклеотид, киРНК, кшРНК, «антимир» или любая их комбинация), в которых молекула носителя и полезная нагрузка взаимодействуют электростатически. В других аспектах согласно настоящему изобретению предложены конъюгаты, содержащие молекулу носителя (*например*, молекулу катионного носителя) настоящего изобретения, ковалентно присоединенную к полезной нагрузке (*например*, анионной полезной нагрузке, такой как нуклеотидная последовательность, *например*, олигонуклеотид, киРНК, кшРНК, «антимир» или любая их комбинация), в которых молекула носителя и полезная нагрузка взаимодействуют электростатически. В некоторых аспектах молекула носителя и полезная нагрузка могут быть связаны с помощью отщепляемого линкера. В некоторых аспектах молекула носителя и полезная нагрузка помимо электростатического взаимодействия могут взаимодействовать ковалентно (*например*, после электростатического взаимодействия молекула носителя и полезная нагрузка могут быть «заперты» посредством дисульфидной связи или расщепляемой связи).

[0161] В некоторых конкретных аспектах молекула катионного носителя содержит водорастворимый биополимер, содержащий от около 120 до около 130 молекул ПЭГ, фрагмент катионного носителя, содержащий полилизин с от около 30 до около молекул лизина, и фрагмент адьюванта, содержащий от около 5 до около 10 молекул витамина В3.

[0162] В некоторых аспектах молекула катионного носителя ассоциирована с отрицательно заряженной полезной нагрузкой (*например*, нуклеотидной последовательностью, *например*, олигонуклеотидом (например, антисмысловым олигонуклеотидом), киРНК, кшРНК, «антимир» или любой их комбинацией), которая взаимодействует с молекулой катионного носителя посредством по меньшей мере одной ионной связи (*т. е.* посредством электростатического взаимодействия) с фрагментом катионного носителя молекулы катионного носителя.

[0163] В некоторых аспектах мицелла настоящего изобретения может быть сконструирована на основе формулы, показанной на **ФИГ. 6**. В некоторых аспектах $mB/(nA+mB)$ мицеллы составляет больше 0 и меньше 1, *например*, от около 0,25 до около 1, от около 0,3 до около 1, от около 0,4 до около 1, от около 0,5 до около 1, от около 0,25 до около 0,9, от около 0,3 до около 0,9, от около 0,4 до около 0,9, от около 0,5 до около 0,9, от около 0,25 до около 0,8, от около 0,3 до около 0,8, от около 0,4 до около 0,8, от около 0,5 до около 0,8, от около 0,25 до около 0,75, от около 0,3 до около 0,75, от около 0,4 до около 0,75,

от около 0,5 до около 0,75, от около 0,25 до около 0,7, от около 0,3 до около 0,7, от около 0,4 до около 0,7, от около 0,5 до около 0,7, от около 0,25 до около 0,6, от около 0,3 до около 0,6, от около 0,4 до около 0,6, от около 0,5 до около 0,6, от около 0,45 до около 0,55, от около 0,4 до около 0,65 или от около 0,5 до около 0,65,

причем nA составляет $\sum_{i=0}^{1000} PEG$, а mB составляет $\sum_{i=0}^{1000} Lys$.

[0164] В некоторых аспектах $mB/(nA+mB)$ мицеллы составляет от около 0,4 до около 0,6, от около 0,5 до около 0,6 или от около 0,4 до около 0,5,

причем nA составляет $\sum_{i=0}^{1000} PEG$, а mB составляет $\sum_{i=0}^{1000} Lys$. В некоторых аспектах $mB/(nA+mB)$ мицеллы составляет около 0,5,

причем nA составляет $\sum_{i=0}^{1000} PEG$, а mB составляет $\sum_{i=0}^{1000} Lys$.

[0165] Конкретные компоненты молекул катионных носителей настоящего изобретения подробно описаны ниже.

а. Водорастворимый биополимер

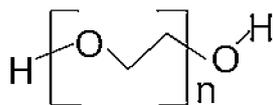
[0166] В некоторых аспектах молекулы катионных носителей настоящего изобретения содержат по меньшей мере один водорастворимый биополимер. В контексте настоящего документа термин «водорастворимый биополимер» относится к биосовместимому, биологически инертному, неиммуногенному, нетоксичному и гидрофильному полимеру, например, ПЭГ.

[0167] В некоторых аспектах водорастворимый полимер содержит поли(алкиленгликоли), поли(оксиэтилированный полиол), поли(спирт олефинового ряда), поли(винилпирролидон), поли(гидроксиалкилметакриламид), поли(гидроксиалкилметакрилат), поли(сахариды), поли(α -гидроксикислоту), поли(виниловый спирт), полиглицерин, полифосфазен, полиоксазолины (POZ), поли(N-акрилоилморфолин) или любые их комбинации. В некоторых аспектах водорастворимый биополимер является линейным, разветвленным или дендритным.

[0168] В некоторых аспектах водорастворимый биополимер содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ), полиглицерин (ПГ) или поли(пропиленгликоль) (ППГ). ППГ является менее токсичным, чем ПЭГ, поэтому многие биологические продукты в настоящее время производят с использованием ППГ вместо ПЭГ.

[0169] В некоторых аспектах водорастворимый биополимер содержит ПЭГ, характеризующийся формулой $R^3-(O-CH_2-CH_2)_n-$ или $R^3-(O-CH_2-CH_2)_n-O-$, где R^3 —

водород, метил или этил, а n имеет значение от 2 до 200. В некоторых аспектах ПЭГ имеет формулу



(формула III),

где n составляет от 1 до 1000.

[0170] В некоторых аспектах n ПЭГ имеет значение 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199 или 200.

[0171] В некоторых аспектах n составляет по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 90, по меньшей мере около 100, по меньшей мере около 110, по меньшей мере около 120, по меньшей мере около 130, по меньшей мере около 140, по меньшей мере около 150, по меньшей мере около 160, по меньшей мере около 170, по меньшей мере около 180, по меньшей мере около 190, по меньшей мере около 200, по меньшей мере около 210, по меньшей мере около 220, по меньшей мере около 230, по меньшей мере около 240, по меньшей мере около 250, по меньшей мере около 260, по меньшей мере около 270, по меньшей мере около 280, по меньшей мере около 290, по меньшей мере около 300, по меньшей мере около 310, по меньшей мере около 320, по меньшей мере около 330, по меньшей мере около 340, по меньшей мере около 350, по меньшей мере около 360, по меньшей мере около 370, по меньшей мере около 380, по меньшей мере около 390, по меньшей мере около 400, по меньшей мере около 410, по меньшей мере около 420, по меньшей мере около 430, по меньшей мере около 440, по меньшей мере около 450, по меньшей мере около 460, по меньшей мере около 470, по меньшей мере около 480, по меньшей мере около 490, по меньшей мере около 500, по меньшей мере около 510, по меньшей мере около 520, по меньшей мере около 530, по меньшей мере около 540, по меньшей мере около 550, по меньшей мере около 560, по

меньшей мере около 119, по меньшей мере около 120, по меньшей мере около 121, по меньшей мере около 122, по меньшей мере около 123, по меньшей мере около 124, по меньшей мере около 125, по меньшей мере около 126, по меньшей мере около 127, по меньшей мере около 128, по меньшей мере около 129, по меньшей мере около 130, по меньшей мере около 131, по меньшей мере около 132, по меньшей мере около 133, по меньшей мере около 134, по меньшей мере около 135, по меньшей мере около 136, по меньшей мере около 137, по меньшей мере около 138, по меньшей мере около 139, по меньшей мере около 140, по меньшей мере около 141, по меньшей мере около 142, по меньшей мере около 143, по меньшей мере около 144, по меньшей мере около 145, по меньшей мере около 146, по меньшей мере около 147, по меньшей мере около 148, по меньшей мере около 149, по меньшей мере около 150, по меньшей мере около 151, по меньшей мере около 152, по меньшей мере около 153, по меньшей мере около 154, по меньшей мере около 155, по меньшей мере около 156, по меньшей мере около 157, по меньшей мере около 158, по меньшей мере около 159 или по меньшей мере около 160.

[0174] В некоторых аспектах n составляет от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150, от около 150 до около 160, от около 85 до около 95, от около 95 до около 105, от около 105 до около 115, от около 115 до около 125, от около 125 до около 135, от около 135 до около 145, от около 145 до около 155, от около 155 до около 165, от около 80 до около 100, от около 100 до около 120, от около 120 до около 140, от около 140 до около 160, от около 85 до около 105, от около 105 до около 125, от около 125 до около 145 или от около 145 до около 165.

[0175] В некоторых аспектах n составляет от около 100 до около 150. В некоторых аспектах n составляет от около 100 до около 140. В некоторых аспектах n составляет от около 100 до около 130. В некоторых аспектах n составляет от около 110 до около 150. В некоторых аспектах n составляет от около 110 до около 140. В некоторых аспектах n составляет от около 110 до около 130. В некоторых аспектах n составляет от около 110 до около 120. В некоторых аспектах n составляет от около 120 до около 150. В некоторых аспектах n составляет от около 120 до около 140. В некоторых аспектах n составляет от около 120 до около 130. В некоторых аспектах n составляет от около 130 до около 150. В некоторых аспектах n составляет от около 130 до около 140.

[0176] Таким образом, в некоторых аспектах ПЭГ представляет собой разветвленный ПЭГ. Разветвленные ПЭГ имеют от трех до десяти цепей ПЭГ, исходящих из группы в центрально расположенной сердцевине. В некоторых аспектах фрагмент ПЭГ представляет собой монодисперсный полиэтиленгликоль. В контексте настоящего изобретения

монодисперсный полиэтиленгликоль (mdPEG) представляет собой ПЭГ, обладающий одной, определенной длины цепью и молекулярной массой. mdPEG обычно получают путем отделения от полимеризационной смеси с помощью хроматографии. В некоторых формулах фрагмент монодисперсного ПЭГ обозначен аббревиатурой mdPEG.

[0177] В некоторых аспектах ПЭГ представляет собой звездчатый ПЭГ. Звездчатые ПЭГ имеют от 10 до 100 цепей ПЭГ, исходящих из группы в центрально расположенной сердцевине. В некоторых аспектах ПЭГ представляет собой гребенчатый ПЭГ. Гребенчатые ПЭГ имеют множество цепей ПЭГ, обычно прикрепленных к полимерному остову.

[0178] В некоторых аспектах ПЭГ имеет молярную массу от около 1000 г/моль до около 2000 г/моль, от около 2000 г/моль до около 3000 г/моль, от около 3000 г/моль до около 4000 г/моль, от около 4000 г/моль до около 5000 г/моль, от около 5000 г/моль до около 6000 г/моль, от около 6000 г/моль до около 7000 г/моль или от 7000 г/моль до около 8000 г/моль.

[0179] В некоторых аспектах ПЭГ представляет собой ПЭГ₁₀₀, ПЭГ₂₀₀, ПЭГ₃₀₀, ПЭГ₄₀₀, ПЭГ₅₀₀, ПЭГ₆₀₀, ПЭГ₇₀₀, ПЭГ₈₀₀, ПЭГ₉₀₀, ПЭГ₁₀₀₀, ПЭГ₁₁₀₀, ПЭГ₁₂₀₀, ПЭГ₁₃₀₀, ПЭГ₁₄₀₀, ПЭГ₁₅₀₀, ПЭГ₁₆₀₀, ПЭГ₁₇₀₀, ПЭГ₁₈₀₀, ПЭГ₁₉₀₀, ПЭГ₂₀₀₀, ПЭГ₂₁₀₀, ПЭГ₂₂₀₀, ПЭГ₂₃₀₀, ПЭГ₂₄₀₀, ПЭГ₂₅₀₀, ПЭГ₁₆₀₀, ПЭГ₁₇₀₀, ПЭГ₁₈₀₀, ПЭГ₁₉₀₀, ПЭГ₂₀₀₀, ПЭГ₂₁₀₀, ПЭГ₂₂₀₀, ПЭГ₂₃₀₀, ПЭГ₂₄₀₀, ПЭГ₂₅₀₀, ПЭГ₂₆₀₀, ПЭГ₂₇₀₀, ПЭГ₂₈₀₀, ПЭГ₂₉₀₀, ПЭГ₃₀₀₀, ПЭГ₃₁₀₀, ПЭГ₃₂₀₀, ПЭГ₃₃₀₀, ПЭГ₃₄₀₀, ПЭГ₃₅₀₀, ПЭГ₃₆₀₀, ПЭГ₃₇₀₀, ПЭГ₃₈₀₀, ПЭГ₃₉₀₀, ПЭГ₄₀₀₀, ПЭГ₄₁₀₀, ПЭГ₄₂₀₀, ПЭГ₄₃₀₀, ПЭГ₄₄₀₀, ПЭГ₄₅₀₀, ПЭГ₄₆₀₀, ПЭГ₄₇₀₀, ПЭГ₄₈₀₀, ПЭГ₄₉₀₀, ПЭГ₅₀₀₀, ПЭГ₅₁₀₀, ПЭГ₅₂₀₀, ПЭГ₅₃₀₀, ПЭГ₅₄₀₀, ПЭГ₅₅₀₀, ПЭГ₅₆₀₀, ПЭГ₅₇₀₀, ПЭГ₅₈₀₀, ПЭГ₅₉₀₀, ПЭГ₆₀₀₀, ПЭГ₆₁₀₀, ПЭГ₆₂₀₀, ПЭГ₆₃₀₀, ПЭГ₆₄₀₀, ПЭГ₆₅₀₀, ПЭГ₆₆₀₀, ПЭГ₆₇₀₀, ПЭГ₆₈₀₀, ПЭГ₆₉₀₀, ПЭГ₇₀₀₀, ПЭГ₇₁₀₀, ПЭГ₇₂₀₀, ПЭГ₇₃₀₀, ПЭГ₇₄₀₀, ПЭГ₇₅₀₀, ПЭГ₇₆₀₀, ПЭГ₇₇₀₀, ПЭГ₇₈₀₀, ПЭГ₇₉₀₀ или ПЭГ₈₀₀₀. В некоторых аспектах ПЭГ представляет собой ПЭГ₅₀₀₀. В некоторых аспектах ПЭГ представляет собой ПЭГ₆₀₀₀. В некоторых аспектах ПЭГ представляет собой ПЭГ₄₀₀₀.

[0180] В некоторых аспектах ПЭГ является монодисперсным, *например*, mPEG₁₀₀, mPEG₂₀₀, mPEG₃₀₀, mPEG₄₀₀, mPEG₅₀₀, mPEG₆₀₀, mPEG₇₀₀, mPEG₈₀₀, mPEG₉₀₀, mPEG₁₀₀₀, mPEG₁₁₀₀, mPEG₁₂₀₀, mPEG₁₃₀₀, mPEG₁₄₀₀, mPEG₁₅₀₀, mPEG₁₆₀₀, mPEG₁₇₀₀, mPEG₁₈₀₀, mPEG₁₉₀₀, mPEG₂₀₀₀, mPEG₂₁₀₀, mPEG₂₂₀₀, mPEG₂₃₀₀, mPEG₂₄₀₀, mPEG₂₅₀₀, mPEG₁₆₀₀, mPEG₁₇₀₀, mPEG₁₈₀₀, mPEG₁₉₀₀, mPEG₂₀₀₀, mPEG₂₁₀₀, mPEG₂₂₀₀, mPEG₂₃₀₀, mPEG₂₄₀₀, mPEG₂₅₀₀, mPEG₂₆₀₀, mPEG₂₇₀₀, mPEG₂₈₀₀, mPEG₂₉₀₀, mPEG₃₀₀₀, mPEG₃₁₀₀, mPEG₃₂₀₀, mPEG₃₃₀₀, mPEG₃₄₀₀, mPEG₃₅₀₀, mPEG₃₆₀₀, mPEG₃₇₀₀, mPEG₃₈₀₀, mPEG₃₉₀₀, mPEG₄₀₀₀, mPEG₄₁₀₀, mPEG₄₂₀₀, mPEG₄₃₀₀, mPEG₄₄₀₀, mPEG₄₅₀₀, mPEG₄₆₀₀, mPEG₄₇₀₀, mPEG₄₈₀₀, mPEG₄₉₀₀, mPEG₅₀₀₀, mPEG₅₁₀₀, mPEG₅₂₀₀, mPEG₅₃₀₀, mPEG₅₄₀₀, mPEG₅₅₀₀, mPEG₅₆₀₀, mPEG₅₇₀₀, mPEG₅₈₀₀, mPEG₅₉₀₀, mPEG₆₀₀₀,

mPEG₆₁₀₀, mPEG₆₂₀₀, mPEG₆₃₀₀, mPEG₆₄₀₀, mPEG₆₅₀₀, mPEG₆₆₀₀, mPEG₆₇₀₀, mPEG₆₈₀₀, mPEG₆₉₀₀, mPEG₇₀₀₀, mPEG₇₁₀₀, mPEG₇₂₀₀, mPEG₇₃₀₀, mPEG₇₄₀₀, mPEG₇₅₀₀, mPEG₇₆₀₀, mPEG₇₇₀₀, mPEG₇₈₀₀, mPEG₇₉₀₀ или mPEG₈₀₀₀. В некоторых аспектах mPEG представляет собой mPEG₅₀₀₀. В некоторых аспектах mPEG представляет собой mPEG₆₀₀₀. В некоторых аспектах mPEG представляет собой mPEG₄₀₀₀.

[0181] В некоторых аспектах фрагмент водорастворимого биополимера представляет собой полиглицерин (ПГ), описываемый формулой $((R^3-O-(CH_2-CHON-CH_2O)_n-)$, где R^3 — водород, метил или этил, а n имеет значение от 3 до 200. В некоторых аспектах фрагмент водорастворимого биополимера представляет собой разветвленный полиглицерин, описываемый формулой $(R^3-O-(CH_2-CHOR^5-CH_2-O)_n-)$, где R^5 — водород или линейная цепь глицерина, описываемая формулой $(R^3-O-(CH_2-CHON-CH_2-O)_n-)$, где R^3 — водород, метил или этил. В некоторых аспектах фрагмент водорастворимого биополимера представляет собой сверхразветвленный полиглицерин, описываемый формулой $(R^3-O-(CH_2-CHOR^5-CH_2-O)_n-)$, где R^5 — водород или цепь глицерина, описываемая формулой $(R^3-O-(CH_2-CHOR^6-CH_2-O)_n-)$, где R^6 — водород или цепь глицерина, описываемая формулой $(R^3-O-(CH_2-CHOR^7-CH_2-O)_n-)$, где R^7 — водород или линейная цепь глицерина, описываемая формулой $(R^3-O-(CH_2-CHON-CH_2-O)_n-)$, где R^3 — водород, метил или этил. Сверхразветвленный глицерин и способы его синтеза описаны в работе Oudshorn et al. (2006) *Biomaterials* 27:5471-5479; Wilms et al. (2010) *Acc. Chem. Res.* 43, 129-41 и литературных источниках, цитируемые в данном документе.

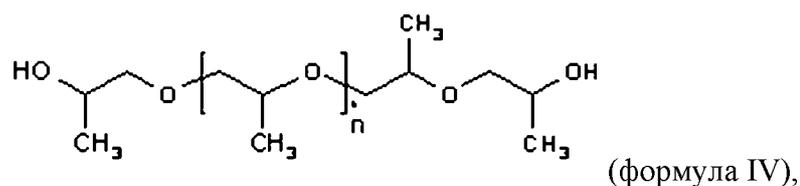
[0182] В некоторых аспектах ПЭГ имеет молярную массу от около 1000 г/моль до около 2000 г/моль, от около 2000 г/моль до около 3000 г/моль, от около 3000 г/моль до около 4000 г/моль, от около 4000 г/моль до около 5000 г/моль, от около 5000 г/моль до около 6000 г/моль, от около 6000 г/моль до около 7000 г/моль или от 7000 г/моль до около 8000 г/моль.

[0183] В некоторых аспектах ПГ представляет собой PG₁₀₀, PG₂₀₀, PG₃₀₀, PG₄₀₀, PG₅₀₀, PG₆₀₀, PG₇₀₀, PG₈₀₀, PG₉₀₀, PG₁₀₀₀, PG₁₁₀₀, PG₁₂₀₀, PG₁₃₀₀, PG₁₄₀₀, PG₁₅₀₀, PG₁₆₀₀, PG₁₇₀₀, PG₁₈₀₀, PG₁₉₀₀, PG₂₀₀₀, PG₂₁₀₀, PG₂₂₀₀, PG₂₃₀₀, PG₂₄₀₀, PG₂₅₀₀, PG₁₆₀₀, PG₁₇₀₀, PG₁₈₀₀, PG₁₉₀₀, PG₂₀₀₀, PG₂₁₀₀, PG₂₂₀₀, PG₂₃₀₀, PG₂₄₀₀, PG₂₅₀₀, PG₂₆₀₀, PG₂₇₀₀, PG₂₈₀₀, PG₂₉₀₀, PG₃₀₀₀, PG₃₁₀₀, PG₃₂₀₀, PG₃₃₀₀, PG₃₄₀₀, PG₃₅₀₀, PG₃₆₀₀, PG₃₇₀₀, PG₃₈₀₀, PG₃₉₀₀, PG₄₀₀₀, PG₄₁₀₀, PG₄₂₀₀, PG₄₃₀₀, PG₄₄₀₀, PG₄₅₀₀, PG₄₆₀₀, PG₄₇₀₀, PG₄₈₀₀, PG₄₉₀₀, PG₅₀₀₀, PG₅₁₀₀, PG₅₂₀₀, PG₅₃₀₀, PG₅₄₀₀, PG₅₅₀₀, PG₅₆₀₀, PG₅₇₀₀, PG₅₈₀₀, PG₅₉₀₀, PG₆₀₀₀, PG₆₁₀₀, PG₆₂₀₀, PG₆₃₀₀, PG₆₄₀₀, PG₆₅₀₀, PG₆₆₀₀, PG₆₇₀₀, PG₆₈₀₀, PG₆₉₀₀, PG₇₀₀₀, PG₇₁₀₀, PG₇₂₀₀, PG₇₃₀₀, PG₇₄₀₀, PG₇₅₀₀, PG₇₆₀₀, PG₇₇₀₀, PG₇₈₀₀, PG₇₉₀₀ или PG₈₀₀₀. В некоторых аспектах ПГ

представляет собой PG₅₀₀₀. В некоторых аспектах ПГ представляет собой PG₆₀₀₀. В некоторых аспектах ПГ представляет собой PG₄₀₀₀.

[0184] В некоторых аспектах ПГ является монодисперсным, *например*, mPG₁₀₀, mPG₂₀₀, mPG₃₀₀, mPG₄₀₀, mPG₅₀₀, mPG₆₀₀, mPG₇₀₀, mPG₈₀₀, mPG₉₀₀, mPG₁₀₀₀, mPG₁₁₀₀, mPG₁₂₀₀, mPG₁₃₀₀, mPG₁₄₀₀, mPG₁₅₀₀, mPG₁₆₀₀, mPG₁₇₀₀, mPG₁₈₀₀, mPG₁₉₀₀, mPG₂₀₀₀, mPG₂₁₀₀, mPG₂₂₀₀, mPG₂₃₀₀, mPG₂₄₀₀, mPG₂₅₀₀, mPG₁₆₀₀, mPG₁₇₀₀, mPG₁₈₀₀, mPG₁₉₀₀, mPG₂₀₀₀, mPG₂₁₀₀, mPG₂₂₀₀, mPG₂₃₀₀, mPG₂₄₀₀, mPG₂₅₀₀, mPG₂₆₀₀, mPG₂₇₀₀, mPG₂₈₀₀, mPG₂₉₀₀, mPG₃₀₀₀, mPG₃₁₀₀, mPG₃₂₀₀, mPG₃₃₀₀, mPG₃₄₀₀, mPG₃₅₀₀, mPG₃₆₀₀, mPG₃₇₀₀, mPG₃₈₀₀, mPG₃₉₀₀, mPG₄₀₀₀, mPG₄₁₀₀, mPG₄₂₀₀, mPG₄₃₀₀, mPG₄₄₀₀, mPG₄₅₀₀, mPG₄₆₀₀, mPG₄₇₀₀, mPG₄₈₀₀, mPG₄₉₀₀, mPG₅₀₀₀, mPG₅₁₀₀, mPG₅₂₀₀, mPG₅₃₀₀, mPG₅₄₀₀, mPG₅₅₀₀, mPG₅₆₀₀, mPG₅₇₀₀, mPG₅₈₀₀, mPG₅₉₀₀, mPG₆₀₀₀, mPG₆₁₀₀, mPG₆₂₀₀, mPG₆₃₀₀, mPG₆₄₀₀, mPG₆₅₀₀, mPG₆₆₀₀, mPG₆₇₀₀, mPG₆₈₀₀, mPG₆₉₀₀, mPG₇₀₀₀, mPG₇₁₀₀, mPG₇₂₀₀, mPG₇₃₀₀, mPG₇₄₀₀, mPG₇₅₀₀, mPG₇₆₀₀, mPG₇₇₀₀, mPG₇₈₀₀, mPG₇₉₀₀ или mPG₈₀₀₀.

[0185] В некоторых аспектах водорастворимый биополимер содержит поли(пропиленгликоль) (ППГ). В некоторых аспектах ППГ характеризуется следующей формулой, где n имеет значение от 1 до 1000.



[0186] В некоторых аспектах n ППГ имеет значение 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199 или 200.

[0187] В некоторых аспектах n ППГ составляет по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 90, по меньшей мере около 100, по меньшей мере около 110, по меньшей мере около 120, по меньшей мере около 130, по меньшей мере около 140, по меньшей мере около 150, по меньшей мере около 160, по меньшей мере около 170, по

[0191] Таким образом, в некоторых аспектах ППГ представляет собой разветвленный ППГ. Разветвленные ППГ имеют от трех до десяти цепей ППГ, исходящих из группы в центрально расположенной сердцевине. В некоторых аспектах фрагмент ППГ представляет собой монодисперсный полиэтиленгликоль. В контексте настоящего изобретения монодисперсный полиэтиленгликоль (mdPPG) представляет собой ППГ, обладающий одной, определенной длины цепью и молекулярной массой. mdPEG обычно получают путем отделения от полимеризационной смеси с помощью хроматографии. В некоторых формулах фрагмент монодисперсного ППГ обозначен аббревиатурой mdPPG.

[0192] В некоторых аспектах ППГ представляет собой звездчатый ПАГ. Звездчатые ППГ имеют от 10 до 100 цепей ППГ, исходящих из группы в центрально расположенной сердцевине. В некоторых аспектах ППГ представляет собой гребенчатые ППГ. Гребенчатые ПЭГ имеют множество цепей ППГ, обычно прикрепленных к полимерному остову.

[0193] В некоторых аспектах ППГ имеет молярную массу от около 1000 г/моль до около 2000 г/моль, от около 2000 г/моль до около 3000 г/моль, от около 3000 г/моль до около 4000 г/моль, от около 4000 г/моль до около 5000 г/моль, от около 5000 г/моль до около 6000 г/моль, от около 6000 г/моль до около 7000 г/моль или от 7000 г/моль до около 8000 г/моль.

[0194] В некоторых аспектах ППГ представляет собой PPG₁₀₀, PPG₂₀₀, PPG₃₀₀, PPG₄₀₀, PPG₅₀₀, PPG₆₀₀, PPG₇₀₀, PPG₈₀₀, PPG₉₀₀, PPG₁₀₀₀, PPG₁₁₀₀, PPG₁₂₀₀, PPG₁₃₀₀, PPG₁₄₀₀, PPG₁₅₀₀, PPG₁₆₀₀, PPG₁₇₀₀, PPG₁₈₀₀, PPG₁₉₀₀, PPG₂₀₀₀, PPG₂₁₀₀, PPG₂₂₀₀, PPG₂₃₀₀, PPG₂₄₀₀, PPG₂₅₀₀, PPG₁₆₀₀, PPG₁₇₀₀, PPG₁₈₀₀, PPG₁₉₀₀, PPG₂₀₀₀, PPG₂₁₀₀, PPG₂₂₀₀, PPG₂₃₀₀, PPG₂₄₀₀, PPG₂₅₀₀, PPG₂₆₀₀, PPG₂₇₀₀, PPG₂₈₀₀, PPG₂₉₀₀, PPG₃₀₀₀, PPG₃₁₀₀, PPG₃₂₀₀, PPG₃₃₀₀, PPG₃₄₀₀, PPG₃₅₀₀, PPG₃₆₀₀, PPG₃₇₀₀, PPG₃₈₀₀, PPG₃₉₀₀, PPG₄₀₀₀, PPG₄₁₀₀, PPG₄₂₀₀, PPG₄₃₀₀, PPG₄₄₀₀, PPG₄₅₀₀, PPG₄₆₀₀, PPG₄₇₀₀, PPG₄₈₀₀, PPG₄₉₀₀, PPG₅₀₀₀, PPG₅₁₀₀, PPG₅₂₀₀, PPG₅₃₀₀, PPG₅₄₀₀, PPG₅₅₀₀, PPG₅₆₀₀, PPG₅₇₀₀, PPG₅₈₀₀, PPG₅₉₀₀, PPG₆₀₀₀, PPG₆₁₀₀, PPG₆₂₀₀, PPG₆₃₀₀, PPG₆₄₀₀, PPG₆₅₀₀, PPG₆₆₀₀, PPG₆₇₀₀, PPG₆₈₀₀, PPG₆₉₀₀, PPG₇₀₀₀, PPG₇₁₀₀, PPG₇₂₀₀, PPG₇₃₀₀, PPG₇₄₀₀, PPG₇₅₀₀, PPG₇₆₀₀, PPG₇₇₀₀, PPG₇₈₀₀, PPG₇₉₀₀ или PPG₈₀₀₀. В некоторых аспектах ППГ представляет собой PPG₅₀₀₀. В некоторых аспектах ППГ представляет собой PPG₆₀₀₀. В некоторых аспектах ППГ представляет собой PPG₄₀₀₀.

[0195] В некоторых аспектах ППГ является монодисперсным, *например*, mPPG₁₀₀, mPPG₂₀₀, mPPG₃₀₀, mPPG₄₀₀, mPPG₅₀₀, mPPG₆₀₀, mPPG₇₀₀, mPPG₈₀₀, mPPG₉₀₀, mPPG₁₀₀₀, mPPG₁₁₀₀, mPPG₁₂₀₀, mPPG₁₃₀₀, mPPG₁₄₀₀, mPPG₁₅₀₀, mPPG₁₆₀₀, mPPG₁₇₀₀, mPPG₁₈₀₀, mPPG₁₉₀₀, mPPG₂₀₀₀, mPPG₂₁₀₀, mPPG₂₂₀₀, mPPG₂₃₀₀, mPPG₂₄₀₀, mPPG₂₅₀₀, mPPG₁₆₀₀, mPPG₁₇₀₀, mPPG₁₈₀₀, mPPG₁₉₀₀, mPPG₂₀₀₀, mPPG₂₁₀₀, mPPG₂₂₀₀, mPPG₂₃₀₀, mPPG₂₄₀₀, mPPG₂₅₀₀, mPPG₂₆₀₀, mPPG₂₇₀₀, mPPG₂₈₀₀, mPPG₂₉₀₀, mPPG₃₀₀₀, mPPG₃₁₀₀, mPPG₃₂₀₀, mPPG₃₃₀₀, mPPG₃₄₀₀, mPPG₃₅₀₀, mPPG₃₆₀₀, mPPG₃₇₀₀,

mPPG₃₈₀₀, mPPG₃₉₀₀, mPPG₄₀₀₀, mPPG₄₁₀₀, mPPG₄₂₀₀, mPPG₄₃₀₀, mPPG₄₄₀₀, mPPG₄₅₀₀, mPPG₄₆₀₀, mPPG₄₇₀₀, mPPG₄₈₀₀, mPPG₄₉₀₀, mPPG₅₀₀₀, mPPG₅₁₀₀, mPPG₅₂₀₀, mPPG₅₃₀₀, mPPG₅₄₀₀, mPPG₅₅₀₀, mPPG₅₆₀₀, mPPG₅₇₀₀, mPPG₅₈₀₀, mPPG₅₉₀₀, mPPG₆₀₀₀, mPPG₆₁₀₀, mPPG₆₂₀₀, mPPG₆₃₀₀, mPPG₆₄₀₀, mPPG₆₅₀₀, mPPG₆₆₀₀, mPPG₆₇₀₀, mPPG₆₈₀₀, mPPG₆₉₀₀, mPPG₇₀₀₀, mPPG₇₁₀₀, mPPG₇₂₀₀, mPPG₇₃₀₀, mPPG₇₄₀₀, mPPG₇₅₀₀, mPPG₇₆₀₀, mPPG₇₇₀₀, mPPG₇₈₀₀, mPPG₇₉₀₀ или mPPG₈₀₀₀. В некоторых аспектах mPPG представляет собой mPPG₅₀₀₀. В некоторых аспектах mPPG представляет собой mPPG₆₀₀₀. В некоторых аспектах mPPG представляет собой mPPG₄₀₀₀.

b. Катионный носитель

[0196] В некоторых аспектах молекулы катионных носителей настоящего изобретения содержат по меньшей мере один фрагмент катионного носителя. Термин «катионный носитель» относится к фрагменту или части молекулы катионного носителя настоящего изобретения, содержащему множество положительных зарядов, которые могут взаимодействовать и электростатически связывать анионную полезную нагрузку (или анионный носитель, присоединенный к полезной нагрузке). В некоторых аспектах количество положительных зарядов или положительно заряженных групп на катионном носителе аналогично количеству отрицательных зарядов или отрицательно заряженных групп на анионной полезной нагрузке (или анионном носителе, присоединенном к полезной нагрузке). В некоторых аспектах катионный носитель содержит биополимер, *например*, пептид (*например*, полилизин).

[0197] В некоторых аспектах катионный носитель содержит одну или более основных аминокислот (*например*, лизин, аргинин, гистидин или их комбинацию). В некоторых аспектах катионный носитель содержит по меньшей мере около трех, по меньшей мере около четырех, по меньшей мере около пяти, по меньшей мере около шести, по меньшей мере около семи, по меньшей мере около восьми, по меньшей мере около девяти, по меньшей мере около десяти, по меньшей мере около 11, по меньшей мере около 12, по меньшей мере около 13, по меньшей мере около 14, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 16, по меньшей мере около 17, по меньшей мере около 18, по меньшей мере около 19, по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 21, по меньшей мере около 22, по меньшей мере около 23, по меньшей мере около 24, по меньшей мере около 25, по меньшей мере около 26, по меньшей мере около 27, по меньшей мере около 28, по меньшей мере около 29, по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 31, по меньшей мере около 32, по меньшей мере около 33, по меньшей мере около 34, по меньшей мере около 35, по меньшей мере около 36, по меньшей мере около 37, по меньшей мере около 38, по меньшей мере около 39, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 41, по меньшей мере

[0200] В некоторых аспектах молекула катионного носителя содержит от около 30 до около 100, от около 30 до около 90, от около 30 до около 80, от около 30 до около 70, от около 30 до около 60, от около 30 до около 50, от около 30 до около 40, от около 40 до около 100, от около 40 до около 90, от около 40 до около 80, от около 40 до около 70, от около 40 до около 60, от около 70 до около 80, от около 75 до около 85, от около 65 до около 75, от около 65 до около 80, от около 60 до около 85 или от около 40 до около 500 основных аминокислот, *например*, лизины.

[0201] В некоторых аспектах молекула катионного носителя содержит от около 100 до около 1000, от около 100 до около 900, от около 100 до около 800, от около 100 до около 700, от около 100 до около 600, от около 100 до около 500, от около 100 до около 400, от около 100 до около 300, от около 100 до около 200, от около 200 до около 1000, от около 200 до около 900, от около 200 до около 800, от около 200 до около 700, от около 200 до около 600, от около 200 до около 500, от около 200 до около 400, от около 200 до около 300, от около 300 до около 1000, от около 300 до около 900, от около 300 до около 800, от около 300 до около 700, от около 300 до около 600, от около 300 до около 500, от около 300 до около 400, от около 400 до около 1000, от около 400 до около 900, от около 400 до около 800, от около 400 до около 700, от около 400 до около 600, от около 400 до около 500, от около 500 до около 1000, от около 500 до около 900, от около 500 до около 800, от около 500 до около 700, от около 500 до около 600, от около 600 до около 1000, от около 600 до около 900, от около 600 до около 800, от около 600 до около 700, от около 700 до около 1000, от около 700 до около 900, от около 700 до около 800, от около 800 до около 1000, от около 800 до около 900 или от около 900 до около 1000 основных аминокислот, *например*, лизины.

[0202] В некоторых аспектах количество основных аминокислот, *например*, лизинов, аргининов, гистидинов или их комбинаций, можно регулировать в зависимости от длины анионной полезной нагрузки. Например, анионная полезная нагрузка с более длинной последовательностью может быть спарен с большим количеством основных аминокислот, *например*, лизинов. В некоторых аспектах количество основных аминокислот, *например*, лизинов в молекуле катионного носителя можно рассчитать таким образом, чтобы молярное соотношение протонированного амина в полимере к фосфату в анионной полезной нагрузке, например, олигонуклеотиде, например, антимири (N/P) составляло около 1,0, около 1,1, около 1,2, около 1,3, около 1,4, около 1,5, около 1,6, около 1,7, около 1,8, около 1,9, около 2,0, около 2,1, около 2,2, около 2,3, около 2,4, около 2,5, около 2,6, около 2,7, около 2,8, около 2,9 или около 3. В некоторых аспектах количество основных аминокислот, *например*, лизинов в молекуле катионного носителя рассчитывают таким

образом, чтобы молярное соотношение протонированного амина в полимере к фосфату в анионной полезной нагрузке, например, олигонуклеотиде, например, антими́р (N/P) составляло от около 1,3 до около 1,7, *например*, около 1,5. В некоторых аспектах количество основных аминокислот, *например*, лизинов в молекуле катионного носителя рассчитано таким образом, чтобы молярное соотношение протонированного амина в полимере к фосфату в анионной полезной нагрузке, например, олигонуклеотиде, например, антими́р (N/P) составляло около 1,4. В некоторых аспектах количество основных аминокислот, *например*, лизинов в молекуле катионного носителя рассчитано таким образом, чтобы молярное соотношение протонированного амина в полимере к фосфату в анионной полезной нагрузке, например, олигонуклеотиде, например, антими́р (N/P) составляло около 1,6. В некоторых аспектах количество основных аминокислот, *например*, лизинов в молекуле катионного носителя рассчитано таким образом, чтобы молярное соотношение протонированного амина в полимере к фосфату в анионной полезной нагрузке, например, олигонуклеотиде, например, антими́р (N/P) составляло около 1,3. В некоторых аспектах количество основных аминокислот, *например*, лизинов в молекуле катионного носителя рассчитано таким образом, чтобы молярное соотношение протонированного амина в полимере к фосфату в анионной полезной нагрузке, например, олигонуклеотиде, например, антими́р (N/P) составляло около 1,7.

[0203] Специалисту в данной области понятно, что поскольку роль катионного носителя заключается в нейтрализации отрицательных зарядов на полезной нагрузке (*например*, отрицательных изменений в фосфатном остове антисмыслового олигонуклеотида) посредством электростатического взаимодействия, то в некоторых аспектах (*например*, когда полезная нагрузка представляет собой нуклеиновую кислоту, такую как антими́р) длина катионного носителя, количество положительно заряженных групп на катионном носителе, а также распределение и ориентация зарядов, присутствующих на катионном носителе, будут зависеть от длины и распределения зарядов на молекуле полезной нагрузки.

[0204] В других аспектах, *например*, когда полезная нагрузка представляет собой множество малых молекул (*например*, анионные низкомолекулярные лекарственные средства), длина катионного носителя и количество положительно заряженных групп на катионном носителе коррелируют с желаемой полезной нагрузкой. Например, количество низкомолекулярных лекарственных средств, переносимых катионным носителем настоящего изобретения, будет зависеть от количества зарядов в фрагменте катионного носителя.

[0205] В некоторых аспектах катионный носитель содержит от около 5 до около 10, от около 10 до около 15, от около 15 до около 20, от около 20 до около 25, от около 25 до около 30, от около 30 до около 35, от около 35 до около 40, от около 40 до около 45, от около 45 до около 50, от около 50 до около 55, от около 55 до около 60, от около 60 до около 65, от около 65 до около 70, от около 70 до около 75 или от около 75 до около 80 основных аминокислот. В некоторых конкретных аспектах положительно заряженный носитель содержит от около 30 до около 50 основных аминокислот. В некоторых конкретных аспектах положительно заряженный носитель содержит от около 70 до около 80 основных аминокислот.

[0206] В некоторых аспектах основная аминокислота содержит аргинин, лизин, гистидин или любую их комбинацию. В некоторых аспектах основная аминокислота представляет собой D-аминокислоту. В некоторых аспектах основная аминокислота представляет собой L-аминокислоту. В некоторых аспектах положительно заряженный носитель содержит D-аминокислоты и L-аминокислоты. В некоторых аспектах основная аминокислота содержит по меньшей мере одну аминокислоту не природного происхождения или ее производное. В некоторых аспектах основная аминокислота представляет собой аргинин, лизин, гистидин, L-4-аминометилфенилаланин, L-4-гуаниди-фенилаланин, L-4-аминометил-N-изопропилфенилаланин, L-3-пиридилаланин, L-транс-4-аминометилциклогексилаланин, L-4-пиперидинилаланин, L-4-аминоциклогексилаланин, 4-гуанидиномасляную кислоту, L-2-амино-3-гуанидинопропионовую кислоту, DL-5-гидроксилизин, пирролизин, 5-гидрокси-L-лизин, метиллизин, гипузин или любую их комбинацию. В конкретном аспекте положительно заряженный носитель содержит около 40 молекул лизина. В конкретном аспекте положительно заряженный носитель содержит около 50 молекул лизина. В конкретном аспекте положительно заряженный носитель содержит около 60 молекул лизина. В конкретном аспекте положительно заряженный носитель содержит около 70 молекул лизина. В конкретном аспекте положительно заряженный носитель содержит около 80 молекул лизина.

[0207] В других аспектах катионный носитель содержит алкильную цепь, *например, от* C₃ до C₅₀, содержащую по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять, по меньшей мере десять, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29, по

меньшей мере 30, по меньшей мере 31, по меньшей мере 32, по меньшей мере 33, по меньшей мере 34, по меньшей мере 35, по меньшей мере 36, по меньшей мере 37, по меньшей мере 38, по меньшей мере 39, по меньшей мере 40, по меньшей мере 41, по меньшей мере 42, по меньшей мере 43, по меньшей мере 44, по меньшей мере 45, по меньшей мере 46, по меньшей мере 47, по меньшей мере 48, по меньшей мере 49, по меньшей мере 50, по меньшей мере 51, по меньшей мере 52, по меньшей мере 53, по меньшей мере 54, по меньшей мере 55, по меньшей мере 56, по меньшей мере 67, по меньшей мере 58, по меньшей мере 59, по меньшей мере 60, по меньшей мере 61, по меньшей мере 62, по меньшей мере 63, по меньшей мере 64, по меньшей мере 65, по меньшей мере 66, по меньшей мере 67, по меньшей мере 68, по меньшей мере 69, по меньшей мере 70, по меньшей мере 71, по меньшей мере 72, по меньшей мере 73, по меньшей мере 74, по меньшей мере 75, по меньшей мере 76, по меньшей мере 77, по меньшей мере 78, по меньшей мере 79 или по меньшей мере 80 катионных групп (*например*, аминогруппы). В некоторых аспектах катионный носитель содержит алкильную цепь, *например*, от C₃ до C₅₀, содержащую от около 5 до около 10, от около 10 до около 15, от около 15 до около 20, от около 20 до около 25, от около 25 до около 30, от около 30 до около 35, от около 35 до около 40, от около 40 до около 45, от около 45 до около 50, от около 50 до около 55, от около 55 до около 60, от около 60 до около 65, от около 65 до около 70, от около 70 до около 75 или от около 75 до около 80 катионных групп (*например*, аминогруппы). В некоторых конкретных аспектах катионный носитель содержит алкильную цепь, *например*, от C₃ до C₅₀, содержащую от около 30 до около 50 катионных групп (*например*, аминогруппы). В некоторых конкретных аспектах катионный носитель содержит алкильную цепь, *например*, от C₃ до C₅₀, содержащую от около 70 до около 80 катионных групп (*например*, аминогруппы).

[0208] В других аспектах катионный носитель содержит полимер или сополимер, содержащий по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять, по меньшей мере десять, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29, по меньшей мере 30, по меньшей мере 31, по меньшей мере 32, по меньшей мере 33, по меньшей мере 34, по меньшей мере 35, по меньшей мере 36, по меньшей мере 37, по меньшей мере 38, по меньшей мере 39, по меньшей мере 40, по меньшей мере 41, по

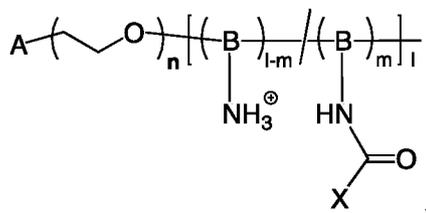
меньшей мере 42, по меньшей мере 43, по меньшей мере 44, по меньшей мере 45, по меньшей мере 46, по меньшей мере 47, по меньшей мере 48, по меньшей мере 49, по меньшей мере 50, по меньшей мере 51, по меньшей мере 52, по меньшей мере 53, по меньшей мере 54, по меньшей мере 55, по меньшей мере 56, по меньшей мере 57, по меньшей мере 58, по меньшей мере 59, по меньшей мере 60, по меньшей мере 61, по меньшей мере 62, по меньшей мере 63, по меньшей мере 64, по меньшей мере 65, по меньшей мере 66, по меньшей мере 67, по меньшей мере 68, по меньшей мере 69, по меньшей мере 70, по меньшей мере 71, по меньшей мере 72, по меньшей мере 73, по меньшей мере 74, по меньшей мере 75, по меньшей мере 76, по меньшей мере 77, по меньшей мере 78, по меньшей мере 79 или по меньшей мере 80 катионных групп (*например*, аминокруппы). В некоторых аспектах катионный носитель содержит полимер или сополимер, содержащий от около 5 до около 10, от около 10 до около 15, от около 15 до около 20, от около 20 до около 25, от около 25 до около 30, от около 30 до около 35, от около 35 до около 40, от около 40 до около 45, от около 45 до около 50, от около 50 до около 55, от около 55 до около 60, от около 60 до около 65, от около 65 до около 70, от около 70 до около 75 или от около 45 до около 50 катионных групп (*например*, аминокруппы). В некоторых конкретных аспектах катионный носитель содержит полимер или сополимер, содержащий от 30 до около 50 катионных групп (*например*, аминокруппы). В некоторых конкретных аспектах катионный носитель содержит полимер или сополимер, содержащий от 70 до около 80 катионных групп (*например*, аминокруппы). В некоторых аспектах полимер или сополимер представляет собой акрилат, полиспирт или полисахарид.

[0209] В некоторых аспектах фрагмент катионного носителя связывается с одной молекулой полезной нагрузки. В других аспектах фрагмент катионного носителя может связываться с несколькими молекулами полезной нагрузки, которые могут быть одинаковыми или разными.

[0210] В некоторых аспектах положительные заряды фрагмента катионного носителя и отрицательные заряды полезной нагрузки, представленного нуклеиновой кислотой, находятся в соотношении ионов около 3:1, около 2,9:1, около 2,8:1, около 2,7:1, около 2,6:1, около 2,5:1, около 2,4:1, около 2,3:1, около 2,2:1, около 2,1:1, около 2:1, около 1,9:1, около 1,8:1, около 1,7:1, около 1,6:1, около 1,5:1, около 1,4:1, около 1,3:1, около 1,2:1, около 1,1:1, около 1:1, около 1:1,1, около 1:1,2, около 1:1,3, около 1:1,4, около 1:1,5, около 1:1,6, около 1:1,7, около 1:1,8, около 1:1,9, около 1:2, около 1:2,1, около 1:2,2, около 1:2,3, около 1:2,4, около 1:2,5, около 1:2,6, около 1:2,7, около 1:2,8, около 1:2,9 или около 1:3. В некоторых аспектах положительные заряды фрагмента катионного носителя и отрицательные заряды полезной нагрузки, представленной нуклеиновой кислотой, находятся в соотношении

зарядов 1:1. В некоторых аспектах положительные заряды фрагмента катионного носителя и отрицательные заряды полезной нагрузки, представленной нуклеиновой кислотой, находятся в соотношении зарядов 3:2. В некоторых аспектах положительные заряды фрагмента катионного носителя и отрицательные заряды полезной нагрузки, представленной нуклеиновой кислотой, находятся в соотношении зарядов 2:3.

[0211] В некоторых аспектах молекулы носителя настоящего изобретения содержат:



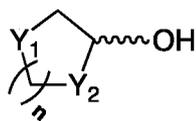
где А — триптофан или фенилаланин, а В — фрагмент катионного носителя, *например*, лизин,

причем

(i) l — целое число от около 1 до около 200; *например*, от около 2 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50 до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150, от около 150 до около 160, от около 160 до около 170, от около 170 до около 180, от около 180 до около 190 или от около 190 до около 200;

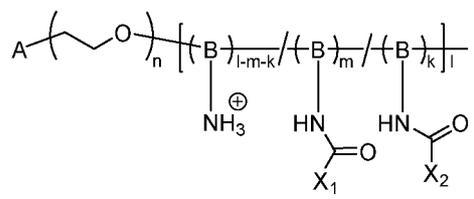
(ii) m — целое число от 1 до 150, *например*, от около 2 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50 до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150; и

(iii) n — целое число от около 1 до около 200; *например*, от около 2 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50 до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150, от около 150 до около 160, от около 160 до около 170, от около 170 до около 180, от около 180 до около 190 или от около 190 до около 200;



и при этом X представляет собой Y_1 , где Y_1 — C, N, O или S, Y_2 — C, N, O или S, а n — 1 или 2. В некоторых аспектах X может представлять собой —SH (например, сульфонильную группу, алканетиолы или алкилтиолы). В некоторых аспектах мицелла настоящего изобретения содержит один тип молекул катионных носителей, конъюгированных с витамином, например, витамином В3, и другой тип молекул катионных носителей, конъюгированных с сульфонильной группой (например, алканетиолами или алкилтиолами). В некоторых аспектах мицелла настоящего изобретения содержит первый тип молекул катионных носителей, конъюгированных с витамином, например, витамином В3, второй тип молекул катионных носителей, конъюгированных с сульфонильной группой (например, алканетиолами или алкилтиолами), а также третий тип молекул катионных носителей, представляющие собой свободные основания.

[0212] В некоторых аспектах молекулы носителя настоящего изобретения содержат:



где A — триптофан или фенилаланин, а B — фрагмент катионного носителя, *например*, лизин,

причем

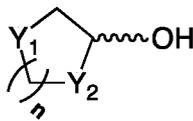
(i) l — целое число от около 1 до около 200; *например*, от около 2 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50 до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150, от около 150 до около 160, от около 160 до около 170, от около 170 до около 180, от около 180 до около 190 или от около 190 до около 200;

(ii) m — целое число от 1 до 150, *например*, от около 2 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50 до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150;

(iii) k — целое число от 1 до 150, *например*, от около 2 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50

до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150; и

(iii) n — целое число от около 1 до около 200; например, от около 2 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50 до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150, от около 150 до около 160, от около 160 до около 170, от около 170 до около 180, от около 180 до около 190 или от около 190 до около 200;



при этом X_1 представляет собой _____, где Y_1 — C, N, O или S, Y_2 — C, N, O или

S, а n — 1 или 2; и при этом X_2 представляет собой $X_2 = \left[\text{---} \underset{\text{---}}{\text{---}} \right]_p \text{SH}$, где $p =$ от 0 до 5. В некоторых аспектах p составляет 0. В некоторых аспектах X_2 представляет собой SH.

[0213] В некоторых аспектах фрагмент катионного носителя имеет свободный конец, в котором концевая группа представляет собой реакционно-способную группу. В некоторых аспектах фрагмент катионного носителя имеет свободный конец (например, C-конец в фрагменте катионного носителя в виде полилизина), в котором концевая группа представляет собой аминогруппу ($-\text{NH}_2$). В некоторых аспектах фрагмент катионного носителя имеет свободный конец, в котором концевая группа представляет собой сульфгидрильную группу. В некоторых аспектах реакционно-способная группа фрагмента катионного носителя присоединена к фрагменту адьюванта, например фрагменту адьюванта в виде витамина В3.

с. Фрагмент адьюванта

[0214] В некоторых аспектах молекулы катионных носителей настоящего изобретения содержат по меньшей мере один фрагмент адьюванта. Термин «фрагмент адьюванта» в контексте настоящего документа относится к химическому соединению, которое может, *например*, (i) дополнять терапевтическую или профилактическую активность полезной нагрузки, (ii) модулировать терапевтическую или профилактическую активность полезной нагрузки, (iii) действовать как терапевтическое и/или профилактическое средство в ткани-мишени или клетках-мишенях, (iv) способствовать переносу молекулы катионного носителя через физиологический барьер, *например*, ГЭБ и/или плазматическую мембрану, (v) улучшать гомеостаз ткани-мишени или клетки-мишени, (vi) добавлять положительно

заряженные группы в фрагмент катионного носителя или (vii) осуществлять любую их комбинацию.

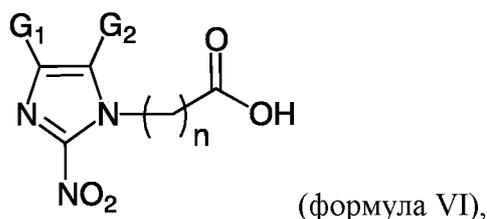
[0215] В некоторых аспектах фрагмент адьюванта способен модулировать, *например*, иммунный ответ, воспалительный ответ или микроокружение ткани.

[0216] В некоторых аспектах фрагмент адьюванта, способный модулировать иммунный ответ, может содержать, *например*, тирозин или дофамин. Тирозин может быть преобразован в L-DOPA, а затем превращен в дофамин посредством двухступенчатой ферментативной реакции. У пациентов с болезнью Паркинсона уровень дофамина обычно низкий. Поэтому в некоторых аспектах тирозин является фрагментом адьюванта в молекулах катионных носителей, применяемых для лечения болезни Паркинсона. Триптофан может быть преобразован в серотонин, нейромедиатор, который, как считается, влияет на аппетит, эмоции, двигательные, когнитивные и вегетативные функции. Соответственно, в некоторых аспектах молекулы катионных носителей настоящего изобретения, применяемые для лечения заболеваний или патологических состояний, связанных с низким уровнем серотонина, содержат триптофан в качестве фрагмента адьюванта.

[0217] В некоторых аспектах фрагмент адьюванта может модулировать микроокружение опухоли у субъекта с опухолью, например, путем ингибирования или снижения гипоксии в микроокружении опухоли.

[0218] В некоторых аспектах фрагмент адьюванта содержит, *например*, производное имидазола, аминокислоту, витамин или любую их комбинацию.

[0219] В некоторых аспектах фрагмент адьюванта представляет собой производное имидазола, содержащее:

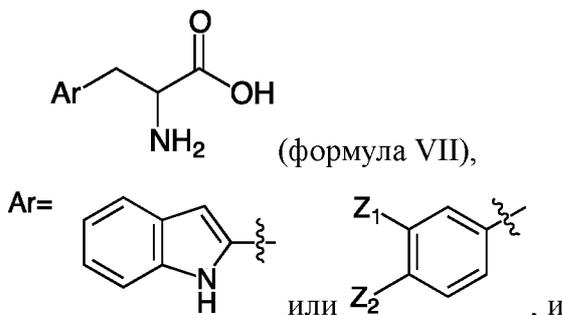


где каждый из G_1 и G_2 независимо является H, ароматическим кольцом или 1–10 алкилом, либо G_1 и G_2 вместе образуют ароматическое кольцо, и где n составляет 1–10.

[0220] В некоторых аспектах фрагмент адьюванта содержит нитроимидазол. Нитроимидазолы действуют как антибиотики. Нитрогетероциклы в нитроимидазолах могут активироваться путем восстановления в клетках, находящихся в состоянии гипоксии, после чего они могут подвергаться повторным циклам окислительно-восстановительных реакций или разлагаться до цитотоксических продуктов. Восстановление обычно происходит только в анаэробных бактериях или в тканях в состоянии аноксии, поэтому они

оказывают относительно небольшое влияние на клетки человека или аэробные бактерии. В некоторых аспектах фрагмент адьюванта содержит метронидазол, тинидазол, ниморазол, диметридазол, претоманид, орнидазол, мегазол, азанидазол, бензнидазол, нитроимидазол или любую их комбинацию.

[0221] В некоторых аспектах фрагмент адьюванта содержит аминокислоту. В некоторых аспектах фрагмент адьюванта содержит

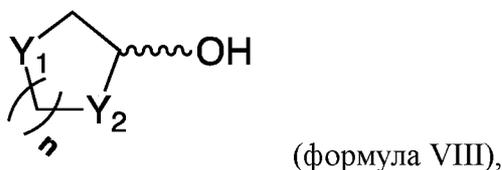


где Ar представляет собой

где каждый из Z1 и Z2 является H или OH.

[0222] В некоторых аспектах фрагмент адьюванта способен ингибировать или уменьшать воспалительный ответ.

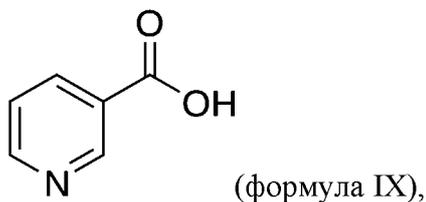
[0223] В некоторых аспектах фрагмент адьюванта представляет собой витамин. В некоторых аспектах витамин содержит циклическое кольцо или циклическое кольцо с гетероатомом, и карбоксильную группу или гидроксильную группу. В некоторых аспектах витамин содержит:



где каждый из Y1 и Y2 является C, N, O или S, и где p — 1 или 2.

[0224] В некоторых аспектах витамин выбран из группы, состоящей из витамина А (ретинол), витамина В1 (тиамина хлорид), витамина В2 (рибофлавин), витамина В3 (никотинамид), витамина В6 (пиридоксаль), витамина В7 (биотин), витамина В9 (фолиевая кислота), витамина В12 (кобаламин), витамина С (аскорбиновая кислота), витамина D2, витамина D3, витамина Е (токоферол), витамина М, витамина Н, их производных и любой их комбинации.

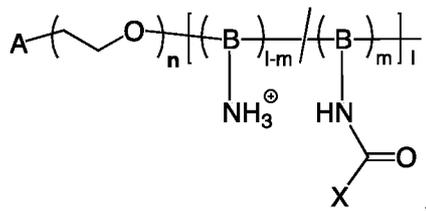
[0225] В некоторых аспектах витамин представляет собой витамин В3 (также известный как ниацин или никотиновая кислота).



[0228] Ниацин является предшественником коферментов никотинамидадениндинуклеотида (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ) *in vivo*. Путем фосфорилирования в присутствии фермента НАД⁺ киназы НАД превращается в НАДФ. НАДФ и НАД являются коферментами многих дегидрогеназ, принимая участие в различных процессах переноса водорода. НАД участвует в процессах катаболизма жиров, углеводов, белков и спиртов, а также в процессах клеточной сигнализации и восстановлении ДНК, а НАДФ участвует в основном в анаболических реакциях, таких как синтез жирных кислот и холестерина. Органы с высокими энергетическими потребностями (головной мозг) или высокой скоростью перфузии (кишечник, кожа) обычно наиболее восприимчивы к их дефициту.

[0229] В результате активации NIACR1 ниацин оказывает выраженное противовоспалительное действие в различных тканях, в том числе в головном мозге, желудочно-кишечном тракте, коже и сосудистой ткани. Было показано, что ниацин уменьшает нейровоспаление и может быть эффективен при лечении нейроиммунных заболеваний, таких как рассеянный склероз и болезнь Паркинсона. См. Offermanns & Schwaninger (2015) *Trends in Molecular Medicine* 21:245-266; Chai et al (2013) *Current Atherosclerosis Reports* 15:325; Graff et al. (2016) *Metabolism* 65:102-13; и Wakade & Chong (2014) *Journal of the Neurological Sciences* 347:34-8, которые включены в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[0230] В некоторых аспектах молекулы носителя настоящего изобретения содержат:



где X представляет собой витамин B3;

A — нацеливающий фрагмент, а

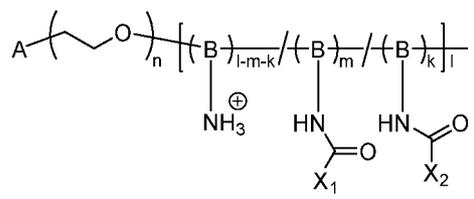
B — фрагмент катионного носителя, *например*, лизин, и при этом

(i) *l* — целое число от около 1 до около 200; например, от около 2 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50 до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150, от около 150 до около 160, от около 160 до около 170, от около 170 до около 180, от около 180 до около 190 или от около 190 до около 200;

(ii) m — целое число от 1 до 150, например, от около 2 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50 до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150; и

(iii) n — целое число от около 1 до около 200; например, от около 2 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50 до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150, от около 150 до около 160, от около 160 до около 170, от около 170 до около 180, от около 180 до около 190 или от около 190 до около 200.

[0231] В некоторых аспектах молекулы носителя настоящего изобретения содержат:



где X представляет собой витамин B3;

A — нацеливающий фрагмент, а

B — фрагмент катионного носителя, *например*, лизин, и при этом

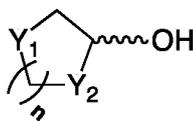
(i) l — целое число от около 1 до около 200; например, от около 2 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50 до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150, от около 150 до около 160, от около 160 до около 170, от около 170 до около 180, от около 180 до около 190 или от около 190 до около 200;

(ii) m — целое число от 1 до 150, например, от около 2 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50 до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150;

(iii) k — целое число от 1 до 150, например, от около 2 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50

до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150; и

(iii) n — целое число от около 1 до около 200; например, от около 2 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50 до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150, от около 150 до около 160, от около 160 до около 170, от около 170 до около 180, от около 180 до около 190 или от около 190 до около 200;



при этом X_1 представляет собой $\text{---}X_1\text{---}$, где Y_1 — C, N, O или S, Y_2 — C, N, O или

S, а n — 1 или 2; и при этом X_2 представляет собой $X_2 = \text{---}X_2\text{---}$, где $p =$ от 0 до 5. В некоторых аспектах p составляет 0. В некоторых аспектах X_2 представляет собой SH.

d. Нацеливающий фрагмент

[0232] В некоторых аспектах молекула катионного носителя содержит нацеливающий фрагмент, который связан с водорастворимым полимером необязательно посредством линкера. В контексте настоящего документа термин «нацеливающий фрагмент» относится к молекуле биораспознавания, которая связывается с конкретным биологическим веществом или участком. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент специфичен для определенной целевой молекулы (*например*, лиганд, нацеленный на рецептор, или антитело, нацеленное на поверхностный белок), ткани (*например*, молекула, которая преимущественно доставляет мицеллу в конкретный орган или ткань, *например*, печень, головной мозг или эндотелий), или способствует переносу через физиологический барьер (*например*, пептид или другая молекула, которая способствует переносу через гематоэнцефалический барьер или плазматическую мембрану).

[0233] Для нацеливания полезной нагрузки (*например*, молекулы нуклеотида, *например*, антисмыслового олигонуклеотида, который связывается с микроРНК) в соответствии с настоящим изобретением нацеливающий фрагмент можно сочетать с молекулой катионного носителя и, следовательно, с внешней поверхностью мицеллы, в то время как полезная нагрузка находится в сердцевине мицеллы.

[0234] В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент представляет собой нацеливающий фрагмент, способный нацеливать мицеллу настоящего изобретения на ткань. В некоторых аспектах ткань представляет собой печень, головной мозг, почку, легкое, яичник,

поджелудочную железу, щитовидную железу, молочную железу, желудок или любую их комбинацию. В некоторых аспектах ткань представляет собой ткань злокачественной опухоли, *например*, злокачественной опухоли печени, злокачественной опухоли головного мозга, злокачественной опухоли почки, злокачественной опухоли легкого, злокачественной опухоли яичника, злокачественной опухоли поджелудочной железы, злокачественной опухоли щитовидной железы, злокачественной опухоли молочной железы, злокачественной опухоли желудка или любой их комбинации.

[0235] В конкретном аспекте ткань представляет собой печень. В конкретном аспекте нацеливающим фрагментом, нацеленным на печень, является холестерин. В других аспектах нацеливающим фрагментом, нацеленным на печень, является лиганд, связывающий нацеливающий фрагмент асиалогликопротеинового рецептора. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент асиалогликопротеинового рецептора содержит кластер GalNAc. В некоторых аспектах кластер GalNAc представляет собой моновалентный, двухвалентный, трехвалентный или четырехвалентный кластер GalNAc.

[0236] В другом аспекте ткань представляет собой поджелудочную железу. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент, нацеленный на поджелудочную железу, содержит лиганд, нацеленный на рецепторы интегринов $\alpha\beta3$ на клетках поджелудочной железы. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент содержит пептидную последовательность аргинилглициласпартовой кислоты (RGD) (L-аргинил-глицил-L-аспартовая кислота; Arg-Gly-Asp).

[0237] В некоторых аспектах ткань представляет собой ткань центральной нервной системы, *например*, нервную ткань. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент, нацеленный на центральную нервную систему, может переноситься переносчиком крупных нейтральных аминокислот типа 1 (LAT1). LAT1 (SLC7A5) является переносчиком для поглощения как крупных нейтральных аминокислот, так и ряда фармацевтических лекарственных средств. LAT1 может переносить такие лекарственные средства, как L-дофа или габапентин.

[0238] В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент содержит глюкозу, например, D-глюкозу, которая может связываться с переносчиком глюкозы 1 (или GLUT1) и проникать через ГЭБ. GLUT1, также известный как семейство 2 переносчиков растворенных веществ, член 1 облегченного переносчика глюкозы (SLC2A1), представляет собой белок-унипортер, который у человека кодируется геном SLC2A1. GLUT1 облегчает перенос глюкозы через плазматические мембраны клеток млекопитающих. Этот ген кодирует основной переносчик глюкозы в гематоэнцефалическом барьере млекопитающих.

[0239] В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент содержит галактозу, например, D-галактозу, которая может связываться с переносчиком GLUT1 для прохождения через ГЭБ. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент содержит глутаминовую кислоту, которая может связываться с ингибитором ацетилхолинэстеразы (AChEI) и/или ингибиторами EAAT и проникать через ГЭБ. Ацетилхолинэстераза представляет собой фермент, являющийся основным членом семейства ферментов холинэстеразы. Ингибитор ацетилхолинэстеразы (AChEI) представляет собой ингибитор, препятствующий расщеплению ацетилхолина на холин и ацетат под действием ацетилхолинэстеразы, тем самым увеличивая уровень и продолжительность действия нейромедиатора ацетилхолина в центральной нервной системе, вегетативных ганглиях и нервно-мышечных соединениях, которые богаты ацетилхолиновыми рецепторами. Ингибиторы ацетилхолинэстеразы представляют собой один из двух видов ингибиторов холинэстеразы; второй вид представлен ингибиторами бутирилхолинэстеразы.

[0240] В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент представляет собой ГАМК, которая может связываться с ГАМК-рецепторами для прохождения через ГЭБ. ГАМК-рецепторы представляют собой класс рецепторов, реагирующих на нейромедиатор гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК), главное ингибирующее соединение в зрелой центральной нервной системе позвоночных. Существует два класса рецепторов ГАМК: ГАМКА и ГАМКВ. ГАМКА-рецепторы представляют собой лиганд-зависимые ионные каналы (также известные как ионотропные рецепторы), в то время как ГАМКВ-рецепторы являются сопряженными с G-белком рецепторами, также называемыми метаботропными рецепторами.

[0241] В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент содержит тирозин, который может связываться с LAT1 и проникать через ГЭБ. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент содержит лизин, который может связываться с LAT1 и проникать через ГЭБ. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент содержит глутамин, который может связываться с LAT1 и проникать через ГЭБ. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент содержит фенилаланин, который может связываться с ГАМК-рецепторами, LAT1, ингибиторами обратной транскриптазы в ЦНС и/или рецепторами дофамина (DA), и проникать через ГЭБ. Дофаминовые рецепторы представляют собой класс сопряженных с G-белком рецепторов, которые широко представлены в центральной нервной системе (ЦНС) позвоночных. Дофаминовые рецепторы активируют различные эффекторы не только путем связывания с G-белком, но и передачей сигнала с помощью различных белковых взаимодействий (белки, взаимодействующие с дофаминовыми рецепторами). Нейромедиатор дофамин является основным эндогенным лигандом для дофаминовых рецепторов.

[0242] Дофаминовые рецепторы участвуют во многих неврологических процессах, в том числе в процессах мотивации, удовольствия, познания, памяти, научения, контроля мелкой моторики, а также в модуляции нейроэндокринной сигнализации. Нарушение сигнализации дофаминовых рецепторов и функции дофаминергических нервов связано с рядом нейropsychических расстройств. Таким образом, дофаминовые рецепторы являются распространенными мишенями неврологических лекарственных средств; нейролептики часто являются антагонистами дофаминовых рецепторов, а психостимуляторы, как правило, представляют собой непрямые агонисты дофаминовых рецепторов.

[0243] В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент содержит валин, который может связываться с ингибиторами обратной транскриптазы в ЦНС и проникать через ГЭБ. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент содержит триптофан, который может связываться с ГАМК-рецепторами и/или ингибиторами обратной транскриптазы в ЦНС, и проникать через ГЭБ. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент содержит лейцин, который может связываться с ГАМК-рецепторами и/или ингибиторами обратной транскриптазы в ЦНС, и проникать через ГЭБ. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент содержит метионин, который может связываться с ГАМК-рецепторами и/или ингибиторами обратной транскриптазы в ЦНС, и проникать через ГЭБ. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент содержит гистидин, который может связываться с ГАМК-рецепторами и проникать через ГЭБ. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент содержит изолейцин, который может связываться с ингибиторами обратной транскриптазы в ЦНС и проникать через ГЭБ. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент содержит глутатион, который может связываться с переносчиком GSH и проникать через ГЭБ. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент содержит глутатионмет, который может связываться с переносчиком GSH и проникать через ГЭБ. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент содержит мочевины/тиомочевину, которая может связываться с синтазой оксида азота (NOS) и связываться с ГЭБ. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент содержит НАД⁺/НАДН, который может пересекать ГЭБ с помощью механизма REDOX. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент содержит пурин и может проникать через ГЭБ. Дополнительные примеры нацеливающих фрагментов для нацеливания на ЦНС приведены в работе Sutera et al. (2016): Small endogenous molecules as moiety to improve targeting of CNS drugs, Expert Opinion on Drug Delivery, DOI: 10.1080/17425247.2016.1208651, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

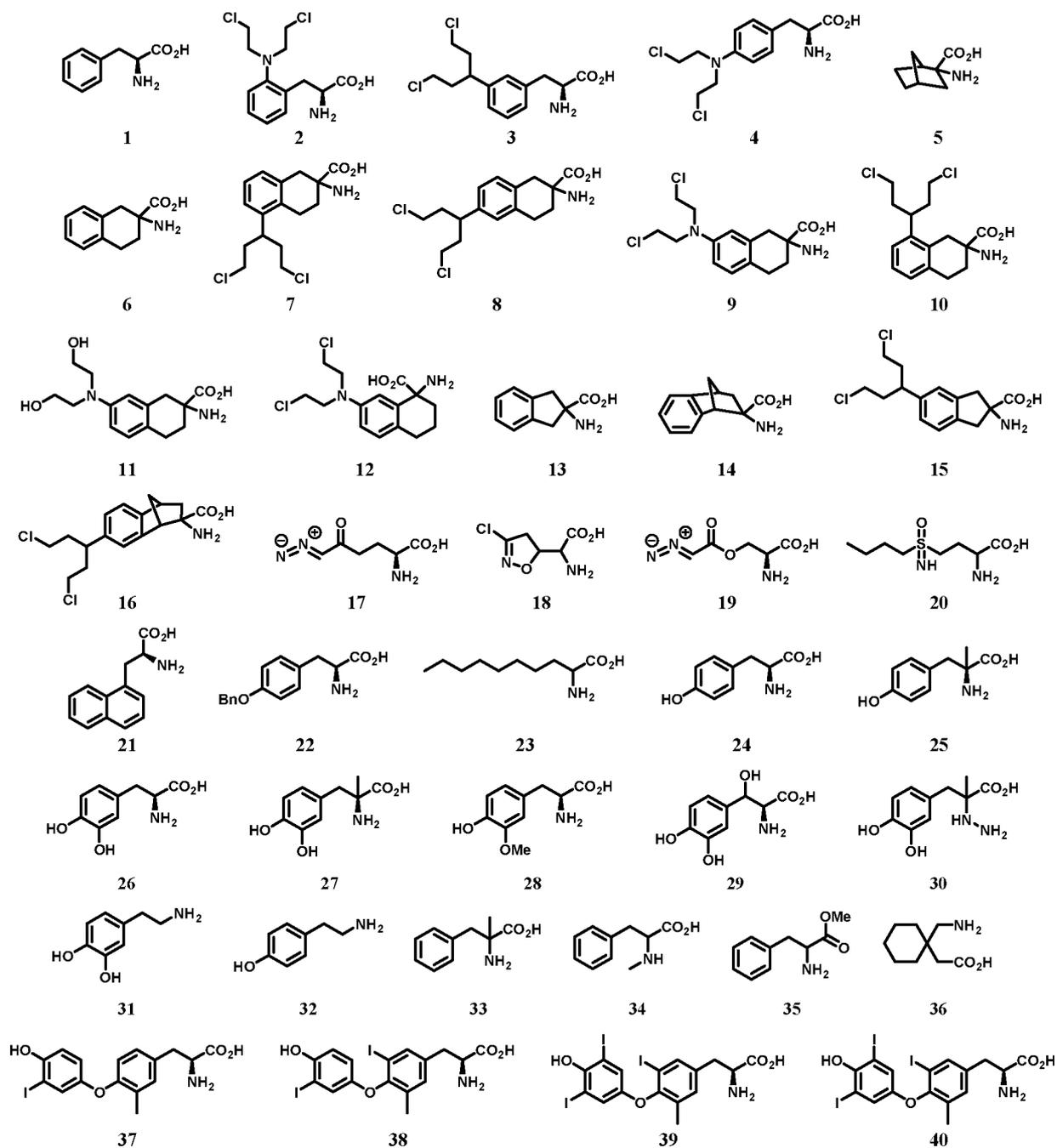
[0244] В некоторых аспектах ткань, на которую нацелен нацеливающий фрагмент, представляет собой скелетную мышцу. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент,

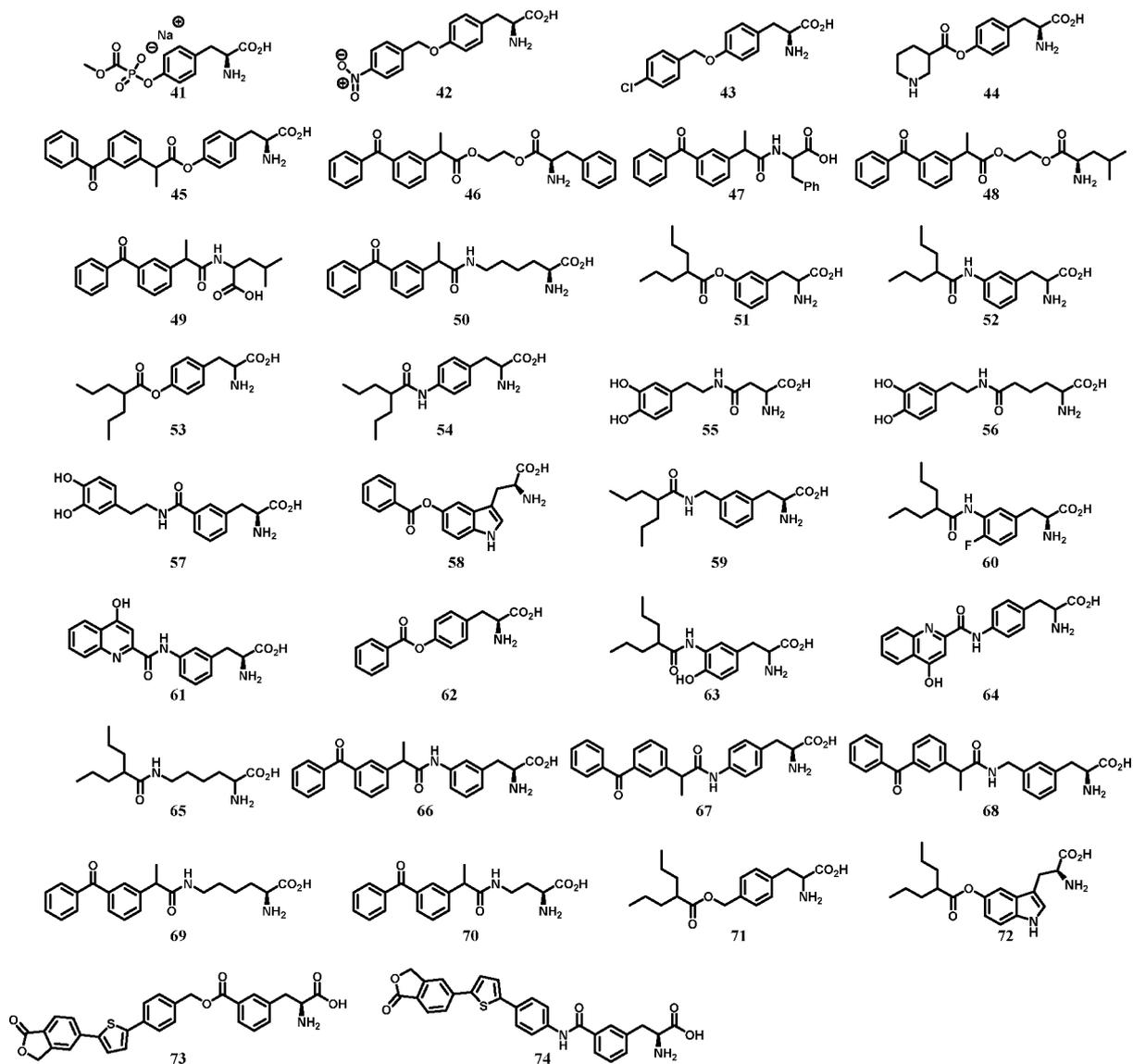
нацеленный на скелетную мышцу, может переноситься переносчиком крупных нейтральных аминокислот типа 1 (LAT1).

[0245] Он экспрессируется в многочисленных типах клеток, включая Т-клетки, клетки злокачественных опухолей и эндотелиальные клетки головного мозга. LAT1 постоянно экспрессируется на высоком уровне в эндотелиальных клетках микроциркуляторного русла головного мозга. Будучи переносчиком растворенных веществ, расположенным преимущественно в ГЭБ, нацеливание мицелл настоящего изобретения на LAT1 позволяет осуществлять доставку через ГЭБ. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент, нацеливающий мицеллу настоящего изобретения на переносчик LAT1, представляет собой аминокислоту, *например*, аминокислоту с разветвленной цепью или ароматическую аминокислоту. В некоторых аспектах аминокислота представляет собой валин, лейцин и/или изолейцин. В некоторых аспектах аминокислота представляет собой триптофан и/или тирозин. В некоторых аспектах аминокислота представляет собой триптофан. В других аспектах аминокислота представляет собой тирозин.

[0246] В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент представляет собой лиганд LAT1, выбранный из триптофана, тирозина, фенилаланина, триптофана, метионина, тироксина, мелфалана, L-ДОФА, габапентина, 3,5-И-дийодтирозина, 3-йодо-И-тирозина, фенклонина, ацивигина, лейцина, ВСН, метионина, гистидина, валина или любой их комбинации.

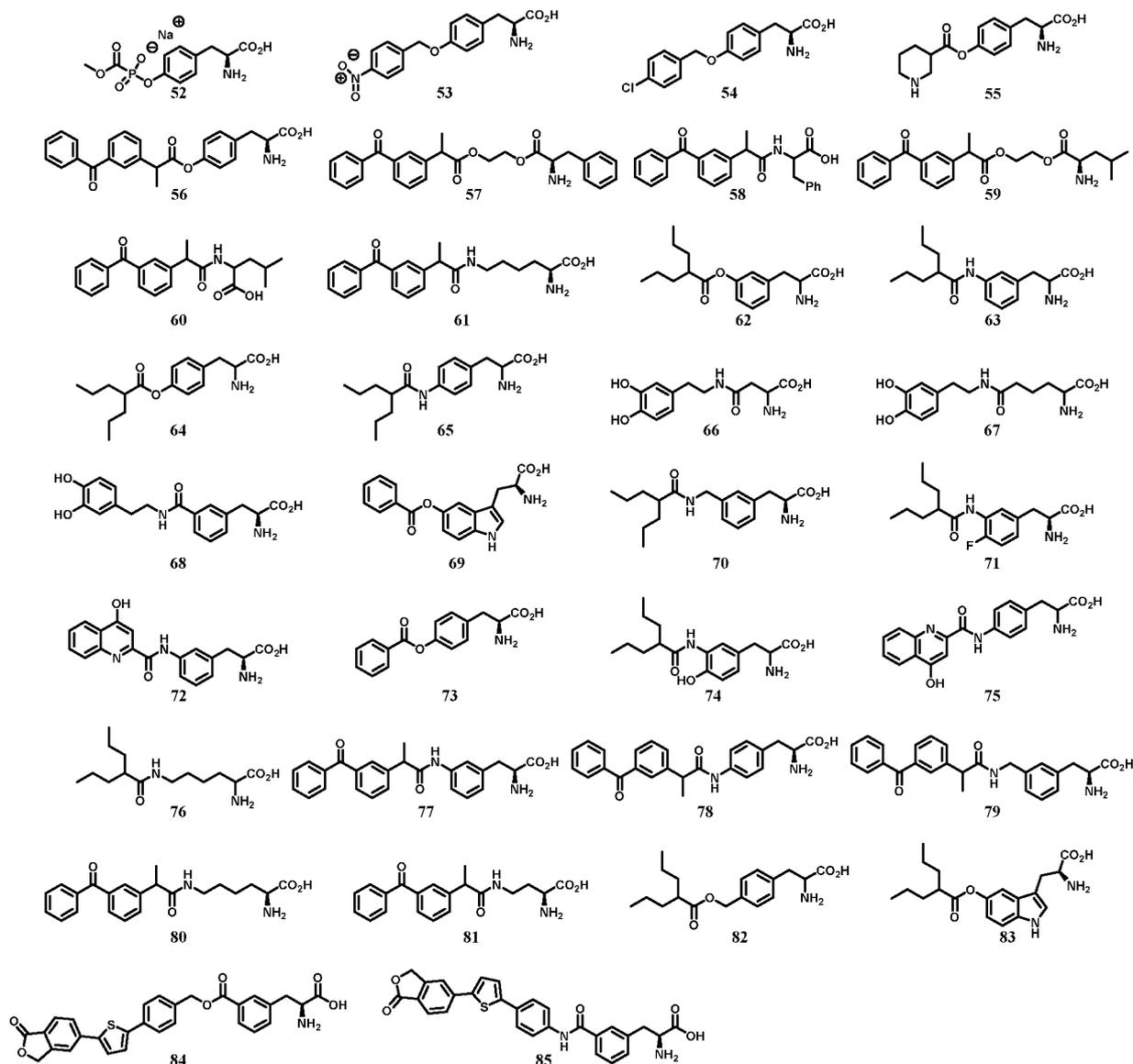
[0247] В некоторых аспектах лиганд LAT1 представляет собой [1] l-фенилаланин, [2] о-сарколизин, [3] m-сарколизин, [4] мелфалан, [5] 2-амино-2-норборнандикарбоновая кислота (ВСН), [6] (\pm)-2-амино-1,2,3,4-тетрагидро-2-нафтойную кислоту, [7] dl-2-NAM-5, [8] dl-2-NAM-6, [9] dl-2-NAM-7, [10] dl-2-NAM-8, [11] dl-дехлорированный NAM, [12] dl-1-NAM-7, [13] (\pm)-2-аминоиндан-2-карбоновую кислоту, [14] (\pm)-2-аминобензо-бицикло[2.2.1]гептан-2'-экзо-карбоновую кислоту, [15] (\pm)-2-амино-(бис-2-хлорэтил)-5-аминоиндан-2-карбоновую кислоту, [16] (\pm)-2-эндо-амино-бис(2-хлорэтил)-7'-аминобензобицикло[2.2.1]гептан-2-экзо-карбоновую кислоту, [17] 1-6-диазо-5-оксо-норлейцин (1-DON), [18] ацивигин, [19] азасерин, [20] бутионин сульфоксимин (BSO), [21] l-1-нафтилаланин, [22] o-бензил-l-тирозин, [23] l-2-аминононановая кислота, [24] l-тирозин, [25] α -метилтирозин, [26] l-ДОФА, [27] α -метилдофа, [28] 3-о-метилдофа, [29] дроксидопа, [30] карбидопа, [31] дофамин, [32] тирамин, [33] α -метилфенилаланин, [34] N-метилфенилаланин, [35] метиловый сложный эфир фенилаланина, [36] габапентин, [37] 3,3'-дийодтиронин, [38] l-T3, [39] 3',5',3-трийодтиронин (r l-T3) или [40] l-T4, или любую их комбинацию, как показано ниже.





или любая их комбинация.

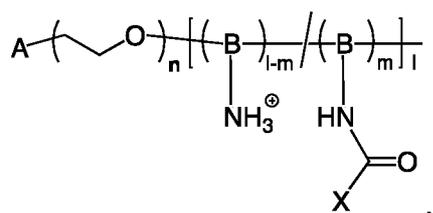
[0248] В некоторых аспектах лиганд LAT1 представляет собой нацеленное на LAT1 пролекарство, приведенное ниже.



или любая их комбинация.

[0249] См. Singh & Ecker (2018) “Insights into the Structure, Function, and Ligand Discovery of the Large Neutral Amino Acid Transporter 1, LAT1,” *Int. J. Mol. Sci.* 19:1278; Geier et al. (2013) “Structure-based ligand discovery for the Large-neutral Amino Acid Transporter 1, LAT-1,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110:5480-85; и Chien et al. (2018) “Reevaluating the Substrate Specificity of the L-type Amino Acid Transporter (LAT1),” *J. Med. Chem.* 61:7358-73, которые включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

[0250] В некоторых аспектах молекулы носителя настоящего изобретения содержат:



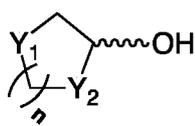
где А — триптофан или фенилаланин, а В — фрагмент катионного носителя, *например*, лизин,

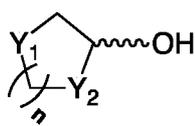
при этом

(i) l — целое число от около 1 до около 200; *например*, от около 2 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50 до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150, от около 150 до около 160, от около 160 до около 170, от около 170 до около 180, от около 180 до около 190 или от около 190 до около 200;

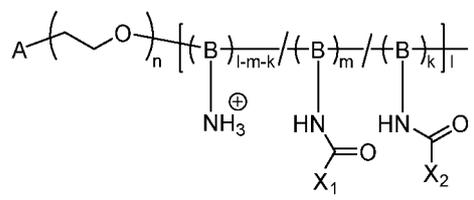
(ii) m — целое число от 1 до 150, *например*, от около 2 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50 до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150; и

(iii) n — целое число от около 1 до около 200; *например*, от около 2 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50 до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150, от около 150 до около 160, от около 160 до около 170, от около 170 до около 180, от около 180 до около 190 или от около 190 до около 200;



и при этом X представляет собой , а n составляет 1 или 2; Y₁ — С, N, О или S, Y₂ — С, N, О или S, а n — 1 или 2., *например*, витамин В3.

[0251] В некоторых аспектах молекулы носителя настоящего изобретения содержат:



где А — триптофан или фенилаланин, а В — фрагмент катионного носителя, *например*, лизин,

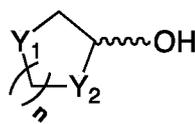
при этом

(i) l — целое число от около 1 до около 200; например, от около 2 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50 до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150, от около 150 до около 160, от около 160 до около 170, от около 170 до около 180, от около 180 до около 190 или от около 190 до около 200;

(ii) m — целое число от 1 до 150, например, от около 2 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50 до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150;

(iii) k — целое число от 1 до 150, например, от около 2 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50 до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150; и

(iv) n — целое число от около 1 до около 200; например, от около 2 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50 до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150, от около 150 до около 160, от около 160 до около 170, от около 170 до около 180, от около 180 до около 190 или от около 190 до около 200.



при этом X_1 представляет собой X_1 , где Y_1 — C, N, O или S, Y_2 — C, N, O или

S, а n — 1 или 2; и при этом X_2 представляет собой $\text{X}_2 = \text{---}(\text{---})_p\text{---SH}$, где $p =$ от 0 до 5. В некоторых аспектах p составляет 0. В некоторых аспектах X_2 представляет собой SH.

[0252] Неограничивающие примеры нацеливающих фрагментов приведены ниже.

i. Лиганды

[0253] Лиганд по сути является видом нацеливающего фрагмента, определяемый как избирательно связываемый материал, обладающий избирательным (или специфическим) сродством к другому веществу. Лиганд распознается и связывается обычно, но не обязательно, более крупным специфически связывающим телом или «партнером по

связыванию», или «рецептором». Примерами подходящих для нацеливания лигандов являются антигены, гаптены, биотин, производные биотина, лектины, галактозаминовые и фукозиламиновые фрагменты, рецепторы, субстраты, коферменты, кофакторы и др.

[0254] При применении к мицеллам настоящего изобретения лиганд включает в себя антиген или гаптен, который способен связываться с соответствующим антителом или его фракцией. Также к ним относят вирусные антигены или гемагглютинины, а также нейраминидазы и нуклеокапсиды, в том числе антигены любых ДНК- и РНК-вирусов, вирусов СПИДа, ВИЧ и гепатита, аденовирусов, альфавирусов, аренавирусов, коронавируса, флавивирусов, герпесвирусов, миксовирусов, онкорнавирусов, паповавирусов, парамиксовирусов, парвовирусов, пикорнавирусов, поксвирусов, реовирусов, рабдовирусов, риновирусов, тогавирусов и вириодов; любые бактериальные антигены, в том числе антигены грамотрицательных и грамположительных бактерий, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Chlamydia*, энтеробактерий, *Haemophilus*, *Lactobacillus*, *Neisseria*, *Staphylococcus*, или *Streptococcus*; любые грибковые антигены, в том числе антигены *Aspergillus*, *Candida*, *Coccidioides*, микозов, фикомицетов и дрожжей; любые антигены микоплазмы; любые риккетсиальные антигены; любые антигены простейших; любые антигены паразитов; любые антигены человека, в том числе антигены клеток крови, зараженных вирусами клеток, генетических маркеров, сердечных заболеваний, онкопротеинов, белков плазмы, факторов комплемента, ревматоидных факторов. К ним относят антигены злокачественных новообразований и опухолевые антигены, такие как альфа-фетопротеины, простатитический специфический антиген (PSA) и СЕА, онкомаркеры и онкопротеины и др.

[0255] К другим веществам, способным функционировать как лиганды для нацеливания мицелл настоящего изобретения, относят некоторые витамины (а именно, фолиевую кислоту, В₁₂), стероиды, простагландины, углеводы, липиды, антибиотики, лекарственные средства, дигоксины, пестициды, наркотические средства, нейромедиаторы, а также вещества, применяемые или модифицированные таким образом, что они функционируют как лиганды.

[0256] В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент содержит белок или фрагмент белка (*например*, гормоны, токсины), а также синтетические или природные полипептиды с клеточным сродством. Лиганды также включают в себя различные вещества с избирательным сродством к лигаторам, которые получают с помощью рекомбинантной ДНК, генной и молекулярной инженерии. Если не указано иное, лиганды настоящего изобретения также включают в себя лиганды, определенные в патенте США № 3,817,837, который включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

ii. Лигаторы

[0257] Лигатор представляет собой вид нацеливающего фрагмента, определяемого в настоящем изобретении как специфическое связывающее тело или «партнер», или «рецептор», который обычно, но не обязательно, превосходит по размеру лиганд, с которым он может связываться. В контексте настоящего изобретения это может быть конкретное вещество или материал, или химическое соединение, или «реагент», способный избирательно связываться с определенным лигандом. Лигатором может быть белок, например, антитело, небелковое связывающее тело или «специфический реактор».

[0258] В контексте настоящего изобретения лигатор включает в себя антитело, которое, согласно определению, включает в себя все классы антител, моноклональные антитела, химерные антитела, Fab-фракции, фрагменты и их производные. Термин «антитело» охватывает иммуноглобулин, природный или частично или полностью полученный синтетическим путем, а также его фрагменты. Термин также охватывает любой белок, имеющий домен связывания, гомологичный домену связывания иммуноглобулина. «Антитело» дополнительно включает в себя полипептид, содержащий каркасную область из гена иммуноглобулина или его фрагменты, который специфически связывает и распознает антиген. Термин «антитело» включает в себя целые антитела, поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела, их фрагменты, а также дополнительно включает в себя одноцепочечные антитела, гуманизированные антитела, мышинные антитела, химерные, мышино-человеческие, мышино-приматные, приматно-человеческие моноклональные антитела, антиидиотипические антитела, фрагменты антител, такие как, *например*, scFv, scFab, (scFab)₂, (scFv)₂, Fab, Fab' и F(ab')₂, F(ab1)₂, Fv, dAb и Fd фрагменты, диатела и связанные с антителами полипептиды. Антитело включает в себя биспецифические антитела и мультиспецифические антитела, если они проявляют желаемую биологическую активность или функцию. В некоторых аспектах настоящего изобретения нацеливающий фрагмент представляет собой антитело или молекулу, содержащую его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах антитело представляет собой нанотело. В некоторых аспектах антитело представляет собой ADC. Термины «конъюгат антитело-лекарственное средство» и «ADC» применяются взаимозаменяемо и относятся к антителу, связанному, *например*, ковалентно, с лекарственным средством (иногда именуемым в настоящем документе как средство, лекарственное средство или активный фармацевтический ингредиент) или средствами. В некоторых аспектах настоящего изобретения нацеливающий фрагмент представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство.

[0259] При определенных условиях настоящее изобретение также применимо к использованию других веществ в качестве лигаторов. Например, к другим лигаторам, подходящим для нацеливания, относятся рецепторы природного происхождения, любые гемагглютинины и производные клеточных мембран и ядер, которые специфически связываются с гормонами, витаминами, лекарственными средствами, антибиотиками, онкомаркерами, генетическими маркерами, вирусами и маркерами гистосовместимости. Другая группа лигаторов включает в себя любые вещества, связывающие РНК и ДНК, такие как полиэтиленимин (PEI) и полипептиды или белки, такие как гистоны и протамины.

[0260] Другие лигаторы также включают в себя ферменты, особенно ферменты клеточной поверхности, такие как нейраминидазы, белки плазмы, авидины, стрептавидины, халоны, кавитанды, тиреоглобулин, внутренний фактор, глобулины, хелаторы, поверхностно-активные вещества, металлоорганические вещества, стафилококковый белок А, белок G, рибосомы, бактериофаги, цитохромы, лектины, некоторые смолы и органические полимеры.

[0261] Нацеливающие фрагменты также включают в себя различные вещества, такие как любые белки, фрагменты белков или полипептиды, обладающие сродством к поверхности любых клеток, тканей или микроорганизмов, которые получают с помощью рекомбинантной ДНК, генетической и молекулярной инженерии. Таким образом, в некоторых аспектах нацеливающий фрагмент направляет мицеллу настоящего изобретения в конкретную ткань (*а именно*, ткань печени или головного мозга), к конкретному типу клеток (*например*, определенному типу клеток злокачественной опухоли) или в физиологический компартмент или к физиологическому барьеру (*например*, ГЭБ).

е. Линкеры

[0262] Как описано выше, раскрытый в настоящем документе молекула катионного носителя может содержать, как показано, *например*, на ФИГ. 3, один или более линкеров. В контексте настоящего документа термин «линкер» относится к пептидной или полипептидной последовательности (*например*, синтетической пептидной или полипептидной последовательности) или непептидному линкеру, для которого его основная функция заключается в соединении двух молекул в молекуле катионного носителя, раскрытом в настоящем документе. В некоторых аспектах молекулы катионных носителей настоящего изобретения могут содержать по меньшей мере один линкер, соединяющий тканеспецифический нацеливающий фрагмент (ТМ) с водорастворимым полимером (WS), по меньшей мере один линкер, соединяющий водорастворимый биополимер (WP) с катионным носителем (CC) или фрагментом адъюванта (AM), по меньшей мере один линкер, соединяющий катионный носитель (CC) с фрагментом

адъюванта (АМ), или любую их комбинацию. В некоторых аспектах два или более линкеров могут быть соединены в тандеме.

[0263] При наличии нескольких линкеров в молекуле катионного носителя, раскрытого в настоящем документе, каждый из линкеров может быть одинаковым или разным. Как правило, линкеры обеспечивают гибкость катионного носителя. Линкеры обычно не расщепляются, однако в некоторых аспектах такое расщепление может быть желательным. Соответственно, в некоторых аспектах линкер может содержать один или более сайтов, расщепляемых протеазой, которые могут быть расположены внутри последовательности линкера или фланкировать линкер на любом конце последовательности линкера.

[0264] В одном аспекте линкер представляет собой пептидный линкер. В некоторых аспектах пептидный линкер может содержать по меньшей мере около двух, по меньшей мере около трех, по меньшей мере около четырех, по меньшей мере около пяти, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 25, по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 35, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 45, по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 55, по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 65, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 75, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 85, по меньшей мере около 90, по меньшей мере около 95 или по меньшей мере около 100 аминокислот.

[0265] В некоторых аспектах пептидный линкер может содержать по меньшей мере около 110, по меньшей мере около 120, по меньшей мере около 130, по меньшей мере около 140, по меньшей мере около 150, по меньшей мере около 160, по меньшей мере около 170, по меньшей мере около 180, по меньшей мере около 190 или по меньшей мере около 200 аминокислот.

[0266] В других аспектах пептидный линкер может содержать по меньшей мере около 200, по меньшей мере около 250, по меньшей мере около 300, по меньшей мере около 350, по меньшей мере около 400, по меньшей мере около 450, по меньшей мере около 500, по меньшей мере около 550, по меньшей мере около 600, по меньшей мере около 650, по меньшей мере около 700, по меньшей мере около 750, по меньшей мере около 800, по меньшей мере около 850, по меньшей мере около 900, по меньшей мере около 950 или по меньшей мере около 1 000 аминокислот.

[0267] Пептидный линкер может содержать от 1 до около 5, от 1 до около 10, от 1 до около 20, от около 10 до около 50, от около 50 до около 100, от около 100 до около 200, от около 200 до около 300, от около 300 до около 400, от около 400 до около 500, от около 500 до около 600, от около 600 до около 700, от около 700 до около 800, от около 800 до около 900 или от около 900 до около 1 000 аминокислот.

[0268] Примеры пептидных линкеров хорошо известны в данной области. В некоторых аспектах линкер представляет собой глицин/сериновый линкер. В некоторых аспектах пептидный линкер представляет собой глицин/сериновый линкер в соответствии с формулой $[(\text{Gly})_n\text{-Ser}]_m$, где n — любое целое число от 1 до 100, а m — любое целое число от 1 до 100. В других аспектах глицин/сериновый линкер соответствует формуле $[(\text{Gly})_x\text{-Sery}]_z$ (SEQ ID NO: 1), где x — целое число от 1 до 4, y — 0 или 1, а z — целое число от 1 до 50. В одном аспекте пептидный линкер содержит последовательность G_n , где n может быть целым числом от 1 до 100. В конкретном аспекте последовательность пептидного линкера представляет собой GGGG (SEQ ID NO: 2).

[0269] В некоторых аспектах пептидный линкер может содержать последовательность $(\text{GlyAla})_n$ (SEQ ID NO: 3), где n — целое число от 1 до 100. В других аспектах пептидный линкер может содержать последовательность $(\text{GlyGlySer})_n$ (SEQ ID NO: 4), где n — целое число от 1 до 100.

[0270] В других аспектах пептидный линкер содержит последовательность $(\text{GGGS})_n$ (SEQ ID NO: 5). В других аспектах пептидный линкер содержит последовательность $(\text{GGS})_n(\text{GGGS})_n$ (SEQ ID NO: 6). В этих случаях n может представлять собой целое число от 1 до 100. В других случаях n может быть целым числом от одного до 20, а именно, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20.

[0271] Примеры линкеров включают в себя, помимо прочего, GGG , SGGSGGS (SEQ ID NO: 7), GGSGGSGGSGGSGGG (SEQ ID NO: 8), GGSGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 9), $\text{GGSGGSGGSGGSGGSGGS}$ (SEQ ID NO: 10), or GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 11). В других аспектах линкер представляет собой поли-G последовательность $(\text{GGGG})_n$ (SEQ ID NO: 12), где n может быть целым числом от 1 до 100.

[0272] В одном аспекте пептидный линкер является синтетическим, *т. е.* не природного происхождения. В одном аспекте пептидный линкер включает в себя пептиды (или полипептиды) (*например*, пептиды природного или не природного происхождения), которые содержат аминокислотную последовательность, которая связывает или генетически соединяет первую линейную аминокислотную последовательность со второй линейной аминокислотной последовательностью, с которой она естественным образом не связана или генетически не соединена. Например, в одном аспекте пептидный линкер может содержать полипептиды не природного происхождения, которые являются модифицированными формами полипептидов природного происхождения (*например*, содержащих мутацию, такую как добавление, замена или делеция). В другом аспекте пептидный линкер может содержать аминокислоты не природного происхождения. В другом аспекте пептидный линкер может содержать аминокислоты природного

происхождения в виде линейной последовательности, которая не встречается в природе. В еще одном аспекте пептидный линкер может содержать полипептидную последовательность природного происхождения.

[0273] В некоторых аспектах линкер содержит непептидный линкер. В других аспектах линкер состоит из непептидного линкера. В некоторых аспектах непептидный линкер может представлять собой, *например*, малеимидакапроил (MC), малеимидопропаноил (MP), метоксиполиэтиленгликоль (MPEG), сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный сложный эфир (MBS), сукцинимидил 4-(p-малеимидофенил)бутират (SMPB), N-сукцинимидил(4-йодоацетил)аминобензонат (SIAB), сукцинимидил 6-[3-(2-пиридилдитио)-пропионамид]гексаноат (LC-SPDP), 4-сукцинимидилоксикарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридилдитио)толуол (SMPT) и др. (см., *например*, патент США № 7,375,078).

[0274] Линкеры могут быть введены в полипептидные последовательности с помощью методов, известных в данной области (*например*, химическая конъюгация, рекомбинантные методы или пептидный синтез). Модификации могут быть подтверждены анализом последовательности ДНК. В некоторых аспектах линкеры могут быть введены с помощью рекомбинантных методов. В других аспектах линкеры могут быть введены с помощью твердофазного пептидного синтеза. В некоторых аспектах молекула катионного носителя, раскрытого в настоящем документе, может одновременно содержать один или более линкеров, введенных с помощью рекомбинантных методов, и один или более линкеров, введенных с помощью твердофазного пептидного синтеза или методов химической конъюгации, известных в данной области. В некоторых аспектах линкер содержит сайт расщепления.

III. Полезные нагрузки

[0275] В контексте настоящего документа термин «полезная нагрузка» относится к биологически активной молекуле, *например*, лекарственному средству или молекуле, которая может взаимодействовать самостоятельно или посредством адаптера с молекулой катионного носителя настоящего изобретения и быть включенной в сердцевину мицеллы настоящего изобретения. Полезные нагрузки, предусмотренные в настоящем изобретении, включают в себя, помимо прочего, терапевтические лекарственные средства, *например*, пролекарства, противораковые лекарственные средства, противоопухолевые лекарственные средства, противогрибковые лекарственные средства, антибактериальные лекарственные средства, противовирусные лекарственные средства, сердечные лекарственные средства, неврологические лекарственные средства и лекарственные

средства, вызывающие зависимость; алкалоиды, антибиотики, биоактивные пептиды, стероиды, стероидные гормоны, полипептидные гормоны, интерфероны, интерлейкины, наркотические средства, нуклеиновые кислоты, в том числе антисмысловые олигонуклеотиды, пестициды и простагландины. Биологически активные молекулы также включают в себя любые токсины, в том числе афлатоксины, рицины, бунгаротоксины, иринотекан, ганцикловир, фуросемид, индометацин, хлорпромазин, метотрексат, производные и аналоги цевина, в том числе цевадины, десатрины и вератридин и др.

[0276] Биологически активные молекулы также включают в себя, помимо прочего, различные производные и аналоги флавонов, в том числе дигидроксифлавоны (хризины), тригидроксифлавоны (апигенины), пентагидроксифлавоны (морины), гексагидроксифлавоны (мирицетины), флавилиумы, кверцетины, фисетины; различные антибиотики, в том числе их производные и аналоги, такие как производные пенициллина (а именно, ампициллин), антрациклины (а именно, доксорубин, даунорубин, митоксантрон), бутконазол, камптотецин, халькомицин, шартрезин, хризомицины (V и M), хлорамфеникол, хлортетрациклины, кломоциклины, циклоспорины, эллиптицины, филипины, фунгихромины, гризеофульвин, гризеовиридин, гуамециклины, метициллины, нистатины, хримутазины, элсамидин, гилвокарин, равидомицин, антибиотики группы ланкацидина (а именно, ланкамицин), митомицин, терамицины, тетрациклины, вортманнины; различные противомикробные препараты, в том числе резерпин, спиронолактон, сульфациетамид натрия, сульфаниламид, тиамфениколы, тиолутины; различные производные и аналоги пурина и пиримидина, в том числе 5'-фторурацил, 5'-фтор-2'-дезоксинуридин и аллопуринол; различные фотосенсибилизирующие вещества, особенно те, которые применяются для образования синглетного и триплетного кислорода, полезного для фотодинамической терапии (van Lier, J. E. "Photodynamic Therapy of Neoplastic Disease"; Kessel, D., Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1990, Vol. 1), в том числе мезохлорин еб моноэтилендиамин (Мсеб), фиталоцианин, порфирины и их производные и аналоги; различные стероидные соединения, такие как кортизоны, эстрадиолы, гидрокортизон, тестостероны, преднизолон, прогестероны, дексаметазон, беклометазон и другие производные метазона, другие стероидные производные и аналоги, в том числе холестерин, дигитоксин, дигоксин, дигоксигенины; различные производные и аналоги кумаринов, в том числе дигидрокумарины (эскулетины), дикумаролы, хризаробины, хризофановые кислоты, эмодин, секалоновые кислоты; различные допа, их производные и аналоги, в том числе допа, допамин, адреналин и норадреналин (артеренолы); различные антинеопластические средства или ингибиторы роста клеток, такие как цисплатины и таксаны, в том числе паклитаксел и доцетаксел; различные барбитураты, в

том числе фенobarбитон, амобарбитал, аллобарбитал, пентобарбитал и другие производные барбитала; различные производные бензола, в том числе аминокислоты, бромбензойную кислоту, бензокаин, бензодиазепины, бензотиазид, бутил-р-аминобензоат; различные производные полипептидов; различные производные карбоновых кислот, такие как бромизовалерилмочевина, фенилбутировая кислота, фенилвалериановая кислота или любую их комбинацию.

[0277] Другие биологически активные молекулы включают в себя, помимо прочего, дифенилгидантоин, адифенин, анетол, аспирин, азокпропазон, бенциклан, хлоралгидрат, хлорамбуцил, хлорпромазин, хлорогенин, коричную кислоту, клофибрат, коэнзим А, циклогексил антранилат, диазепам, флуфенамовую кислоту, флуоцинолона ацетонид, флурбипрофен, гвайазулен, ибупрофен, индикан, индометацин, йод, кетопрофен, мефанаминовую кислоту, менадион, метронидазол, нитразепам, фенитоин, пропилпарабен, процилларидин, хинолон, талидомид, тиамин дилаурилсульфат, тиопентал, триамцинолон, витамины А, D3, Е, К3, варфарин или любую их комбинацию.

[0278] Другими биологически активными молекулами являются противовирусные лекарственные средства, нуклеиновые кислоты и другие противовирусные вещества, в том числе против любых ДНК- и РНК-вирусов, вирусов СПИДа, ВИЧ и гепатита, аденовирусов, альфавирусов, аренавирусов, коронавирусов, флавивирусов, герпесвирусов, миксовирусов, онкорнавирусов, паповавирусов, парамиксовирусов, парвовирусов, пикомавирусов, поксвирусов, реовирусов, табдовирусов, риновирусов, тогавирусов и вирионов; любые антибактериальные лекарственные средства, нуклеиновые кислоты и другие антибактериальные вещества, в том числе против грамотрицательных и грамположительных бактерий, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Chlamydia*, энтеробактерий, *Haemophilus*, *Lactobacillus*, *Neisseria*, *Staphylococcus* или *Streptococcus*; любые противогрибковые лекарственные средства, нуклеиновые кислоты и другие противогрибковые вещества, в том числе против *Aspergillus*, *Candida*, *Coccidioides*, микозов, фикомицетов и дрожжей; любые лекарственные средства, нуклеиновые кислоты и другие вещества против микоплазмы и риккетсий; любые противопротозойные лекарственные средства, нуклеиновые кислоты и другие вещества; любые противопаразитарные лекарственные средства, нуклеиновые кислоты и другие вещества; любые лекарственные средства, нуклеиновые кислоты и другие вещества, используемые при сердечных заболеваниях, опухолях и против инфицированных вирусами клеток, и др.

(a) Нуклеиновые кислоты

[0279] В некоторых аспектах биологически активная молекула (полезная нагрузка) представляет собой нуклеиновую кислоту, например, РНК или ДНК. Активные средства в

виде нуклеиновой кислоты, подходящие для доставки с помощью мицелл настоящего изобретения, включают в себя все типы РНК и все типы ДНК, в том числе также олигонуклеотиды, такие как зонды и праймеры, применяемые в полимеразной цепной реакции (ПЦР), гибридизации или секвенировании ДНК. В некоторых аспектах нуклеиновая кислота содержит мРНК, миРНК, миРНК-губку, прочную миРНК-ловушку (TD), антимири (антагомири), малую РНК, рРНК, киРНК, кшРНК, гДНК, кДНК, пДНК, ПНК, МНК, антисмысловой олигонуклеотид (ASO), аптамер, циклический динуклеотид или любую их комбинацию.

[0280] В некоторых аспектах биологически активная молекула (полезная нагрузка) содержит короткую интерферирующую РНК (киРНК), которая представляет собой двухцепочечную РНК, способную вызывать специфическое для последовательности посттранскрипционное выключение гена, тем самым снижая или даже подавляя экспрессию гена. Например, киРНК могут вызывать специфическую деградацию гомологичных молекул РНК, таких как мРНК, в пределах области идентичности последовательностей между киРНК и целевой РНК. Неограничивающие примеры киРНК раскрыты в публикации международной заявки 02/44321, которая включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[0281] В некоторых аспектах биологически активная молекула (полезная нагрузка) содержит короткие шпилечные РНК (кшРНК). В некоторых аспектах биологически активная молекула содержит миРНК или ингибитор миРНК (антимири). В некоторых аспектах биологически активная молекула (полезная нагрузка) может иметь длину в 10–30 нуклеотидов, например, 14–25 нуклеотидов. В некоторых аспектах биологически активная молекула (полезная нагрузка) имеет длину в 16–30 нуклеотидов, 18–25 нуклеотидов, в частности 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов.

[0282] Последовательности для миРНК имеются в свободном доступе, например, в реестре miRBase (Griffiths-Jones, et al., *Nucleic Acids Res.*, 36(Database Issue):D154-D158 (2008); Griffiths-Jones, et al, *Nucleic Acids Res.*, 36(Database Issue):D140-D144 (2008); Griffiths-Jones, et al., *Nucleic Acids Res.*, 36(Database Issue):D109-D111 (2008)) и других общедоступных базах данных.

[0283] В некоторых аспектах ингибиторы миРНК представляют собой олигомеры или полимеры рибонуклеиновой кислоты (РНК) или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), или их модификации. В некоторых аспектах антагонистами миРНК являются антимири. Антимири представляют собой специфический класс ингибиторов миРНК, которые описаны, например, в US2007/0213292 Stoffel et al. Антимири представляют собой РНК-подобные олигонуклеотиды, содержащие различные модификации для защиты от РНКаз и

получения фармакологических свойств, таких как усиленное поглощение тканями и клетками. Антимирны отличаются от нормальной РНК полным 2'-О-метилированием сахара, наличием фосфоротиоатного остова и холестеринавого фрагмента на 3'-конце.

[0284] Неограничивающие примеры антимиров и других ингибиторов миРНК описаны в WO2009/020771, WO2008/091703, WO2008/046911, WO2008/074328, WO2007/090073, WO2007/027775, WO2007/027894, WO2007/021896, WO2006/093526, WO2006/112872, WO2007/112753, WO2007/112754, WO2005/023986 или WO2005/013901, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

[0285] В некоторых аспектах нуклеиновые кислоты представляют собой фосфодисложноэфирные антисмысловые олигонуклеотиды и любые олигонуклеотиды, в которых сахарно-фосфатный «остов» был дериватизирован или заменен «аналогами остова», такими как фосфоротиоатными, фосфородитиоатными, фосфороамидатными, алкилфосфотрисложноэфирными или метилфосфонатными связями. В некоторых аспектах активные средства в виде нуклеиновых кислот представляют собой антисмысловые олигонуклеотиды, а также любые олигонуклеотиды или олигодезоксинуклеотиды с нефосфорными аналогами остова, такими как сульфамат, 3'-тиоформацеталь, метилен(метилямино) (ММИ), 3'-N-карбамат или морфолинокарбамат.

[0286] В некоторых аспектах биологически активная молекула (полезная нагрузка) представляет собой антимир. В контексте настоящего документа термины «антимир», «антимикроРНК», «антимиРНК» и их варианты относятся к молекулам (*например*, синтетически полученным молекулам), которые применяются для нейтрализации функции микроРНК (миРНК) в клетках для получения желаемых реакций. миРНК представляют собой последовательности (приблизительно 20–22 пары оснований), комплементарные мРНК, которые участвуют в расщеплении РНК или подавлении трансляции. Контролируя миРНК, регулирующие мРНК в клетках, антимирны (также называемые анти-миРНК олигонуклеотидами, АМО или антагомирами) могут быть применены как для дальнейшего регулирования, так и для терапии определенных клеточных нарушений. Эта регуляция может происходить с помощью механизма пространственного блокирования, а также путем гибридизации с миРНК.

[0287] Эти взаимодействия в организме между антимирами и миРНК могут применяться для терапии заболеваний, при которых происходит избыточная или недостаточная экспрессия, или когда абберации в миРНК приводят к проблемам кодирования. Некоторые из встречающихся у человека заболеваний, связанных с миРНК, включают в себя злокачественные новообразования, мышечные заболевания, аутоиммунные расстройства и вирусные поражения.

[0288] Можно управлять различными компонентами антимиринов для влияния на аффинность связывания и потенцию антимира. Можно модифицировать 2'-сахар антимиринов заменой его на фтор и различные метильные группы, почти все из которых повышают аффинность связывания. Однако некоторые из этих антимиринов с модифицированным 2'-сахаром оказывают отрицательное влияние на рост клеток. Известно, что модификация 5'-3' фосфодисложноэфирной связи в фосфоротиоатную (P-S) связь также влияет на аффинность к мишени. Было показано, что применение мутации P-S снижает T_m олигонуклеотида, что приводит к снижению аффинности к мишени. Последним требованием к антимирам является специфичность несоответствия и ограничения по длине. Поскольку миРНК в одних и тех же семействах имеют общие «затравочные» (общие) последовательности и отличаются только парой дополнительных нуклеотидов, то не исключено, что один антимирир может нацеливаться на несколько последовательностей миРНК. Один или более примеров антимиринов или последовательностей миРНК приведены в следующей таблице.

ТАБЛИЦА 1.

SEQ ID NO для миРНК	Целевой показатель	Название миРНК	Последовательность зрелой миРНК	SEQ ID NO для антимирира	Последовательность ингибитора искусственной миРНК (антимирир)
13	95	hsa-miR-204-5p	UUCCCUUUGUCAUCCU AUGCCU	15	AGGCAUAGGAUG ACAAAGGGAA
14	89	hsa-miR-132-3p	UAACAGUCUACAGCCA UGGUCG	16	CGACCAUGGCUG UAGACUGUUA

[0289] В некоторых аспектах полезная нагрузка представляет собой полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность длиной от 5 до 30 нуклеотидов. В некоторых аспектах полинуклеотид имеет длину в 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов. В некоторых аспектах нуклеотидная последовательность имеет длину в 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 нуклеотидов.

[0290] В некоторых аспектах полезная нагрузка (*например*, антимирир) представляет собой нуклеотидную последовательность, нацеленную на hsa-miR-485, *например*, hsa-miR-485-3p. В некоторых аспектах hsa-miR-485-3p имеет последовательность

GUCAUACACGGCUCUCCUCUCU (SEQ ID NO: 17). В некоторых аспектах полезная нагрузка (*например*, антими́р) представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую, состоящую по существу из или состоящую из AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC (SEQ ID NO: 18), где U в качестве варианта может быть представлен T. В некоторых аспектах полезная нагрузка (*например*, антими́р) представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую, состоящую по существу из или состоящую из AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC (SEQ ID NO: 18), где нуклеотидная последовательность имеет одно, два, три или четыре несоответствия. В некоторых аспектах полезная нагрузка (*например*, антими́р) представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую, состоящую по существу из или состоящую из AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC (SEQ ID NO: 18), где нуклеотидная последовательность имеет одно или два несоответствия. В других аспектах полезная нагрузка (*например*, антими́р) представляет собой нуклеотидную последовательность, нацеленную на затравочную последовательность has-miR-485-3p (UCAUACA; SEQ ID NO: 19). В некоторых аспектах полезная нагрузка (*например*, антими́р) представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую UCAUACA (SEQ ID NO: 19), где U в качестве варианта может быть представлен T (комплементарная цепь затравки), в которой длина нуклеотидной последовательности составляет от 10 нуклеотидов до 30 нуклеотидов (*например*, от 10 до 25, от 10 до 24, от 10 до 23, от 10 до 22, от 10 до 21, от 10 до 20, от 10 до 19 или от 10 до 18). В некоторых аспектах полезная нагрузка (*например*, антими́р) представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую UGUAUGA (SEQ ID NO: 20), где U в качестве варианта может быть представлен T (комплементарная цепь затравки), в которой нуклеотидная последовательность содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеиновых кислот на 5'-конце комплементарной цепи затравочной последовательности и/или одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеиновых кислот на 3'-конце комплементарной цепи затравочной последовательности.

[0291] В некоторых аспектах полезная нагрузка представляет собой нуклеотидную последовательность, выбранный из группы, состоящей из: 5'-UGUAUGA-3' (SEQ ID NO: 23), 5'-GUGUAUGA-3' (SEQ ID NO: 24), 5'-CGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO: 25), 5'-CCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO: 26), 5'-GCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO: 27), 5'-AGCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO: 28), 5'-GAGCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO: 29), 5'-AGAGCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO: 30), 5'-GAGAGCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO: 31), 5'-GGAGAGCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO: 32), 5'-AGGAGAGCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID

NO: 33), 5'-GAGGAGAGCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO: 34), 5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO: 35), 5'-GAGAGGAGAGCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO: 36); 5'-UGUAUGAC-3' (SEQ ID NO: 37), 5'-GUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO: 38), 5'-CGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO: 39), 5'-CCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO: 40), 5'-GCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO: 41), 5'-AGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO: 42), 5'-GAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO: 43), 5'-AGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO: 44), 5'-GAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO: 45), 5'-GGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO: 46), 5'-AGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO: 47), 5'-GAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO: 48), 5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO: 49), or 5'-GAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO: 50).

[0292] В некоторых аспектах полезная нагрузка представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую 5'-TGTATGA-3' (SEQ ID NO: 51), 5'-GTGTATGA-3' (SEQ ID NO: 52), 5'-CGTGTATGA-3' (SEQ ID NO: 53), 5'-CCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO: 54), 5'-GCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO: 55), 5'-AGCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO: 56), 5'-GAGCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO: 57), 5'-AGAGCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO: 58), 5'-GAGAGCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO: 59), 5'-GGAGAGCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO: 60), 5'-AGGAGAGCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO: 61), 5'-GAGGAGAGCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO: 62), 5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO: 63), 5'-GAGAGGAGAGCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO: 64); 5'-TGTATGAC-3' (SEQ ID NO: 65), 5'-GTGTATGAC-3' (SEQ ID NO: 66), 5'-CGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO: 67), 5'-CCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO: 68), 5'-GCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO: 69), 5'-AGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO: 70), 5'-GAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO: 71), 5'-AGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO: 72), 5'-GAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO: 73), 5'-GGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO: 74), 5'-AGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO: 75), 5'-GAGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO: 76), 5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO: 77) или 5'-GAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO: 78).

[0293] В некоторых аспектах полезная нагрузка (*например*, антимиР) представляет собой нуклеотидную последовательность, нацеленную на hsa-miR-204, *например*, has-miR-204-5p. has-miR-204-5p представлен в ТАБЛИЦЕ 1 как UCCCCUUGUCAUCCUAUGCCU (SEQ ID NO: 13). В некоторых аспектах полезная нагрузка (*например*, антимиР) представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую, состоящую по существу из или состоящую из AGGCAUAGGAUGACAAGGGAA (SEQ ID NO: 15), где U в качестве варианта может быть представлен T. В некоторых аспектах полезная нагрузка (*например*, антимиР) представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую, состоящую

по существу из или состоящую из AGGCAUAGGAUGACAAAGGGAA (SEQ ID NO: 15), где U в качестве варианта может быть представлен T, и при этом нуклеотидная последовательность имеет одно, два, три или четыре несоответствия. В некоторых аспектах полезная нагрузка (*например*, антими́р) представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую, состоящую по существу из или состоящую из AGGCAUAGGAUGACAAAGGGAA (SEQ ID NO: 15), где U в качестве варианта может быть представлен T, и при этом нуклеотидная последовательность имеет одно или два несоответствия. В других аспектах полезная нагрузка (*например*, антими́р) представляет собой нуклеотидную последовательность, нацеленную на затравочную последовательность has-miR-204-5p (UCCCUUU; SEQ ID NO: 21). В некоторых аспектах полезная нагрузка (*например*, антими́р) представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую AAAGGGA (SEQ ID NO: 22) (комплементарная цепь затравки), где U в качестве варианта может быть представлен T, и при этом нуклеотидная последовательность имеет длину от 10 нуклеотидов до 30 нуклеотидов (*например*, от 10 до 25, от 10 до 24, от 10 до 23, от 10 до 22, от 10 до 21, от 10 до 20, от 10 до 19 или от 10 до 18). В некоторых аспектах полезная нагрузка (*например*, антими́р) представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую AAAGGGA (SEQ ID NO: 22) (комплементарная цепь затравки), в которой нуклеотидная последовательность содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеиновых кислот на 5'-конце комплементарной цепи затравочной последовательности и/или одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеиновых кислот на 3'-конце комплементарной цепи затравочной последовательности.

i. Химически модифицированные полинуклеотиды

[0294] В некоторых аспектах полинуклеотид настоящего изобретения (*например*, антими́р, *например*, антими́р miR485) содержит по меньшей мере один химически модифицированный нуклеозид и/или нуклеотид. В случаях, когда полинуклеотиды настоящего изобретения химически модифицированы, полинуклеотиды могут называться «модифицированными полинуклеотидами».

[0295] «Нуклеозид» относится к соединению, содержащему молекулу сахара (*например*, пентозы или рибозы) или его производного в комбинации с органическим основанием (*например*, пурином или пиримидином) или его производным (также именуемом в настоящем документе как «нуклеотидное основание»).

[0296] «Нуклеотид» относится к нуклеозиду, обладающему фосфатной группой. Модифицированные нуклеотиды могут быть синтезированы любым приемлемым

способом, например, химическим, ферментативным или рекомбинантным, для включения одного или более модифицированных или неприродных нуклеозидов.

[0297] Полинуклеотиды могут содержать область или области связанных нуклеозидов. Такие области могут обладать неустойчивыми связями с остовом. Эти связи могут быть представлены стандартными фосфодисложноэфирными связями, при этом полинуклеотиды будут содержать области с нуклеотидами.

[0298] Модифицированные полинуклеотиды, раскрытые в настоящем документе, могут содержать различные модификации. В некоторых аспектах модифицированные полинуклеотиды содержат одну, две или более (необязательно разных) нуклеозидных или нуклеотидных модификаций. В некоторых аспектах модифицированный полинуклеотид по сравнению с немодифицированным полинуклеотидом может демонстрировать одно или несколько желательных свойств, *например*, улучшенную термическую или химическую стабильность, сниженную иммуногенность, сниженную деградацию, повышенное связывание с целевой микроРНК, сниженное неспецифическое связывание с другими микроРНК или другими молекулами.

[0299] В некоторых аспектах полинуклеотид настоящего изобретения является химически модифицированным. В контексте настоящего документа термины «химическая модификация» или, в соответствующих случаях, «химически модифицированный» при применении их в отношении полинуклеотида обозначают модификацию одного или более из положения, структуры, процента или совокупности аденозина (A), гуанозина (G), уридина (U), тимидина (T) или цитидина (C), рибо- или дезоксирибонуклеозидов, в том числе, помимо прочего, их нуклеотидного основания, сахара, остова или любой их комбинации.

[0300] В некоторых аспектах полинуклеотид настоящего изобретения (*например*, антимири) может иметь равномерную химическую модификацию всех или любого из нуклеозидов одного типа, или совокупность модификаций, полученных нисходящим титрованием одной и той же исходной модификации во всех или любом из нуклеозидов одного типа, или измеренный процент химической модификации всех или любого из нуклеозидов одного типа, но со случайным включением. В другом аспекте, полинуклеотид настоящего изобретения (*например*, антимири) может иметь равномерную химическую модификацию двух, трех или четырех нуклеозидов одного типа во всем полинуклеотиде (*например*, все уридины и/или все цитидины и т. д. модифицированы одинаково).

[0301] Спаривание модифицированных нуклеотидных оснований охватывает не только стандартные пары оснований аденин-тимин, аденин-урацил или гуанин-цитозин, но и пары оснований, образованные между нуклеотидами и/или модифицированными нуклеотидами,

содержащими нестандартные или модифицированные основания, в которых расположение доноров водородных связей и акцепторов водородных связей создает возможность образования водородной связи между нестандартным основанием и стандартным основанием или между двумя комплементарными нестандартными основаниями. Одним из примеров подобного спаривания нестандартных оснований является спаривание модифицированного нуклеотидного основания инозина с аденином, цитозином или урацилом. Любая комбинация из основания/сахара или линкера может быть включена в полинуклеотиды настоящего изобретения.

[0302] Опытный специалист понимает, что, если не указано иное, то полинуклеотидные последовательности, представленные в настоящей заявке, будут содержать «Т» в репрезентативной последовательности ДНК, однако если последовательность представляет собой РНК, то «Т» будут заменены на «U». Например, ТД настоящего изобретения могут вводиться в виде РНК, ДНК или гибридных молекул, содержащих молекулы как РНК, так и ДНК.

[0303] В некоторых аспектах полинуклеотид (*например*, антимир, *например*, антимир miR485) включает в себя комбинацию по меньшей мере двух (*например*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) модифицированных нуклеотидных оснований.

[0304] В некоторых аспектах нуклеотидные основания, сахар, связи остова или любая их комбинация в полинуклеотиде (*например*, антимире, *например*, антимире miR485) модифицированы на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или 100%.

1. Модификации оснований

[0305] В некоторых аспектах химическая модификация имеется в нуклеотидных основаниях в полинуклеотиде настоящего изобретения (*например*, антимире, *например*, антимире miR485). В некоторых аспектах по меньшей мере один химически модифицированный нуклеозид представляет собой модифицированный уридин (*например*, псевдоуридин (ψ), 2-тиоуридин (s2U), 1-метилпсевдоуридин (m1 ψ), 1-этилпсевдоуридин (e1 ψ) или 5-метоксиуридин (mo5U)), модифицированный цитозин (*например*, 5-

метилцитидин (m5C)), модифицированный аденозин (например, 1-метиладенозин (m1A), N6-метиладенозин (m6A) или 2-метиладенин (m2A)), модифицированный гуанозин (например, 7-метилгуанозин (m7G) или 1-метилгуанозин (m1G)) или их комбинацию.

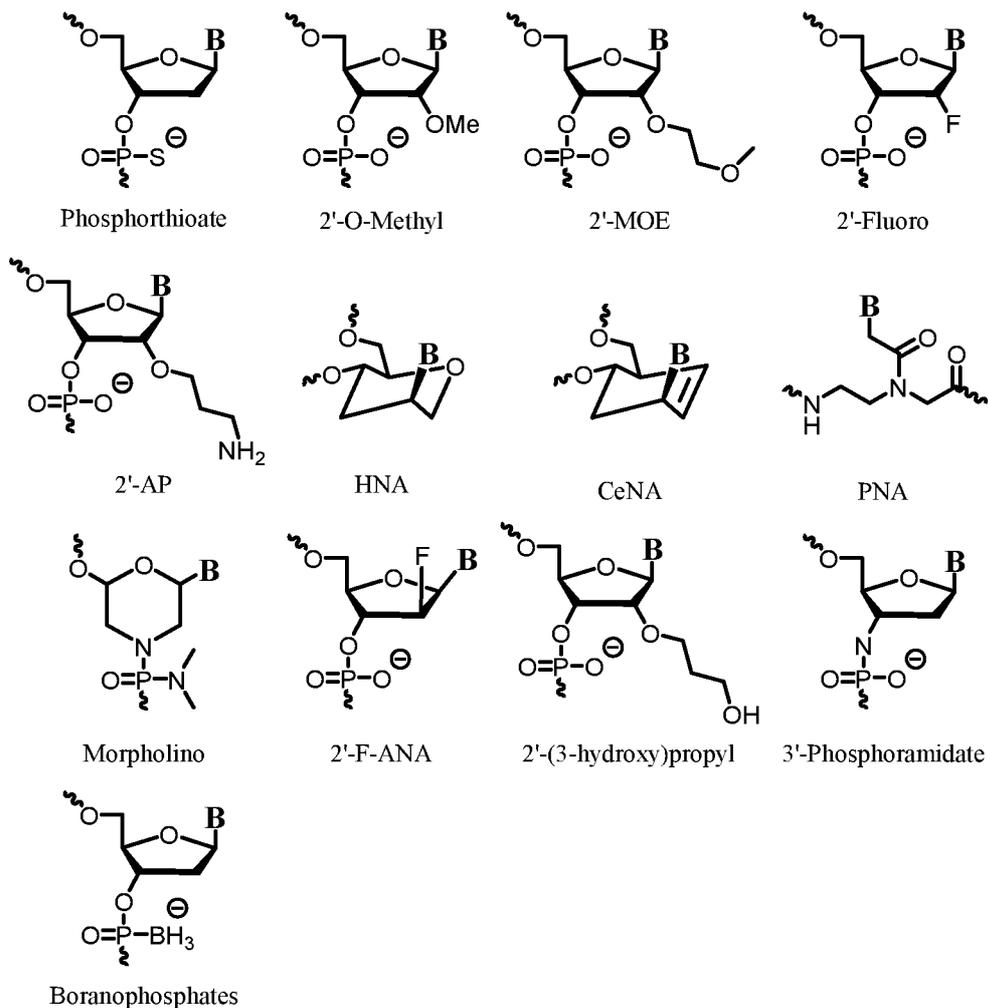
[0306] В некоторых аспектах полинуклеотид настоящего изобретения (например, антимир, например, антимир miR485) является равномерно модифицированным (например, полностью модифицированным, модифицированным во всей последовательности) для конкретной модификации. Например, полинуклеотид может быть равномерно модифицирован с модификацией одного типа основания, например, 5-метилцитидина (m5C), то есть все остатки цитозина в полинуклеотидной последовательности заменены на 5-метилцитидин (m5C). Аналогично, полинуклеотид может быть равномерно модифицирован в отношении любого типа нуклеозидного остатка, присутствующего в последовательности, путем замены на модифицированный нуклеозид, такой как любой из описанных выше.

[0307] В некоторых аспектах полинуклеотид настоящего изобретения (например, антимир, например, антимир miR485) включает в себя комбинацию по меньшей мере двух (например, 2, 3, 4 или более) модифицированных нуклеотидных оснований. В некоторых аспектах, по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или 100% типа нуклеотидных оснований в полинуклеотиде настоящего изобретения (например, Антимире, например, антимире miR485) являются модифицированными нуклеотидными основаниями.

2. Модификации остова

[0308] В некоторых аспектах полезная нагрузка может содержать «полинуклеотид настоящего изобретения» (например, содержащий антимир, например, антимир miR485), в котором полинуклеотид включает в себя любую полезную модификацию связей между нуклеозидами. Такие связи, в том числе модификации остова, являющиеся полезными в композиции настоящего изобретения, включают в себя, помимо прочего, следующие: 3'-алкиленфосфонаты, 3'-аминофосфорамидат, алкенсодержащие остовы, аминоалкилфосфорамидаты, сложные аминоалкилфосфотриэфиры, боранофосфаты, -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂-NH-CH₂-, хиральные фосфонаты,

хиральные фосфотиоаты, формацетильные и тиоформацетильные остовы, метиленовые (метиляминовые), метиленформацетильные и тиоформацетильные остовы, метилениминовые и метиленигидразиновые остовы, морфолиновые связи, $-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$, олигонуклеозиды с гетероатомной межнуклеозидной связью, фосфинаты, фосфорамидаты, фосфородитиоаты, фосфотиоатные межнуклеозидные связи, фосфотиоаты, сложные фосфотриэфиры, ПНК, силоксановые остовы, сульфаматные остовы, сульфоксидные и сульфоновые остовы, сульфонатные и сульфонамидные остовы, тиоалкилфосфонаты, сложные тиоалкилфосфотриэфиры и тионофосфорамидаты.



[0309] В некоторых аспектах присутствие раскрытой выше связи остова повышает стабильность (*например*, термическую стабильность) и/или устойчивость к деградации (*например*, ферментативной деградации) полинуклеотида настоящего изобретения (*например*, антимира, *например*, антимира miR485). В некоторых аспектах стабильность и/или устойчивость к деградации увеличивается в модифицированном полинуклеотиде на по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по

меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 100% по сравнению с соответствующим полинуклеотидом без модификации (эталонный или контрольный полинуклеотид).

[0310] В некоторых аспектах по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или 100% связей остова в полинуклеотиде настоящего изобретения (*например*, антимири, *например*, антимири miR485) являются модифицированными (*например*, все они фосфоротиоатные).

[0311] В некоторых аспектах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 связь остова в полинуклеотиде настоящего изобретения (*например*, антимири, *например*, антимири miR485) является модифицированной (*например*, фосфоротиоатной).

[0312] В некоторых аспектах остов содержит связи, выбранные из группы, состоящей из фосфодисложноэфирной связи, фосфотрисложноэфирной связи, метилфосфонатной связи, фосфорамидатной связи, фосфоротиоатной связи и их комбинаций.

3. Модификации сахара

[0313] Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды, включаемые в полинуклеотид настоящего изобретения (*например*, антимири, *например*, антимири miR485), могут иметь модифицированный сахар нуклеиновой кислоты. Таким образом, в некоторых аспектах полезная нагрузка содержит нуклеиновую кислоту, в которой нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере один аналог нуклеозида (*например*, нуклеозид с модифицированным сахаром).

[0314] В некоторых аспектах модификация сахара повышает аффинность связывания полинуклеотида с его целевой миРНК. Включение в полинуклеотид аналогов нуклеотидов, усиливающих аффинность, таких как LNA или 2'-замещенные сахара, может позволить уменьшить длину полинуклеотида, а также снизить верхний предел размера полинуклеотида до начала неспецифического или аберрантного связывания.

[0315] В некоторых аспектах по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или 100% нуклеотидов в полинуклеотиде настоящего изобретения (*например*, антимиере, *например*, антимиере miR485) содержат модифицированные сахара (*например*, LNA).

[0316] В некоторых аспектах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 молекулы нуклеотида в полинуклеотиде настоящего изобретения (*например*, антимиере, *например*, антимиере miR485) имеют модифицированные сахара (*например*, LNA).

[0317] Как правило, РНК включает в себя рибозную сахарную группу, которая представляет собой 5-членное кольцо с кислородом. Примерные, не ограничивающие модификации нуклеотидов включают в себя замену кислорода в рибозе (*например*, на S, Se или алкилен, такой как метилен или этилен); добавление двойной связи (*например*, замена рибозы на циклопентенил или циклогексенил); сужение кольца рибозы (*например*, для образования 4-членного кольца циклобутана или оксетана); расширение кольца рибозы (*например*, для образования 6- или 7-членного кольца с дополнительным углеродом или гетероатомом, как в случае ангидрогекситола, альтритола, маннитола, циклогексанила, циклогексенила и морфолино, который также имеет фосфорамидатный остов); полициклические формы (*например*, трицикло; а также «разблокированные» формы, такие как гликолевая нуклеиновая кислота (GNA) (*например*, R-GNA или S-GNA, в которых рибоза заменена гликолевыми молекулами, присоединенными к фосфодисложноэфирным связям), треозо-нуклеиновая кислота (TNA, в которой рибоза заменена на α -L-треофуранозил-(3'→2')) и пептидная нуклеиновая кислота (PNA, в которой 2-аминоэтилглициновые связи заменяют рибозу и фосфодисложноэфирный остов). Сахарная группа также может содержать один или несколько углеродов, обладающих противоположной стереохимической конфигурацией, чем соответствующий углерод в рибозе. Таким образом, полинуклеотидная молекула может включать в себя нуклеотиды, содержащие, *например*, арабинозу в качестве сахара.

[0318] Гидроксильная группа 2'(ОН) рибозы может быть модифицирована или заменена рядом различных заместителей. Примерные заместители в положении 2' включают в себя,

помимо прочего, Н, гало, необязательно замещенный C₁₋₆-алкил; необязательно замещенный C₁₋₆-алкокси; необязательно замещенный C₆₋₁₀-арилокси; необязательно замещенный C₃₋₈-циклоалкил; необязательно замещенный C₃₋₈-циклоалкокси; необязательно замещенный C₆₋₁₀-арилокси; необязательно замещенный C₆₋₁₀-арил-C₁₋₆-алкокси, необязательно замещенный C₁₋₁₂-(гетероцикл)окси; сахар (*например*, рибозу, пентозу или любой описанный в настоящем документе); полиэтиленгликоль (ПЭГ), -O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OR, где R — Н или необязательно замещенный алкил, а n — целое число от 0 до 20 (*например*, от 0 до 4, от 0 до 8, от 0 до 10, от 0 до 16, от 1 до 4, от 1 до 8, от 1 до 10, от 1 до 16, от 1 до 20, от 2 до 4, от 2 до 8, от 2 до 10, от 2 до 16, от 2 до 20, от 4 до 8, от 4 до 10, от 4 до 16 и от 4 до 20); «закрытые» нуклеиновые кислоты (LNA), в которых 2'-гидроксил соединен C₁₋₆ алкиленовым или C₁₋₆ гетероалкиленовым мостиком с 4'-углеродом того же сахара рибозы, в котором примерные мостики включают в себя метиленовые, пропиленовые, эфирные, аминовые мостики, аминоалкил, аминоалкокси, амино и аминокислоту.

[0319] В некоторых аспектах аналоги нуклеозида, присутствующие в полинуклеотиде настоящего изобретения (*например*, антимира, *например*, антимира miR485), содержат, *например*, молекулы 2'-О-алкил-РНК, молекулы 2'-ОМе-РНК, 2'-О-алкил-SNA, молекулы 2'-амино-ДНК, молекулы 2'-фтор-ДНК, молекулы LNA, молекулы арабинонуклеиновой кислоты (ANA), молекулы 2'-фтор-ANA, молекулы HNA, молекулы INA (интеркалирующая нуклеиновая кислота), молекулы 2'МОЕ или любую их комбинацию. В некоторых аспектах LNA представляет собой, *например*, окси-LNA (такую как бета-D-окси-LNA или альфа-L-окси-LNA), амино-LNA (такую как бета-D-амино-LNA или альфа-L-амино-LNA), тио-LNA (такую как бета-D-тио-LNA или альфа-L-тио-LNA), ENA (такую как бета-D-ENA или альфа-L-ENA) или любую их комбинацию.

[0320] В некоторых аспектах аналоги нуклеозида, присутствующие в полинуклеотиде настоящего изобретения, содержат закрытую нуклеиновую кислоту (LNA); 2'-О-алкил-РНК; 2'-амино-ДНК; 2'-фтор-ДНК; арабинонуклеиновую кислоту (ANA); 2'-фтор-ANA, гекситолнуклеиновую кислоту (HNA), интеркалирующую нуклеиновую кислоту (INA), затрудненный этилом нуклеозид (сEt), 2'-О-метилнуклеиновую кислоту (2'-ОМе), 2'-О-метоксиэтилнуклеиновую кислоту (2'-МОЕ) или любую их комбинацию.

[0321] В некоторых аспектах полинуклеотид настоящего изобретения (*например*, антимира, *например*, антимира miR485) может содержать как аналоги нуклеотидов модифицированной РНК (*например*, LNA), так и молекулы ДНК. В некоторых аспектах полинуклеотид настоящего изобретения представляет собой гЭПмер. См., *например*, патенты США № 8,404,649; 8,580,756; 8,163,708; 9,034,837, все из которых включены в настоящий

документ в полном объеме посредством ссылки. В некоторых аспектах полинуклеотид настоящего изобретения представляет собой микромир. См. публикацию заявки на патент США публикация патента США № US20180201928, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

IV. Мицеллы

[0322] Согласно настоящему изобретению также предложены мицеллы, содержащие молекулы катионного носителя настоящего изобретения. Мицеллы настоящего изобретения содержат молекулу катионных носителей настоящего изобретения и отрицательно заряженная полезная нагрузка, причем отрицательно заряженная полезная нагрузка и молекула катионного носителя ассоциированы друг с другом. В некоторых аспектах ассоциация содержит ковалентную связь (см. ФИГ. 1). В других аспектах ассоциация не содержит ковалентную связь (см. ФИГ. 1). В других аспектах ассоциация осуществляется через ионную связь, *т. е.* посредством электростатического взаимодействия. В некоторых аспектах отрицательно заряженная полезная нагрузка (*например*, ДНК и/или РНК) не конъюгирована с молекулой катионного носителя с помощью ковалентной связи, и/или отрицательно заряженная полезная нагрузка взаимодействует с фрагментом катионного носителя молекулы катионного носителя только посредством ионного взаимодействия.

[0323] В некоторых аспектах молекулы катионного носителя и мицеллы настоящего изобретения защищают полезную нагрузку (*например*, ДНК и/или РНК) от деградации (*например*, ДНазой и/или РНазой). Во-первых, молекула катионного носителя может защищать полезную нагрузку с помощью электростатического взаимодействия. Во-вторых, мицелла удерживает полезную нагрузку в сердцевине мицеллы, *т. е.* вне досягаемости ДНаз и/или РНаз. В некоторых аспектах защита полезной нагрузки от циркулирующих ферментов (*например*, нуклеаз) может увеличить время полужизни отрицательно заряженной полезной нагрузки (*например*, ДНК и/или РНК) по сравнению со свободной полезной нагрузкой. В некоторых аспектах инкапсуляция полезной нагрузки в мицеллы настоящего изобретения может увеличить время полужизни полезной нагрузки в плазме крови в по меньшей мере около 2 раз, по меньшей мере около 3 раз, по меньшей мере около 4 раз, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 6 раз, по меньшей мере около 7 раз, по меньшей мере около 8 раз, по меньшей мере около 9 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 11 раз, по меньшей мере около 12 раз, по меньшей мере около 13 раз, по меньшей мере около 14 раз, по меньшей мере около 15 раз, по меньшей мере около 16 раз, по меньшей мере около 17 раз, по меньшей мере около 18 раз, по меньшей мере около 19 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 21 раз, по меньшей мере около 22 раз,

по меньшей мере около 23 раз, по меньшей мере около 24 раз, по меньшей мере около 25 раз, по меньшей мере около 26 раз, по меньшей мере около 27 раз, по меньшей мере около 28 раз, по меньшей мере около 29 раз или по меньшей мере около 30 раз по сравнению со свободной полезной нагрузкой.

[0324] В некоторых аспектах положительный заряд молекулы катионного носителя и, в частности, заряд фрагмента катионного носителя достаточен для образования мицеллы при смешивании с отрицательно заряженной полезной нагрузкой (*например*, нуклеиновой кислотой) в растворе, в котором общее соотношение ионов между молекулой катионного носителя, в частности, ее фрагмента катионного носителя, и отрицательно заряженной полезной нагрузки (*например*, нуклеиновой кислотой) составляет около 1:1. В некоторых аспектах общее соотношение ионов между молекулой катионного носителя, в частности, ее фрагментом катионного носителя, и отрицательно заряженной полезной нагрузкой (*например*, нуклеиновой кислотой) составляет более 1:1, т. е. применяют избыток молекул катионного носителя. В некоторых аспектах общее соотношение ионов между молекулой катионного носителя, в частности, ее фрагментом катионного носителя, и отрицательно заряженной полезной нагрузкой (*например*, нуклеиновой кислотой) составляет менее 1:1, т. е. применяют избыток отрицательно заряженной полезной нагрузки.

[0325] В некоторых аспектах при комбинации с подходящим буфером (*например*, ФСБ) комплексы, сформированные молекулами катионного носителя настоящего изобретения и полезной нагрузкой (*например*, антисмысловыми олигонуклеотидами, такими как антимир), самоорганизуются, образуя мицеллы. См. **ФИГ. 5**.

[0326] Мицелла представляет собой водорастворимую или коллоидную структуру или агрегат, состоящую из одной или более амфифильных молекул. К амфифильным относят молекулы, содержащие по меньшей мере один гидрофильный (полярный) фрагмент и по меньшей мере один гидрофобный (неполярный) фрагмент. «Классические мицеллы» имеют одну, центрально расположенную и преимущественно гидрофобную зону или «сердцевину», окруженную гидрофильным слоем или «оболочкой». В водном растворе мицелла образует агрегат, в котором гидрофильные области «головки» амфифильной молекулы контактируют с окружающим растворителем, изолируя гидрофобные однохвостовые области амфифильной молекулы в сердцевине мицеллы. Мицеллы имеют приблизительно сферическую форму. Возможны и другие формы, *например*, эллипсоиды, цилиндры, стержневидные структуры или полимерсомы. Форма и размер, а значит и емкость загрузки мицелл настоящего изобретения можно модифицировать, изменяя соотношение между водорастворимым биополимером (*например*, ПЭГ) и катионным носителем (*например*, полилизин). В зависимости от соотношения молекулы носителя

могут организоваться в виде мелких частиц, мелких мицелл, мицелл, стержневидных структур или полимерсом (см. **ФИГ. 6**). Таким образом, термин «мицеллы настоящего изобретения» охватывает не только классические мицеллы, но также и мелкие частицы, мелкие мицеллы, мицеллы, стержневидные структуры или полимерсомы.

[0327] Мицеллы настоящего изобретения могут состоять либо из одного мономолекулярного полимера, содержащего гидрофобные и гидрофильные фрагменты, либо из агрегатной смеси, содержащей множество амфифильных (т. е. поверхностно-активных) молекул, сформированных при или выше критической концентрации мицелл (СМС), в полярном (т. е. водном) растворе. Мицелла самостоятельно собирается из одной или более амфифильных молекул, причем молекулы ориентированы таким образом, чтобы образовать преимущественно гидрофобную внутреннюю сердцевину и преимущественно гидрофильную внешнюю оболочку.

[0328] Размер мицелл настоящего изобретения может варьироваться от 5 до около 2 000 нанометров. В некоторых аспектах диаметр мицеллы составляет от около 10 нм до около 200 нм. В некоторых аспектах диаметр мицеллы составляет от около 1 нм до около 100 нм, от около 10 нм до около 100 нм, от около 10 нм до около 90 нм, от около 10 нм до около 80 нм, от около 10 нм до около 70 нм, от около 20 нм до около 100 нм, от около 20 нм до около 90 нм, от около 20 нм до около 80 нм, от около 20 нм до около 70 нм, от около 30 нм до около 100 нм, от около 30 нм до около 90 нм, от около 30 нм до около 80 нм, от около 30 нм до около 70 нм, от около 40 нм до около 100 нм, от около 40 нм до около 90 нм, от около 40 нм до около 80 нм или от около 40 нм до около 70 нм. В некоторых аспектах диаметр мицелл настоящего изобретения составляет от около 30 нм до около 60 нм. В некоторых аспектах диаметр мицелл настоящего изобретения составляет от около 15 нм до около 90 нм. В некоторых аспектах диаметр мицелл настоящего изобретения составляет от около 15 нм до около 80 нм. В некоторых аспектах диаметр мицелл настоящего изобретения составляет от около 15 нм до около 70 нм. В некоторых аспектах диаметр мицелл настоящего изобретения составляет от около 15 нм до около 60 нм. В некоторых аспектах диаметр мицелл настоящего изобретения составляет от около 15 нм до около 50 нм. В некоторых аспектах диаметр мицелл настоящего изобретения составляет от около 20 нм до около 60 нм. В некоторых аспектах диаметр мицелл настоящего изобретения составляет от около 20 нм до около 50 нм. В некоторых аспектах диаметр мицелл настоящего изобретения составляет от около 20 нм до около 40 нм. В некоторых аспектах диаметр мицелл настоящего изобретения составляет от около 25 нм до около 35 нм. В некоторых аспектах диаметр мицелл настоящего изобретения составляет около 32 нм. Примерное распределение размеров мицелл показано на **ФИГ. 9**.

[0329] В некоторых аспектах мицелла может содержать один тип антимира, *например*, антимир miR485. В других аспектах мицелла может содержать более одного типа антимира, *например*, (i) антимир с различной архитектурой, нацеленный на одну и ту же миРНК; (ii) антимир с различной архитектурой, нацеленный на разные миРНК; (iii) антимир с одинаковой архитектурой, нацеленный на одну и ту же миРНК; или (iv) их комбинации.

[0330] В некоторых аспектах мицеллы настоящего изобретения содержат один тип молекулы катионного носителя. В других аспектах мицеллы настоящего изобретения содержат более одного типа молекулы катионного носителя (*например*, нацеленного на различные рецепторы на поверхности клетки-мишени). В некоторых аспектах мицеллы настоящего изобретения могут содержать молекулы катионных носителей с различными нацеливающими фрагментами, различными фрагментами катионных носителей (*например*, для размещения различных полезных нагрузок) и/или различными фрагментами адъюванта.

[0331] Для образования мицеллы с полезной нагрузкой можно комбинировать различные типы молекул катионных или анионных носителей. Например, для нацеливания мицеллы на гематоэнцефалический барьер, мицелла настоящего изобретения может содержать молекулу катионного (или анионного) носителя, связанную с нацеливающим фрагментом, и молекулу катионного (или анионного) носителя, не связанную с нацеливающим фрагментом. В некоторых аспектах мицелла содержит от около 50 до около 200 молекул катионного или анионного носителя. В других аспектах мицелла содержит от около 50 до около 150, от около 50 до около 140, от около 50 до около 130, от около 50 до около 120, от около 50 до около 110 или от около 50 до около 100 молекул катионного или анионного носителя. В некоторых аспектах мицелла содержит от около 60 до около 200 молекул катионного или анионного носителя. В других аспектах мицелла содержит от около 60 до около 150, от около 60 до около 140, от около 60 до около 130, от около 60 до около 120, от около 60 до около 110, от около 60 до около 100, от около 60 до около 90, от около 60 до около 80 или от около 60 до около 70 молекул катионного или анионного носителя. В некоторых аспектах мицелла содержит от около 70 до около 200 молекул катионного или анионного носителя. В других аспектах мицелла содержит от около 70 до около 150, от около 70 до около 140, от около 70 до около 130, от около 70 до около 120, от около 70 до около 110, от около 70 до около 100, от около 70 до около 90 или от около 70 до около 80 молекул катионного или анионного носителя. В некоторых аспектах мицелла содержит от около 80 до около 200 молекул катионного или анионного носителя. В других аспектах мицелла содержит от около 80 до около 150, от около 80 до около 140, от около 80 до около 130, от около 80 до около 120, от около 80 до около 110, от около 80 до около 100 или от

около 80 до около 90 молекул катионного или анионного носителя. В некоторых аспектах мицелла содержит от около 90 до около 200 молекул катионного или анионного носителя. В других аспектах мицелла содержит от около 90 до около 150, от около 90 до около 140, от около 90 до около 130, от около 90 до около 120, от около 90 до около 110 или от около 90 до около 100 молекул катионного или анионного носителя. В некоторых аспектах мицелла содержит от около 100 до около 200 молекул катионного или анионного носителя. В других аспектах мицелла содержит от около 100 до около 150, от около 100 до около 140, от около 100 до около 130, от около 100 до около 120, от около 100 до около 110 или от около 100 до около 100 молекул катионного или анионного носителя.

[0332] Настоящее изобретение также включает в себя мицеллу, содержащую (i) нуклеотидную последовательность (например, олигонуклеотид длиной около 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов) и (ii) молекулу катионного носителя, описанную в настоящем документе. В некоторых аспектах изобретение относится к мицелле, содержащей (i) нуклеотидную последовательность, *например*, миРНК или ингибитор миРНК (например, олигонуклеотид длиной около 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов), и (ii) от около 80 до около 120 (*например*, от около 85 до около 115, от около 90 до около 110, от около 95 до около 105) молекул катионного носителя, описанных в настоящем документе, *например*, ТМ-WP-СС-АМ, WP-СС-АМ или их комбинации (см. **ФИГ. 3**). В некоторых аспектах мицелла содержит (i) нуклеотидную последовательность, *например*, миРНК или ингибитор миРНК (например, олигонуклеотид длиной около 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов), и (ii) от около 80 до около 120 (*например*, около 80, около 85, около 90, около 95, около 100, около 105 или около 110) молекул катионного носителя, описанных в настоящем документе, *например*, в качестве варианта ТМ-WP-СС-АМ (см. **ФИГ. 3**). В некоторых аспектах мицелла содержит (i) нуклеотидную последовательность, *например*, миРНК или ингибитор миРНК (например, олигонуклеотид длиной около 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов), и (ii) от около 90 до около 110, *например*, около 100, молекул катионного носителя, из которых (a) от около 45 до около 55, *например*, около 50 молекул катионного носителя, содержат ТМ-WP-СС-АМ, и (b) от около 45 до около 55, *например*, около 50 молекул катионного носителя, содержат WP-СС-СМ, где ТМ представляет собой фенилаланин, WP — (ПЭГ)₅₀₀₀, а СС — от около 40 до около 50 молекул лизина, *например*, около 45, около 46, около 47, около 48, около 49 или около 50 молекул лизина, и при этом каждая из от около 5 до около 15 молекул лизина, около 10 молекул лизина соединена с витамином В3 (никотинамидом).

[0333] В некоторых аспектах мицелла настоящего изобретения содержит (i) нуклеотидную последовательность, *например*, ингибитор miR485-3p, *например*, 5'-

AGAGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO: 18), и (ii) около 100 молекул катионного носителя, из которых (a) около 50 молекул катионного носителя содержат ТМ-WP-СС-АМ, а (b) около 50 других молекул катионного носителя содержат WP-СС-СМ, причем ТМ представляет собой фенилаланин, WP — (ПЭГ)₅₀₀₀, а СС — около 47 молекул лизина, и при этом каждая из около 10 молекул лизина соединена с витамином В3 (никотинамидом).

[0334] В некоторых аспектах мицелла может содержать одну полезную нагрузку (например, один олигонуклеотид, например, антимири). В других аспектах мицелла может содержать более одной полезной нагрузки (например, множество олигонуклеотидов, например, множество антимириров).

V. Способы производства

[0335] Согласно настоящему изобретению также предложены способы получения молекул катионного носителя и мицелл настоящего изобретения. В целом, согласно настоящему изобретению предложен способ приготовления молекулы катионного носителя настоящего изобретения, включающий в себя синтез молекулы катионного носителя, как описано, например, в разделе «Примеры». В контексте настоящего документа термин «синтез» обозначает сборку молекулы катионного носителя с применением способов, известных в данной области. Например, белковые компоненты (*например*, антительный нацеливающий фрагмент) могут быть получены рекомбинантным методом и впоследствии конъюгированы с другими компонентами молекул катионного носителя. В некоторых аспектах, каждый из компонентов молекулы катионного носителя может быть получен с помощью способов, известных в данной области, *например*, производством рекомбинантного белка, твердофазным синтезом пептида или синтезом нуклеиновой кислоты, химическим синтезом, ферментативным синтезом или любой их комбинацией, после чего полученный компонент может быть конъюгирован с помощью химических и/или ферментативных способов, известных в данной области.

[0336] Молекулы катионного носителя настоящего изобретения могут быть очищены от загрязняющих веществ. В некоторых аспектах молекула катионного носителя содержит однородную популяцию молекул катионного носителя. Однако в других аспектах молекула катионного носителя может содержать несколько видов компонентов (*например*, некоторые из них содержат нацеливающий фрагмент, а другие — остальные фрагменты, но без нацеливающего фрагмента). В некоторых аспектах производство молекул катионного носителя настоящего изобретения включает в себя лиофилизацию или любую другую форму сухого хранения, подходящую для восстановления. В некоторых аспектах молекулу

катионного носителя в сухой форме получают после комбинации молекул катионного носителя с полезной нагрузкой (например, нуклеиновой кислотой).

[0337] В некоторых аспектах способ получения мицеллы настоящего изобретения включает в себя смешивание молекулы катионного носителя с отрицательно заряженной полезной нагрузкой (*например*, нуклеиновой кислотой, такой как антисмысловой олигонуклеотид, например, антимири) при соотношении ионов 1:1. В некоторых аспектах молекулу катионного носителя и отрицательно заряженную полезную нагрузку комбинируют в растворе. В некоторых аспектах после комбинирования катионного носителя и отрицательно заряженной полезной нагрузки в растворе полученный раствор лиофилизируют или высушивают. В некоторых аспектах комбинирование катионного носителя и отрицательно заряженной полезной нагрузки проводится в сухом виде.

[0338] Как показано на **ФИГ. 6**, отношение числа n мономерных молекул в водорастворимом полимере (А, *например*, ПЭГ) к числу m мономерных молекул (*например*, молекул лизина) в фрагменте катионного носителя (В, *например*, полилизине), где число молекул n или m в каждом случае может достигать 1 000, влияет на размер и форму получаемых мицелл. При соотношении $mB/(nA+mB)$ 0,5 полученные мицеллы являются классическими мицеллами. При соотношении $mB/(nA+mB)$ выше 0,5 полученные мицеллы имеют стержневидную форму или представлены полимерсомами. При соотношении $mB/(nA+mB)$ ниже 0,5 полученные мицеллы представлены мелкими мицеллами или мелкими частицами.

[0339] Мицеллы настоящего изобретения могут быть получены с помощью любого из способов, известных в данной области, например, дезинтеграции с помощью вортекса, экструзии или соникации. Образование мицелл зависит от применения условий, превышающих критическую концентрацию мицелл (ККМ) раствора, содержащего молекулы катионного носителя настоящего изобретения. После достижения определенного значения концентрации поверхностно-активные вещества начинают ассоциироваться и организовываться в более сложные частицы, такие как мицеллы. ККМ раствора, содержащего катионные носители настоящего изобретения, можно определить по любому физическому свойству (*например*, поверхностному натяжению), которое указывает на очевидный переход в ККМ.

[0340] Согласно теории Смита-Эварта, число заключенных в сердцевину частиц, образующих мицеллы выше ККМ, пропорционально концентрации поверхностно-активного вещества (в настоящем изобретении молекулы катионного носителя связаны или ассоциированы с анионной полезной нагрузкой) в степени 0,6. Это обусловлено тем, что

для заданного поверхностно-активного вещества количество образующихся мицелл обычно увеличивается с увеличением концентрации поверхностно-активного вещества.

[0341] В некоторых аспектах мицеллы настоящего изобретения могут быть очищены, *например*, для удаления загрязнений и/или для получения однородной популяции мицелл (*например*, мицелл с одинаковым размером, или мицелл с одинаковой полезной нагрузкой или одинаковым нацеливающим фрагментом).

IV. Фармацевтические композиции

[0342] Согласно настоящему изобретению также предложены фармацевтические композиции, содержащие молекулы катионного носителя и/или мицеллы настоящего изобретения (*т. е.* мицеллы, содержащие молекулы катионного носителя настоящего изобретения), которые подходят для введения субъекту. Как обсуждалось выше, мицеллы настоящего изобретения могут быть однородными (*т. е.* все мицеллы содержат один и тот же тип молекулы катионного носителя, один и тот же нацеливающий фрагмент и одну и ту же полезную нагрузку). Однако в других аспектах мицеллы могут содержать различные нацеливающие фрагменты, различные полезные нагрузки и т.д.

[0343] Фармацевтические композиции обычно содержат молекулу катионного носителя и/или мицеллу настоящего изобретения, а также фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель в форме, подходящей для введения субъекту. Фармацевтически приемлемые эксципиенты или носители частично определяются конкретной композицией для введения, а также конкретным способом введения композиции.

[0344] Существует большое разнообразие подходящих составов фармацевтических композиций, содержащих мицеллы настоящего изобретения (см., *например*, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co, Easton, Pa. 18-е изд. (1990)). Фармацевтические композиции обычно изготавливают стерильными и в полном соответствии со всеми требованиями надлежащей производственной практики (GMP) Управления по контролю за продуктами и лекарствами США. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит одну или более мицелл, описанных в настоящем документе.

[0345] В некоторых аспектах мицеллы, описанные в настоящем документе, вводят совместно с одним или более дополнительными лекарственными средствами в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых аспектах фармацевтическую композицию, содержащую мицеллы, описанные в настоящем документе, вводят до введения дополнительного(ых) лекарственного(ых) средства(средств). В других аспектах фармацевтическую композицию, содержащую мицеллы, описанные в настоящем документе, вводят после введения дополнительного(ых) лекарственного(ых) средства(средств). В дополнительных аспектах фармацевтическую композицию,

содержащую мицеллы, описанные в настоящем документе, вводят одновременно с дополнительным(и) лекарственным(и) средством(ами).

[0346] В некоторых аспектах фармацевтический носитель добавляют после образования мицелл. В других аспектах фармацевтический носитель добавляют до образования мицелл.

[0347] Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы нетоксичны для реципиентов (*например*, животных или людей) в используемых дозах и концентрациях, и включают в себя буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, в том числе аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмоний хлорид; гексаметоний хлорид; бензалконий хлорид, бензетоний хлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол; и *m*-крезол); низкомолекулярные (менее 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, в том числе глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (*например*, Zn-белковые комплексы); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

[0348] Примеры носителей или разбавителей включают в себя, помимо прочего, воду, физиологический раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы и 5% сывороточный альбумин человека. Применение таких сред и соединений для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. За исключением случаев, когда любые традиционные среды или соединения несовместимы с молекулами катионного носителя или мицеллами, раскрытыми в настоящем документе, предполагается их применение в композициях.

[0349] Дополнительные лекарственные средства также могут быть включены в композиции настоящего изобретения. Как правило, фармацевтическую композицию разрабатывают таким образом, чтобы она была совместимой с предполагаемым путем введения. Описанные в настоящем документе мицеллы можно вводить парентеральным, местным, внутривенным, пероральным, подкожным, внутриартериальным, внутрикожным, трансдермальным, ректальным, внутричерепным, внутрибрюшинным, интраназальным, интратуморальным, внутримышечным путями или в виде средств для ингаляции. В некоторых аспектах мицеллы фармацевтической композиции, описанные в настоящем документе, вводят внутривенно, *например*, путем инъекции. Мицеллы, описанные в

настоящем документе, в качестве варианта можно вводить в комбинации с другими лекарственными средствами, которые по меньшей мере частично эффективны для лечения заболевания, расстройства или патологического состояния, для которого предназначены мицеллы, описанные в настоящем документе.

[0350] Растворы или суспензии могут включать в себя следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные соединения, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатные соединения, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и соединения для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Значение pH можно регулировать с помощью кислот или оснований, таких как соляная кислота или гидроксид натрия. Препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или сосуды для нескольких доз из стекла или пластмассы.

[0351] Фармацевтические композиции, подходящие для инъекций, включают стерильные водные растворы (если они водорастворимы) или дисперсии и стерильные порошки. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, Stomphor EL™ (BASF, Парсипини, Нью-Джерси) или фосфатно-солевой буфер (PBS). Композиция обычно является стерильной и жидкой до той степени, до которой существует возможность легкого введения через шприц. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, *например* воду, этанол, полиол (*например* глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, *например* путем применения материалов для покрытия, таких как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ. Предупреждение действия микроорганизмов может быть достигнута посредством различных антибактериальных и противогрибковых соединений, *например* парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тиомерсала и т.п. При необходимости в композицию могут быть добавлены изотонические соединения, *например* сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит и хлорид натрия. Длительное всасывание инъекционных композиций может быть достигнуто путем включения в состав композиции соединения, задерживающего всасывание, *например*, моностеарата алюминия и желатина.

[0352] Фармацевтические композиции настоящего изобретения могут быть стерилизованы с помощью традиционных, хорошо известных способов стерилизации. Водные растворы могут быть упакованы для применения или профильтрованы в асептических условиях и лиофилизированы, при этом лиофилизированный препарат перед введением комбинируют со стерильным водным раствором.

[0353] Стерильные инъекционные растворы можно получить введением описанных в настоящем документе мицелл в эффективном количестве и в соответствующий растворитель с произвольным одним или комбинацией вышеперечисленных ингредиентов. Обычно дисперсии получают введением описанных в настоящем документе мицелл в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и любые другие произвольные ингредиенты. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов способами получения являются вакуумная сушка и сублимационная сушка, которые позволяют получить порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный произвольный ингредиент из предварительно стерильно отфильтрованного раствора. Мицеллы, описанные в настоящем документе, можно вводить в форме инъекции вещества с замедленным всасыванием или препарата для имплантации, который может быть составлен таким образом, чтобы обеспечить устойчивое или пульсирующее высвобождение мицелл, описанных в настоящем документе.

[0354] Системное введение композиций, содержащих описанные в настоящем документе мицеллы, может также осуществляться трансмукозально. Для трансмукозального введения в состав добавляют пенетранты, соответствующие проницаемому барьеру. Такие пенетранты обычно известны в данной области техники, и включают, *например*, вещества для введения через слизистую, детергенты, соли желчных кислот и производные фусидовой кислоты. Трансмуккозальное введение можно выполнить с помощью, *например*, назальных спреев.

[0355] В некоторых аспектах фармацевтическую композицию, содержащую мицеллы, описанные в настоящем документе, вводят внутривенно субъекту, у которого фармацевтическая композиция может улучшить состояние здоровья. В некоторых аспектах композицию вводят в лимфатическую систему, *например*, путем интралимфатической инъекции или внутриузловой инъекции (*см., например*, Senti *et al.*, PNAS 105(46): 17908 (2008)), или путем внутримышечной инъекции, путем подкожного введения, путем интратуморальной инъекции, путем прямой инъекции в тимус или в печень.

[0356] В некоторых аспектах фармацевтическую композицию, содержащую описанные в настоящем документе мицеллы, вводят в виде водной суспензии. В некоторых аспектах фармацевтическую композицию вводят в виде состава, способного сформировать депо

после введения. В некоторых предпочтительных аспектах депо медленно высвобождает описанные в настоящем документе мицеллы в кровотоке или остается в форме депо.

[0357] Как правило, фармацевтически приемлемые композиции имеют высокую степень очистки и не содержат загрязняющих веществ, являются биосовместимыми и нетоксичными, и подходят для введения субъекту. Если вода является составной частью носителя, вода является высокоочищенной и очищенной от контаминантов, *например* эндотоксинов.

[0358] Фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, крахмал, гуммиарабик, фосфат кальция, альгинаты, желатин, силикат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, целлюлозу, воду, сироп, метилцеллюлозу, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния и/или минеральное масло, но не ограничиваясь ими. Фармацевтическая композиция может дополнительно включать в себя смазывающее вещество, смачивающий агент, подсластитель, усилитель вкуса, эмульгатор, суспендирующий агент и/или консервант.

[0359] Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, содержат мицеллы, описанные в настоящем документе, и в качестве варианта фармацевтически активный агент или лекарственное средство. Лекарственное средство может представлять собой биологический агент, низкомолекулярный агент или агент из нуклеиновой кислоты.

[0360] Предложены лекарственные формы, содержащие мицеллы, описанные в настоящем документе. В некоторых аспектах лекарственная форма представляет собой жидкую суспензию для внутривенного введения.

[0361] Раскрытые в настоящем документе мицеллы или фармацевтическая композиция, содержащая мицеллы, могут применяться одновременно с другими лекарственными средствами. В частности, мицеллы или фармацевтические композиции настоящего изобретения можно применять вместе с лекарственными средствами, такими как гормональные лекарственные средства, химиотерапевтические средства, иммунотерапевтические средства, лекарственные средства, ингибирующие действие факторов роста клеток или рецепторов факторов роста клеток и т. п.

VII. Способы лечения и применения

[0362] Согласно настоящему изобретению также предложены способы лечения заболевания или патологического состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий в себя введение мицеллы настоящего изобретения или его комбинации субъекту, *например*, млекопитающему, такому как человек-субъект. В некоторых аспектах согласно настоящему изобретению предложен способ лечения нейродегенеративного

расстройства или злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества мицеллы настоящего изобретения или фармацевтической композиции настоящего изобретения.

[0363] В некоторых аспектах мицеллы настоящего изобретения можно вводить путем внутривенной, внутримышечной, внутриартериальной, интратекальной, внутрикапсульной, внутриглазничной, внутрисердечной, внутрикожной, внутрибрюшинной, транстрахеальной, подкожной, субкутикулярной, внутрисуставной, субкапсульной, субарахноидальной, интраспинальной и интрастеральной инъекции и инфузии.

[0364] В некоторых аспектах мицеллы настоящего изобретения можно применять одновременно с другими лекарственными средствами или лечением, подходящим для лечения заболеваний и патологических состояний, раскрытых в настоящем документе.

[0365] Согласно настоящему изобретению также предложены способы инкапсуляции полезной нагрузки для доставки, включающие в себя встраивание полезной нагрузки, *например*, анионной полезной нагрузки, такой как нуклеиновая кислота (*например*, антимира), в мицеллу настоящего изобретения.

[0366] Согласно настоящему изобретению также предложены способы повышения устойчивости полезной нагрузки к деградации (*например*, нуклеаза-опосредованной деградации), включающие в себя встраивание полезной нагрузки, *например*, анионной полезной нагрузки, такой как нуклеиновая кислота (*например*, антимира), в мицеллу настоящего изобретения.

[0367] В некоторых аспектах согласно настоящему изобретению предложены способы проникновения через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), включающие в себя введение раскрытых в настоящем документе мицелл, *например*, мицелл, содержащих триптофан и/или тирозин в качестве нацеливающего фрагмента. Как показано на **ФИГ. 7**, мицелла настоящего изобретения, нагруженная анти-миРНК, может быть нацелена на рецептор ГЭБ, *например*, LAT1, как описано выше. После того, как мицелла перемещается через ГЭБ с помощью опосредуемого рецепторами транцитоза и поглощается клетками головного мозга (*например*, нейронами, астроцитами или микроглией), полезная нагрузка (*например*, антимира) высвобождается и взаимодействует с внутриклеточной мишенью (*например*, антимира может связываться с целевой микроРНК и запускать деградацию, опосредованную РНазой Н).

[0368] В некоторых аспектах инкапсуляция полезной нагрузки в мицелле настоящего изобретения может повысить устойчивость полезной нагрузки к деградации на по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей

мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 100% по сравнению со свободной полезной нагрузкой (*т. е.* не в составе мицеллы, *например*, в свободном виде в растворе).

[0369] В некоторых аспектах инкапсуляция полезной нагрузки в мицелле настоящего изобретения может повысить устойчивость полезной нагрузки к деградации в по меньшей мере около 2 раз, по меньшей мере около 3 раз, по меньшей мере около 4 раз, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 6 раз, по меньшей мере около 7 раз, по меньшей мере около 8 раз, по меньшей мере около 9 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 11 раз, по меньшей мере около 12 раз, по меньшей мере около 13 раз, по меньшей мере около 14 раз, по меньшей мере около 15 раз, по меньшей мере около 16 раз, по меньшей мере около 17 раз, по меньшей мере около 18 раз, по меньшей мере около 19 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 21 раз, по меньшей мере около 22 раз, по меньшей мере около 23 раз, по меньшей мере около 24 раз, по меньшей мере около 25 раз, по меньшей мере около 26 раз, по меньшей мере около 27 раз, по меньшей мере около 28 раз, по меньшей мере около 29 раз или по меньшей мере около 30 раз по сравнению со свободной полезной нагрузкой.

[0370] Согласно настоящему изобретению также предложены способы увеличения стабильности полезной нагрузки во время введения (*например*, при нахождении его в кровотоке субъекта), включающие в себя включение полезной нагрузки, *например*, анионной полезной нагрузки, такой как нуклеиновая кислота (*например*, антимира), в мицеллу настоящего изобретения.

[0371] В некоторых аспектах инкапсуляция полезной нагрузки в мицелле настоящего изобретения может увеличить стабильность (*например*, повысить устойчивость к нуклеазам) полезной нагрузки на по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 100% по сравнению со свободной полезной нагрузкой.

[0372] В некоторых аспектах инкапсуляция полезной нагрузки в мицелле настоящего изобретения может увеличить стабильность (например, повысить устойчивость к нуклеазам) полезной нагрузки в по меньшей мере около 2 раз, по меньшей мере около 3 раз, по меньшей мере около 4 раз, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 6 раз, по меньшей мере около 7 раз, по меньшей мере около 8 раз, по меньшей мере около 9 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 11 раз, по меньшей мере около 12 раз, по меньшей мере около 13 раз, по меньшей мере около 14 раз, по меньшей мере около 15 раз, по меньшей мере около 16 раз, по меньшей мере около 17 раз, по меньшей мере около 18 раз, по меньшей мере около 19 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 21 раз, по меньшей мере около 22 раз, по меньшей мере около 23 раз, по меньшей мере около 24 раз, по меньшей мере около 25 раз, по меньшей мере около 26 раз, по меньшей мере около 27 раз, по меньшей мере около 28 раз, по меньшей мере около 29 раз или по меньшей мере около 30 раз по сравнению со свободной полезной нагрузкой.

[0373] Согласно настоящему изобретению также предложены способы увеличения времени полужизни полезной нагрузки в плазме крови, включающие в себя встраивание полезной нагрузки, *например*, анионной полезной нагрузки, такой как нуклеиновая кислота (*например*, антимира), в мицеллу настоящего изобретения.

[0374] В некоторых аспектах инкапсуляция полезной нагрузки в мицелле настоящего изобретения может увеличить время полужизни полезной нагрузки в плазме крови на по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 200%, по меньшей мере около 300%, по меньшей мере около 400%, по меньшей мере около 500%, по меньшей мере около 600%, по меньшей мере около 700%, по меньшей мере около 800%, по меньшей мере около 900%, по меньшей мере около 1 000%, по меньшей мере около 1 100%, по меньшей мере около 1 200%, по меньшей мере около 1 300%, по меньшей мере около 1 400%, по меньшей мере около 1 500%, по меньшей мере около 1 600%, по меньшей мере около 1 700%, по меньшей мере около 1 800%, по меньшей мере около 1 900% или по меньшей мере около 2 000% по сравнению со свободной полезной нагрузкой.

[0375] В некоторых аспектах инкапсуляция полезной нагрузки в мицеллы настоящего изобретения может увеличить время полужизни полезной нагрузки в плазме крови в по

меньшей мере около 2 раз, по меньшей мере около 3 раз, по меньшей мере около 4 раз, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 6 раз, по меньшей мере около 7 раз, по меньшей мере около 8 раз, по меньшей мере около 9 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 11 раз, по меньшей мере около 12 раз, по меньшей мере около 13 раз, по меньшей мере около 14 раз, по меньшей мере около 15 раз, по меньшей мере около 16 раз, по меньшей мере около 17 раз, по меньшей мере около 18 раз, по меньшей мере около 19 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 21 раз, по меньшей мере около 22 раз, по меньшей мере около 23 раз, по меньшей мере около 24 раз, по меньшей мере около 25 раз, по меньшей мере около 26 раз, по меньшей мере около 27 раз, по меньшей мере около 28 раз, по меньшей мере около 29 раз или по меньшей мере около 30 раз по сравнению со свободной полезной нагрузкой.

[0376] В некоторых аспектах инкапсулированная полезная нагрузка представляет собой антимира, раскрытый в настоящем документе, например, антисмысловой олигонуклеотид с SEQ ID NO: 18, или его вариант или производное (например, олигонуклеотид, на по меньшей мере около 70% идентичный антисмысловому олигонуклеотиду с SEQ ID NO: 18), причем инкапсуляция антимира в мицелле настоящего изобретения увеличивает время полужизни антимира в плазме крови в по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 12 раз, по меньшей мере около 14 раз, по меньшей мере около 16 раз, по меньшей мере около 18 раз или по меньшей мере около 20 раз по сравнению с временем полужизни свободного антимира в плазме крови. В одном конкретном аспекте инкапсулированная полезная нагрузка представляет собой антимира, раскрытый в настоящем документе, например, антисмысловой олигонуклеотид с SEQ ID NO: 18, или его вариант или производное (например, олигонуклеотид, на по меньшей мере около 70% идентичный антисмысловому олигонуклеотиду с SEQ ID NO: 18), причем инкапсуляция антимира в мицелле настоящего изобретения увеличивает время полужизни антимира в плазме крови в по меньшей мере около 20 раз по сравнению с временем полужизни свободного антимира в плазме крови. В некоторых аспектах время полужизни в плазме крови антимира, инкапсулированного в мицелле настоящего изобретения, составляет по меньшей мере около 30 минут, по меньшей мере около 40 минут, по меньшей мере около 50 минут, по меньшей мере около 60 минут, по меньшей мере около 70 минут, по меньшей мере около 80 минут, по меньшей мере около 90 минут, по меньшей мере около 100 минут или по меньшей мере около 120 минут. В одном конкретном аспекте время полужизни в плазме крови антимира (например, антисмыслового олигонуклеотида с SEQ ID NO: 18), инкапсулированного в мицелле настоящего изобретения, составляет по меньшей мере около 90 минут.

[0377] Согласно настоящему изобретению также предложены способы увеличения проникающей способности, доставки, переноса или транспортировки полезной нагрузки через физиологический барьер, *например*, ГЭБ или плазматическую мембрану, включающие в себя встраивание полезной нагрузки, *например*, анионной полезной нагрузки, такой как нуклеиновая кислота (*например*, антимири), в мицеллу настоящего изобретения.

[0378] В некоторых аспектах инкапсуляция полезной нагрузки в мицелле настоящего изобретения может усилить проникающую способность, доставку, перенос или транспортировку полезной нагрузки через физиологический барьер, *например*, ГЭБ или плазматическую мембрану, на по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 100% по сравнению со свободной полезной нагрузкой.

[0379] В некоторых аспектах инкапсуляция полезной нагрузки в мицелле настоящего изобретения может усилить проникающую способность, доставку, перенос или транспортировку полезной нагрузки через физиологический барьер, *например*, ГЭБ или плазматическую мембрану, в по меньшей мере около 2 раз, по меньшей мере около 3 раз, по меньшей мере около 4 раз, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 6 раз, по меньшей мере около 7 раз, по меньшей мере около 8 раз, по меньшей мере около 9 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 11 раз, по меньшей мере около 12 раз, по меньшей мере около 13 раз, по меньшей мере около 14 раз, по меньшей мере около 15 раз, по меньшей мере около 16 раз, по меньшей мере около 17 раз, по меньшей мере около 18 раз, по меньшей мере около 19 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 21 раз, по меньшей мере около 22 раз, по меньшей мере около 23 раз, по меньшей мере около 24 раз, по меньшей мере около 25 раз, по меньшей мере около 26 раз, по меньшей мере около 27 раз, по меньшей мере около 28 раз, по меньшей мере около 29 раз или по меньшей мере около 30 раз по сравнению со свободной полезной нагрузкой.

[0380] В некоторых аспектах мицеллы настоящего изобретения можно применять для нацеливания на стволовые клетки, *например*, для доставки терапевтических молекул (*например*, терапевтических полинуклеотидов) или компонентов генной терапии. В других аспектах мицеллы настоящего изобретения можно применять для лечения злокачественных

опухолей. Например, мицеллы настоящего изобретения можно нацелить на маркер, специфичный для определенного типа злокачественной опухоли, *например*, глиомы, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака печени, рака кожи или рака шейки матки, и содержать в качестве полезной нагрузки терапевтическую молекулу (*например*, терапевтический полинуклеотид, пептид или малую молекулу).

[0381] В конкретных аспектах мицеллы настоящего изобретения можно применять для лечения рака поджелудочной железы. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент, направляющий мицеллы настоящего изобретения на ткани поджелудочной железы, представляет собой циклический пептид RGD. В других аспектах нацеливающий фрагмент, направляющий мицеллы настоящего изобретения на ткани поджелудочной железы, представляет собой биомаркер, преимущественно или исключительно экспрессируемый на поверхности нормальных или раковых клеток поджелудочной железы. В некоторых аспектах полезная нагрузка мицеллы настоящего изобретения представляет собой олигонуклеотид, нацеленный на K-Ras, причем доставка полезной нагрузки в ткань поджелудочной железы эффективно снижает экспрессию K-Ras.

[0382] В некоторых аспектах мицеллы настоящего изобретения можно применять для лечения или облегчения симптомов нейродегенеративного заболевания, *например*, болезни Альцгеймера. В некоторых аспектах мицеллы настоящего изобретения содержат полезную нагрузку, *например*, антимир, нацеленный на молекулу, сверхэкспрессированную в нейронах при болезни Альцгеймера, *например*, miRNA-485-3p. Соответственно, в некоторых аспектах введение мицеллы настоящего изобретения (*например*, мицеллы, содержащей фрагмент, нацеленный на LAT1, для эффективной транспортировки мицеллы через ГЭБ и антимир, нацеленный на miRNA-485-3p) пациенту с болезнью Альцгеймера может предотвратить или облегчить симптомы болезни Альцгеймера, такие как апоптоз, потеря функции митохондрий или воспаление. См. **ФИГ. 24**.

[0383] В некоторых аспектах согласно настоящему изобретению предложен способ уменьшения воспаления, *например*, нейровоспаления, у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием (*например*, болезнью Альцгеймера), включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества мицеллы настоящего изобретения, которая содержит лекарственное средство, способное эффективно уменьшить воспаление, *например*, нейровоспаление, у субъекта. В некоторых аспектах нейровоспаление представляет собой воспаление коры головного мозга. В некоторых аспектах нейровоспаление представляет собой воспаление гиппокампа. В некоторых аспектах лекарственное средство представляет собой антимир, нацеленный на miRNA-485-

3p (*например*, антимири с SEQ ID NO:18 или его фрагмент или вариант), причем антимири могут снижать уровни miRNA-485-3p у субъекта.

[0384] В некоторых аспектах введение мицеллы настоящего изобретения субъекту, страдающему нейродегенеративным заболеванием (*например*, болезнью Альцгеймера) может уменьшить степень нейровоспаления на по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или около 100% по сравнению со степенью нейровоспаления, наблюдаемого у субъекта или популяции субъектов, не получавших лечение мицеллой настоящего изобретения.

[0385] В некоторых аспектах согласно настоящему изобретению предложен способ уменьшения выраженности амилоидных бляшек у субъекта, страдающего болезнью Альцгеймера, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества мицеллы настоящего изобретения, которая содержит лекарственное средство, способное эффективно уменьшать выраженность амилоидных бляшек у субъекта. В некоторых аспектах лекарственное средство представляет собой антимири, нацеленный на miRNA-485-3p (*например*, антимири с SEQ ID NO:18 или его фрагмент или вариант), причем антимири могут снижать уровни miRNA-485-3p у субъекта.

[0386] В некоторых аспектах введение мицеллы настоящего изобретения субъекту, страдающему нейродегенеративным заболеванием (*например*, болезнью Альцгеймера) может уменьшить выраженность амилоидных бляшек на по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или около 100% по сравнению с выраженностью амилоидных бляшек, наблюдаемых у субъекта или популяции субъектов, не получавших лечение мицеллой настоящего изобретения.

[0387] В некоторых аспектах согласно настоящему изобретению предложен способ восстановления и/или индуцирования нейрогенеза у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием (*например*, болезнью Альцгеймера), включающий в

себя введение субъекту терапевтически эффективного количества мицеллы настоящего изобретения, которая содержит лекарственное средство, способное эффективно восстанавливать и/или индуцировать нейрогенез у субъекта. В некоторых аспектах лекарственное средство представляет собой антими́р, нацеленный на miRNA-485-3p (*например*, антими́р с SEQ ID NO:18 или его фрагмент или вариант), причем антими́р может снижать уровни miRNA-485-3p у субъекта.

[0388] В некоторых аспектах введение мицеллы настоящего изобретения субъекту, страдающему нейродегенеративным заболеванием (*например*, болезнью Альцгеймера) может восстановить и/или индуцировать нейрогенез у субъекта на по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или около 100% по сравнению со степенью нейрогенеза, наблюдаемого у субъекта или популяции субъектов, не получавших лечение мицеллой настоящего изобретения.

[0389] В некоторых аспектах согласно настоящему изобретению предложен способ улучшения когнитивной функции у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием (*например*, болезнью Альцгеймера), включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества мицеллы настоящего изобретения, которая содержит лекарственное средство, способное эффективно улучшать когнитивную функцию у субъекта. В некоторых аспектах лекарственное средство представляет собой антими́р, нацеленный на miRNA-485-3p (*например*, антими́р с SEQ ID NO:18 или его фрагмент или вариант), причем антими́р может снижать уровни miRNA-485-3p у субъекта.

[0390] В некоторых аспектах введение мицеллы настоящего изобретения субъекту, страдающему нейродегенеративным заболеванием (*например*, болезнью Альцгеймера) может усилить когнитивную функцию субъекта на по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или около 100%

по сравнению с когнитивной функцией, наблюдаемой у субъекта или популяции субъектов, не получавших лечение мицеллой настоящего изобретения.

VIII. Наборы

[0391] Согласно настоящему изобретению также предложены наборы или продукты производства, содержащие молекулу катионного носителя, мицеллу или фармацевтическую композицию настоящего изобретения и, в некоторых случаях, инструкции по применению. В некоторых аспектах набор или продукт производства содержит молекулу катионного носителя, мицеллу или фармацевтическую композицию настоящего изобретения в одном или более контейнерах. В некоторых аспектах набор или продукт производства содержит молекулу катионного носителя, мицеллу или фармацевтическую композицию настоящего изобретения, а также брошюру. В некоторых аспектах набор или продукт производства содержит молекулу катионного носителя, мицеллу или фармацевтическую композицию настоящего изобретения, а также инструкции по применению. Специалисту в данной области понятно, что молекула катионного носителя, мицелла или фармацевтическая композиция настоящего изобретения, или их комбинации могут быть легко включены в один из установленных форматов наборов, хорошо известных в данной области.

[0392] В некоторых аспектах набор или продукт производства содержит молекулу катионного носителя настоящего изобретения в сухом виде в контейнере (*например*, стеклянном флаконе) и, в некоторых случаях, во флаконе с растворителем, подходящим для гидратации сухого катионного носителя, а также, в некоторых случаях, инструкции по гидратации катионного носителя и образованию мицелл. В некоторых аспектах набор или продукт производства дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный контейнер (*например*, стеклянный флакон) с анионной полезной нагрузкой мицеллы (*например*, антисмысловым олигонуклеотидом). В некоторых аспектах набор или продукт производства содержит молекулу катионного носителя настоящего изобретения в сухой форме и анионную полезную нагрузку мицеллы также в сухой форме в одном и том же контейнере или в разных контейнерах. В некоторых аспектах набор или продукт производства содержит молекулу катионного носителя настоящего изобретения в растворе и анионную полезную нагрузку мицеллы также в растворе в одном и том же контейнере или в разных контейнерах. В некоторых аспектах набор или продукт производства содержит мицеллу настоящего изобретения в растворе, а также инструкции по применению. В некоторых аспектах набор или продукт производства содержит мицеллу настоящего изобретения в сухой форме, а также инструкции по применению (*например*, инструкции по восстановлению или введению).

[0393] При практическом применении настоящего изобретения используют, если не указано иное, традиционные методы клеточной биологии, клеточной культуры, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, рекомбинантной ДНК и иммунологии, которые входят в компетенцию специалистов в данной области. Такие методы подробно описаны в литературе. См., например, Sambrook et al., ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook et al., ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning, Volumes I and II*; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis et al. Патент США № 4,683,195; Hames and Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning*; the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu et al., eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV*; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); Crooke, *Antisense drug Technology: Principles, Strategies and Applications*, 2nd Ed. CRC Press (2007) и Ausubel et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

[0394] Все ссылки, приведенные выше, а также все ссылки, приведенные в настоящем документе, включены в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[0395] Следующие примеры приведены в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения.

Примеры

Пример 1.

[0396] **(а) Синтез модифицированного алкином тирозина:** Модифицированный алкином тирозин был получен в качестве промежуточного продукта для синтеза тканеспецифического нацеливающего фрагмента (ТМ, см. ФИГ. 3) молекулы катионного носителя для направления мицелл настоящего изобретения на переносчик LAT1 в ГЭБ.

[0397] К смеси N-(трет-бутоксикарбонил)-L-тирозин метилового сложного эфира (Вос-Тур-ОМе) (0,5 г, 1,69 ммоль) и K_2CO_3 (1,5 эквив., 2,54 ммоль) в ацетонитриле (4,0 мл) добавляли по каплям пропаргилбромид (1,2 эквив., 2,03 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 60 °C в течение ночи. После реакции реакционную смесь экстрагировали с помощью

воды:этилацетата (EA). Затем органический слой промывали соляным раствором. Неочищенный материал очищали с помощью флэш-колонки (EA в гексане 10%). Затем полученный продукт растворяли в 1,4-диоксане (1,0 мл) и 6,0 М HCl (1,0 мл). Реакционную смесь нагревали при 100 °С в течение ночи. Затем диоксан удаляли и экстрагировали EA. К смеси добавляли водный раствор NaOH (0,5 М) до тех пор, пока значение pH не стало равным 7. Реактив концентрировали с помощью испарителя и центрифугировали при 12 000 об/мин при 0 °С. Выпавший осадок промывали деионизированной водой и лиофилизировали.

[0398] **(b) Синтез поли(этиленгликоль)-*b*-поли(L-лизин) (ПЭГ-ПЛЛ):** На этом этапе синтеза были получены водорастворимый биополимер (WP) и катионный носитель (CC) молекулы катионного носителя настоящего изобретения (см. ФИГ. 3).

[0399] Поли(этиленгликоль)-*b*-поли(L-лизин) был синтезирован путем кольцевой полимеризации Lys(TFA)-NCA с монометокси-ПЭГ (MeO-PEG) в качестве макроинициатора. Далее, MeO-PEG (600 мг, 0,12 ммоль) и Lys(TFA)-NCA (2 574 мг, 9,6 ммоль) были отдельно растворены в ДМФ, содержащем 1 М тиомочевину и ДМФ (или NMP). Раствор Lys(TFA)-NCA капали в раствор MeO-PEG с помощью микрошприца, после чего реакционную смесь перемешивали при 37 °С в течение 4 дней. Очистку бутылок для реагентов производили с помощью аргона и вакуума. Все реакции проводились в аргонной среде. После реакции смесь осаждали в избыточном количестве диэтилового эфира. Выпавший осадок повторно растворяли в метаноле и снова осаждали в холодном диэтиловом эфире. Затем его отфильтровывали и после вакуумной сушки получали белый порошок. Для удаления защитной группы TFA в PEG-PLL(TFA) выполняли следующий этап.

[0400] MeO-PEG-PLL(TFA) (500 мг) растворяли в метаноле (60 мл) и в раствор полимера капали 1 N NaOH (6 мл), при этом перемешивая. Смесь выдерживали в течение 1 дня, перемешивая ее при 37 °С. Реакционную смесь подвергали диализу против 10 mM HEPES 4-кратно и дистиллированной воды. После лиофилизации был получен белый порошок ПЭГ-PLL.

[0401] **(b) Синтез азидо-поли(этиленгликоль)-*b*-поли(L-лизин) (N₃-ПЭГ-PLL):** На этом этапе синтеза были получены водорастворимый биополимер (WP) и катионный носитель (CC) молекулы катионного носителя настоящего изобретения (см. ФИГ. 3).

[0402] Азидо-поли(этиленгликоль)-*b*-поли(L-лизин) был синтезирован путем полимеризации Lys(TFA)-NCA с азидо-ПЭГ (N₃-ПЭГ). Далее, N₃-ПЭГ (300 мг, 0,06 ммоль) и Lys(TFA)-NCA (1 287 мг, 4,8 ммоль) были отдельно растворены в ДМФ, содержащем 1 М тиомочевину и ДМФ (или NMP). Раствор Lys(TFA)-NCA капали в раствор N₃-PEG с

помощью микрошприца, после чего реакционную смесь перемешивали при 37 °С в течение 4 дней. Очистку бутылок для реагентов производили с помощью аргона и вакуума. Все реакции проводились в аргонной среде. После реакции смесь осаждали в избыточном количестве диэтилового эфира. Выпавший осадок повторно растворяли в метаноле и снова осаждали в холодном диэтиловом эфире. Затем его отфильтровывали и после вакуумной сушки получали белый порошок. Для удаления защитной группы TFA в PEG-PLL(TFA) выполняли следующий этап.

[0403] N₃-PEG(PLL) (500 мг) растворяли в метаноле (60 мл) и в раствор полимера капали 1 N NaOH (6 мл), при этом перемешивая. Смесь выдерживали в течение 1 дня, перемешивая ее при 37 °С. Реакционную смесь подвергали диализу против 10 mM HEPES 4-кратно и дистиллированной воды. После лиофилизации был получен белый порошок N₃-PEG-PLL.

[0404] **(с) Синтез (метокси- или) азидополи(этиленгликоль)-b-поли(L-лизин/никотинамид/меркаптопропанамида) (N₃-PEG-PLL(Nic/SH)):** На этом этапе тканеспецифические фрагменты адъюванта (AM, см. ФИГ. 3) присоединяли к компоненту WP-CC молекулы катионного носителя настоящего изобретения. В качестве тканеспецифического адъюванта (AM) в молекуле катионного носителя применяли никотинамид (витамин B3). Этот этап позволяет получить компоненты WP-CC-AM молекулы катионного носителя, изображенного на ФИГ. 3.

[0405] Азидополи(этиленгликоль)-b-поли(L-лизин/никотинамид/меркаптопропанамида) (N₃-PEG-PLL(Nic/SH)) синтезировали путем химической модификации N₃-PEG-PLL и никотиновой кислоты в присутствии EDC/NHS. N₃-PEG-PLL (372 мг, 25,8 мкмоль) и никотиновую кислоту (556,7 мг, 1,02 эквив. к NH₂ PEG-PLL) отдельно растворяли в смеси деионизированной воды и метанола (1:1). EDC HCl (556,7 мг, 1,5 эквив. к NH₂ N₃-PEG-PLL) добавляли в раствор никотиновой кислоты, а NHS (334,2 мг, 1,5 эквив. к NH₂ PEG-PLL) постепенно добавляли в смесь.

[0406] Реакционную смесь добавляли в раствор N₃-PEG-PLL. Реакционную смесь выдерживали при 37 °С в течение 16 часов, при этом перемешивая. Через 16 часов 3,3'-дителиодипропоновую кислоту (36,8 мг, 0,1 эквив.) растворяли в метаноле, EDC HCl (40,3 мг, 0,15 эквив.) и NHS (24,2 мг, 0,15 эквив.) растворяли отдельно в деионизированной воде. После этого в раствор 3,3'-дителиодипропоновой кислоты последовательно добавляли NHS и EDC•HCl. Раствор смеси перемешивали в течение 4 часов при 37 °С после добавления неочищенного раствора N₃-PEG-PLL(Nic).

[0407] Для очистки смесь подвергали диализу против метанола в течение 2 часов, добавляли DL-дителиотреитол (DTT, 40,6 мг, 0,15 эквив.), затем активировали в течение 30 мин.

[0408] Для удаления DTT смесь подвергали диализу последовательно метанолом, 50% метанолом в деионизированной воде, деионизированной водой.

[0409] **(d) Синтез фенилаланинполи(этиленгликоль)-b-поли(L-лизин/никотинамид/меркаптопропанамид) (Phe-PEG-PLL(Nic/SH)):** На этом этапе к компоненту WP-CC-AM, синтезированному на предыдущем этапе, присоединяли тканеспецифический нацеливающий фрагмент (TM). Компонент TM (фенилаланин) получали с помощью реакции промежуточного продукта, полученного на этапе (a), с продуктом, полученном на этапе (c).

[0410] Для нацеливания на эндотелиальные клетки кровеносных сосудов головного мозга в качестве аминокислоты, нацеленной на LAT1, вводили фенилаланин с помощью клик-реакции между N₃-PEG-PLL(Nic/SH) и модифицированным алкином тирозином в присутствии медного катализатора. Далее, N₃-PEG-PLL(Nic/SH) (130 мг, 6,5 мкмоль) и модифицированный алкином фенилаланин (5,7 мг, 4,0 эквив.) растворяли в деионизированной воде (или 50 мМ натрий-фосфатном буфере). После этого CuSO₄•H₂O (0,4 мг, 25 мол. %) и трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)амин (THPTA, 3,4 мг, 1,2 эквив.) растворяли в деионизированной воде и добавляли раствор N₃-PEG-PLL(Nic/SH). Затем в раствор смеси добавляли аскорбат натрия (3,2 мг, 2,5 эквив.). Реакционную смесь выдерживали, перемешивая ее в течение 16 часов при комнатной температуре. После реакции смесь переносили в диализные мембраны (MWCO = 7 000) и подвергали диализу против деионизированной воды в течение 1 дня. После лиофилизации получали конечный продукт. На ФИГ. 4 показана ¹H-NMR-характеристика молекулы носителя.

Пример 2

Приготовление мицелл полиионного комплекса (PIC)

[0411] Мицеллы образовывали после получения молекул катионного носителя настоящего изобретения, как описано в примере 1. Мицеллы, описанные в настоящем примере, содержат молекулы катионного носителя в комбинации с полезной нагрузкой, представленной антисмысловым олигонуклеотидом.

[0412] Наноразмерные мицеллы PIC получали путем смешивания MeO- или Phe-PEG-PLL(Nic) и миРНК. PEG-PLL(Nic) растворяли в буфере HEPES (10 мМ) в концентрации 0,5 мг/мл. После этого раствор миРНК (22,5 мкМ) в воде без РНаз смешивали с раствором полимера при соотношении миРНК и полимера 2:1 (об./об.).

[0413] Соотношение полимера и анти-миРНК определяли путем оптимизации условий образования мицелл, *т. е.* соотношения между амином в полимере (носителе настоящего изобретения) и фосфатом в анти-миРНК (полезной нагрузке). Смесь полимера (носитель) и анти-миРНК (полезная нагрузка) энергично перемешивали в течение 90 секунд

мультивихревым методом при 3000 об/мин и выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин для стабилизации мицелл.

[0414] Распределение частиц по крупности и интенсивность светорассеяния (SLI) измеряли с помощью Zeta-sizer с длиной волны 634 нм. **На ФИГ. 9** показано распределение частиц по крупности мицелл полиионного комплекса, нагруженных миРНК, в PBS. Нагруженные анти-миРНК мицеллы демонстрируют размер частиц < 60 нм с низким распределением PDI, что указывает на то, что комплекс представляет собой однородную частицу. Пик распределения, как показано на **ФИГ. 9**, был при 32 нм.

[0415] Мицеллы (концентрация анти-миРНК 10 мкМ) до применения хранили при 4 °С. MeO- или Phe- мицеллы получали тем же способом, а различные количества Phe-содержащих мицелл (25% ~ 75%) также были приготовлены путем смешивания обоих полимеров во время приготовления мицелл.

Пример 3

Нацеливание на мозг с применением LAT1 и фенилаланина

[0416] LAT1 выбрали в качестве целевой молекулы для переноса мицелл настоящего изобретения через ГЭБ. Как показано на **ФИГ. 10**, у людей LAT1 экспрессируется преимущественно в головном мозге. **На ФИГ. 11** показано, что у мышей LAT1 также экспрессируется преимущественно в тканях мозга.

[0417] Для изучения возможности пересечения гематоэнцефалического барьера с помощью белка LAT1, краситель Cy 5.5 или фенилаланин, меченный Cy 5.5, вводили мышам (n=3) в мозговые желудочки и анализировали интенсивность флуоресценции лизата мозга через 1 час после инъекции. Для измерения Cy 5.5 метили с помощью клик-реакции с модифицированным алкином тирозином и N₃-Cy 5.5.

[0418] Меченный Cy 5.5 фенилаланин или N₃-Cy 5.5 (20 мкг Cy5.5 Конц.) отдельно вводили инъекцией в мозговые желудочки, и такой же объем ФСБ также вводили в качестве контроля. Через час после инъекции всех мышей (n=3) забивали, а оставшуюся кровь промывали 5 мл ФСБ для перфузии. Головной мозг мышей извлекали и гомогенизировали в лизирующем буфере с помощью зондового ультразвукового диспергатора. Образцы лизата переносили в 96-луночные планшеты и измеряли интенсивность флуоресценции с помощью мультипланшетного ридера с Ex/Em = 650/690.

[0419] Меченная флуоресценцией (Cy5.5) молекула носителя, нацеленная на мозг, действительно оказалась способной связываться с LAT1, который экспрессируется в паренхиме головного мозга, и показала более высокое накопление, чем ненацеленная молекула Cy5.5. См. **ФИГ. 12**.

[0420] Нагруженные анти-миРНК мицеллы полиионного комплекса (*m. e.* мицеллы настоящего изобретения), нацеленные на LAT1, оказались способными пересекать ГЭБ и существенно накапливались в мозге по сравнению с ненацеленными мицеллами.

Пример 4.

In vivo стабильность мицелл изобретения

[0421] *In vivo* стабильность раскрытых в настоящем документе мицелл оценивали путем измерения изменений в кровотоке после системного введения мицеллы. Нагруженные мечеными Су 5.5 миРНК мицеллы и оголенную миРНК, меченную Су 5.5 (20 мкг конц. миРНК), системно вводили мышам, после чего в требуемые сроки извлекали 120 мкл крови из хвостовой вены. Образцы крови центрифугировали при 2500 об/мин, и супернатант переносили в 96-луночный планшет. Остальные интенсивности флуоресценции плазмы анализировали с помощью мультипланшетного ридера с Ex/Em = 650/690.

[0422] Инкапсуляция полезной нагрузки, представленной анти-микроРНК, в мицелле настоящего изобретения привела к увеличению стабильности. См. **ФИГ. 8**. В контрольных условиях время полужизни анти-микроРНК (антимира) в плазме крови оказалось менее 5 минут. Однако после включения анти-миРНК в мицеллу настоящего изобретения время полужизни антимира в плазме крови увеличилось до 80–120 минут. На стабильность мицелл не влияли различные анти-миРНК в нагрузке. Мицеллы, в которых молекулы носителя не содержали антимир, были стабильнее тех, в которых 25% или 50% молекул носителя связаны в комплексы с антимиром.

Пример 5.

Эксперименты на моделях болезни Альцгеймера

(i) Материалы и методы

[0423] (a) *Мыши*: Трансгенные мыши 5XFAD APP (номенклатурный номер: 34840-JAX) были приобретены в Jackson Laboratory. В исследованиях применяли однопометные мыши TG дикого типа (WT) и одной возрастной группы. Всех животных содержали в отдельных клетках при 12/12-часовом цикле свет/темнота с контролируемой температурой и влажностью, а также с пищей и водой. Мыши 5xFAD, также известные как APP/PS1, Tg6799 или Tg-5xFAD, представляют собой животные системы для моделирования болезни Альцгеймера. Мыши 5xFAD экспрессируют человеческие трансгены APP и PSEN1 с пятью мутациями, связанными с AD: шведская (K670N/M671L), флоридская (I716V) и лондонская (V717I) мутации в APP и мутации M146L и L286V в PSEN1. Первоначально было создано три линии: Tg6799, Tg7031 и Tg7092. Линия Tg6799, которая экспрессирует самые высокие уровни мутантного APP, является наиболее изученной из трех. Эти широко используемые

мышь воспроизводят многие фенотипы, связанные с AD, и имеют относительно раннюю и агрессивную форму заболевания.

[0424] Амилоидные бляшки, сопровождаемые глиозом, наблюдаются у мышей уже в двухмесячном возрасте. У женщин поражение амилоидозом протекает тяжелее, чем у мужчин. Потеря нейронов происходит во многих областях мозга, начиная примерно с 6 месяцев в областях с наиболее выраженным амилоидозом. У мышей наблюдается ряд когнитивных и двигательных нарушений.

[0425] Мыши 3xTg-AD, несущие три человеческих трансгена — APP(Swe), PS1(M146V) и tau(P301L), были приобретены в Jackson Laboratory. Мыши 3xTg-AD были получены на гибридном фоне C57BL6/129SvJ. Мышей размещали по 4–5 в клетке, содержали при 12-часовом цикле свет/темнота и обеспечивали свободный доступ к пище и воде. Трансляция сверхэкспрессированных трансгенов, по-видимому, ограничена центральной нервной системой, особенно в областях, связанных с болезнью Альцгеймера, включая гиппокамп и кору головного мозга. Первоначальная характеристика этой линии мышей показала прогрессирующее увеличение отложения амилоидного бета-пептида, причем внутриклеточная иммунореактивность была обнаружена в некоторых областях мозга уже на 3–4 месяце. Синаптическая передача и долговременное потенцирование явно нарушены у мышей в возрасте 6 месяцев. В период 12–15 месяцев в гиппокампе обнаруживаются агрегаты конформационно измененного и гиперфосфорилированного тау. У этой мутантной мыши наблюдается патология бляшек и клубочков, связанная с синаптической дисфункцией — признаки, сходные с теми, которые наблюдаются у пациентов с болезнью Альцгеймера.

[0426] *(b) Лечение ASO-MDS (внутривенная инъекция):* Для внутривенного (IV) введения были приготовлены антагомис (антимир) miR-485-3p в мицеллах настоящего изобретения (ASO-MDS) или отрицательные контроли (только miR и только мицеллы). Все лечение 8-месячных мышей 5XFAD проводилось путем внутривенного введения 1,5 мг/кг ASO-MDS в 7, 14, 21 и 28 дни. См. **ФИГ. 17**.

[0427] *(c) Иммуногистохимическое исследование:* Для иммуногистохимического исследования мозг извлекали, после чего его фиксировали и заливали в парафин. Корональные срезы (толщиной 10 мкм) через область инфаркта выполняли с помощью микротомы и размещали на предметные стекла. Парафин удаляли, срезы промывали PBS-T и заливали в блоки с 10% бычьим сывороточным альбумином в течение 2 ч. После этого применяли следующие первичные антитела: Кроличьи анти-β-амилоид (1-42) (Cell Signaling Technology, Cat#14974), мышьиные анти-GFAP (Merck, Cat#MAB360), кроличьи анти-IL-1β (Abcam, Cat#9722), мышьиные анти-TNF-α (Santa Cruz, Cat#sc-52746) анти-актин

(Santa Cruz, Cat#sc-47778). После поведенческого теста у мышей Н/Г вырезали области гиппокампа и коры головного мозга и гомогенизировали ткани мозга в ледяном буфере RIPA, содержащем ингибиторы протеаз. Гомогенаты центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 30 мин при 4 °С, и собирали супернатанты. Результаты визуализировали с помощью системы усиленной хемилюминесценции и количественно оценивали с помощью денситометрического анализа (программное обеспечение Image J, NIH). Все эксперименты проводили отдельно друг от друга не менее трех раз.

[0428] **(d) Поведенческие тесты (Y-лабиринт и пассивное избегание):** Y-лабиринт состоял из трех черных, непрозрачных, пластиковых отсеков (30 см × 8 см × 15 см), расположенных под углом 120° друг к другу. Мышей 5XFAD помещали в центральной части и позволяли им исследовать все три отсека. Количество входов в отсек и количество испытаний (стандарт для количества сдвигов на 10 см от центра, входы в три отдельных отсека) регистрировали для расчета процента чередования. Попадание определяли как попадание всех трех придатков в отсек Y-лабиринта. Альтернативное поведение определяли как количество триад, разделенное на количество заходов в отсек минус 2 и умноженное на 100. Камера пассивного избегания была разделена на белый (светлый) и черный (темный) отсеки (41 см × 21 см × 30 см). В отсеке освещения находилась электрическая лампа мощностью 60 Вт. На полу (темного) отделения находилось несколько (2 мм) стержней из нержавеющей стали, расположенных на расстоянии 5 мм друг от друга. Испытание проводили в течение 3 дней.

[0429] В первый день мышам позволяли адаптироваться в течение 5 минут в светлой зоне. Второй день представлял собой фазу обучения, состоящую из 2 этапов. На первом этапе каждую мышь помещали в светлую зону и дважды перемещали в темную. Через час после первого этапа каждую мышь помещали в световой отсек. Через 30 секунд открывали дверь, разделяющую два отсека. После того, как мышь входила в темный отсек, закрывали дверь и через решетчатый пол в течение 3 секунд электрическим током раздражали лапу животного (0,3 мА/10 г). Если мышь не уходила в темную зону более чем на 5 минут, считалось, что она научилась, и обучение проводили до 5 раз. Через двадцать четыре часа после обучения мышей помещали в световую камеру для испытания. Латентность определяли как время, требуемое мышам для перемещения в темную камеру после того, как открывалась дверь, разделяющая два отсека. Время, затраченное мышью на вход в темную зону и выход в светлую зону, определяли как TDC (время, проведенное в темном отсеке).

[0430] **(e) Анализ данных:** Все данные выражены как средние значения ± с.о. Post-hoc сравнения (тест Стьюдента-Ньюмана-Кьюлса) проводили с помощью Prism 8.

Поведенческие тесты оценивали с помощью непараметрических статистических процедур. Сравнение трех групп (контроль (только miR и только мицеллы) против HI-485-3p) анализировали с помощью U-тестов Манна-Уитни.

(ii) Результаты

[0431] Уровень miRNA-485-3p может быть повышен у пациентов с болезнью Альцгеймера, что приводит, *например*, к воспалению, изменениям в функции митохондрий и апоптозу. См. **ФИГ. 23**. Соответственно, мицеллы настоящего изобретения, нагруженные антимиром, нацеленным на miRNA-485-3p, вводили мышам с моделированной болезнью Альцгеймера. На фигурах и в данной заявке эти мицеллы, содержащие анти-miR-485-3p, обозначали как «ASO-MDS» (Anti-Sense Oligonucleotide - Micelle Delivery System) или «мицелла+анти-miR-485-3p».

[0432] После еженедельного введения 8-месячным трансгенным мышам 5XFAD мицелл ASO-MDS в течение 4 недель наблюдали снижение нейровоспаления в коре и гиппокампе мышей 5XFAD после инъекции. См. **ФИГ. 19А, 19В, 20А и 20В**. Кроме того, введение мицелл ASO-MDS приводило к уменьшению выраженности амилоидных бляшек. **ФИГ. 21А и 21В**. Лечение ASO-MDS также приводило к восстановлению нейрогенеза. См. **ФИГ. 22А и 22В**. В дополнение к улучшению воспаления, уменьшению выраженности амилоидных бляшек и восстановлению нейрогенеза, лечение ASO-MDS также улучшало когнитивные функции, как показали тесты Ymaze и пассивного избегания. См. **ФИГ. 23А и 23В**.

[0433] Согласно тесту Ymaze, при ASO-MDS был обнаружен значительно более высокий % изменений, *т. е.* около 80% изменений, в то время как при отрицательном контроле было выявлено около 50%. См. **ФИГ. 23А**. При применении ASO-MDS также обнаружено, что животные значительно меньше времени пребывали в темном отсеке (сек), в отличие от данных отрицательного контроля.

Пример 6.

Выключение K-Ras при раке поджелудочной железы

[0434] Для изучения возможности применения мицелл настоящего изобретения для эффективной доставки противораковой терапии (см. **ФИГ. 25**) мицеллы настоящего изобретения нацеливали на клетки поджелудочной железы человека с помощью (i) методики традиционного нацеливания на опухоль cRGD с пептидным лигандом или (ii) альтернативной стратегии нацеливания (X-target). Полезной нагрузкой мицелл являлся антисмысловый олигонуклеотид, нацеленный на K-Ras.

[0435] Через 10 дней после введения мышам Panc1-клеток, они (n=3) оказывались носителями опухоли поджелудочной железы. Panc1 представляет собой линию клеток

человека, применяемую в качестве модели рака поджелудочной железы. Клеточная линия была создана из аденокарциномы поджелудочной железы протокового происхождения (эпителиоидная карцинома). Клетки обладают фенотипом G6PD типа В. Lieber M, et al. "Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas." Int. J. Cancer 15: 741-747, 1975. Два вида мицелл, описанных выше, вводили внутривенно один раз в день 3 раза. См. **ФИГ. 26А**. После извлечения опухоли эффективность выключения генов оценивали методом RT-PCR.

[0436] Введение мицелл с обычным пептидным лигандом cRGD, нацеленным на опухоль, приводило приблизительно к 20% выключению K-Ras. В отличие от этого, введение мицелл с помощью альтернативной системы X-target приводило приблизительно к 50% эффективности выключения генов. См. **ФИГ. 26В**.

Пример 7.

Поведение ASO-MDS при поглощении клетками мозга человека

[0437] Первичные микроглия, астроциты, гепатоциты и клетки SH-5Y человека были посеяны в 6-луночный планшет на ночь. Клетки обрабатывали меченым Cy5.5 ASO-MDS 100 нМ. Измерения поглощения ASO-MDS в клетках проводили каждый час в течение 48 часов. Поглощающую способность рассчитывали по проценту конфлюентности лунки с помощью прибора Incucyte S3.

[0438] Для изучения способности к поглощению клеток разных типов были приготовлены ASO-MDS, меченные Cy5.5, и бульон ASO-MDS, разбавленный ФСБ. Поглощение ASO-MDS было увеличено в первичных микроглии, астроцитах и клетках SH-5Y человека, но не в первичных гепатоцитах человека (**ФИГ. 13**). Это указывает на то, что ASO-MDS может быть доставлен именно к клеткам мозга.

Пример 8.

Нацеливаемость LAT1 на мицеллу, нагруженную анти-микроРНК, *in vitro*

[0439] Клетки GL-26 использовали для оценки нацеливания LAT1 мицеллами ASO-MDS. Клетки GL-26 высевали на 96-луночный планшет с 10% ФСБ, 1% P/S, содержащем DMEM. Применяли четыре типа образцов: (i) клетки, инкубированные с ASO-MDS, нацеленной на LAT1 (целевая мицелла), (ii) клетки, инкубированные с ASO-MDS, не нацеленной на LAT1 (нецелевая мицелла), (iii) образцы, схожие с (i), в которых активность LAT1 в клетках была подавлена предварительной инкубацией с фенилаланином (целевая мицелла / ингибитор), и (iv) образцы, схожие с (ii), в которых активность LAT1 в клетках была подавлена предварительной инкубацией с фенилаланином (нецелевая мицелла / ингибитор).

[0440] После 1-дневной инкубации в течение 24 ч при 37 °C среду меняли на новую, и 1 мМ свободного фенилаланина добавляли в образцы (iii) и (iv) для ингибирования LAT1. Затем

клетки инкубировали в течение 1 часа, после чего добавляли мицеллы, нагруженные анти-микроРНК, меченными Cy 5.5 (ASO-MDS), при концентрации РНК 300 нМ. Среду удаляли, дважды промывали ФСБ, и в каждую лунку добавляли по 100 мкл ФСБ. Остаточную интенсивность флуоресценции клеток измеряли с помощью микропланшетного ридера с длиной волны Ex 650/Em 690.

[0441] Остаточная интенсивность флуоресценции клеток, обработанных мицеллами-мишенями, приблизительно в 3 раза превышала интенсивность флуоресценции клеток, не обработанных мицеллами, что указывает на увеличение поглощения анти-микроРНК, меченной Cy5.5, в случаях, когда мицеллы ASO-MDS были нацелены на LAT1.

[0442] Не было значительных различий в клеточном поглощении анти-микроРНК, меченной Cy5.5, в случаях, когда клетки, обработанные целевыми или нецелевыми ASO-MDS, были предварительно инкубированы с ингибитором LAT1 (ФИГ. 14). Это указывает на то, что при ингибировании LAT1 фенилаланином нацеливание мицелл ASO-MDS на LAT1 было недостаточным для увеличения поглощения клетками антимикроРНК, меченной Cy5.5. Другими словами, LAT1-опосредованное поглощение полезной нагрузки, инкапсулированной в мицелле настоящего изобретения, которая нацелена на LAT1, зависит от функционального состояния LAT1.

Пример 9.

Биораспределение мицеллы, нагруженной анти-микроРНК

[0443] Биораспределение анти-микроРНК измеряли с помощью станции визуализации живых животных IVIS. Для сравнения различий в распределении анти-микроРНК в зависимости от времени при применении оголенной анти-микроРНК и мицелл, нагруженных анти-микроРНК (ASO-MDS), оба образца (25 мкг концентрации РНК) вводили мышам инъекцией в хвостовую вену. В требуемые сроки с помощью станции визуализации живых животных IVIS получали флуоресцентные изображения мышей и наблюдали за ними в течение 16 часов.

[0444] Остаточная интенсивность флуоресценции мышей, обработанных оголенной анти-микроРНК, свидетельствовала о быстрой локализации в почке, а через 4 часа сигнал почти исчезал. При применении мицелл, нагруженных анти-микроРНК (ASO-MDS), интенсивность флуоресценции в основном наблюдали в мозге, печени и почках. Флуоресценция в почке постепенно увеличивалась до 6 часов, после чего со временем уменьшалась. Эти результаты показали, что оголенная анти-микроРНК быстро (в течение 4 часов) выводится с мочой из-за небольшого размера молекулы. С другой стороны, мицеллы с анти-микроРНК (ASO-MDS) демонстрировали длительную циркуляцию и

накапливались в мозге до 16 часов, а оставшаяся анти-микроРНК выводилась с мочой. См. **ФИГ. 15**.

Пример 10.

Анализы фагоцитоза in vitro (ELISA и иммуноцитохимия)

[0445] Первичные смешанные глиальные клетки (2×10^5 клеток) или первичные клетки микроглии человека (2×10^5 клеток) помещали в 6-луночные планшеты на ночь. Клетки обрабатывали ASO-MDS с fA β в течение 4 ч при конечной концентрации 1 мкМ. Уровни человеческого A β (1-42) в супернатанте измеряли с помощью набора A β 42 ELISA (Invitrogen, Cat#КНВ3441) в соответствии с инструкциями производителя.

[0446] Кроме того, фагоцитоз первичных клеток микроглии человека проверяли с помощью флуоресцентного микроскопа. Покровные стекла высевали на чашке с 8×10^4 первичными клетками микроглии человека на одно покровное стекло, помещенные в лунки 24-луночного планшета на ночь. Первичные клетки микроглии человека обрабатывали ASO-MDS и инкубировали с немечеными fA β в течение 4 ч при конечной концентрации 1 мкМ. Спустя 4 ч клетки промывали холодным ФСБ. Для измерения поглощения A β первичные глиальные клетки фиксировали 100% метанолом в течение 1 ч при -20°C , промывали ФСБ-Т и инкубировали при 4°C с мышиными анти-амилоидными бета 1-16 или кроличьими анти-Iba-1 антителами.

[0447] Для оценки фагоцитарного эффекта ASO-MDS в глиальных клетках, агрегаты A β получали инкубацией мономеров A β (100 мкМ) при 37°C в течение 24 ч, после чего разбавляли пептидный бульон клеточной культуральной средой. Первичные смешанные глиальные клетки обрабатывали ASO-MDS, а затем обрабатывали 1 мкМ фибриллярного A β (fA β) в течение 4 ч. Уровень A β в кондиционированной среде постепенно снижался в клетках, трансфецированных ASO-MDS, по сравнению с трансфецированными контрольными клетками. См. **ФИГ. 18А**.

[0448] В соответствии с приведенными выше результатами, ASO-MDS дозозависимо увеличивал способность к поглощению A β первичными клетками микроглии человека. См. **ФИГ. 18В**.

[0449] Эти результаты показывают, что ASO-MDS усиливает фагоцитоз A β в глиальных клетках. Для дальнейшего изучения роли глиальных клеток мы провели иммуноцитометрический анализ с применением антител Iba1 и 6E10 для колокализации клеток микроглии человека и бляшек с A β . Иммуноцитометрическое исследование показало, что экспрессия A β в глиальных клетках была значительно повышена в обработанных ASO-MDS первичных клетках микроглии человека. См. **ФИГ. 18С**.

Пример 11.

Биораспределение мицеллы, нагруженной анти-микроРНК

[0450] Биораспределение анти-микроРНК измеряли с помощью станции визуализации живых животных IVIS. Для сравнения различий в распределении анти-микроРНК в зависимости от времени при применении оголенной РНК и мицелл, нагруженной РНК (ASO-MDS), оба образца (10 мкг концентрации РНК) вводили мышам с помощью внутримышечной инъекции. В требуемое время с помощью станции визуализации живых животных IVIS получали флуоресцентные изображения мышей и наблюдали за ними в течение 120 часов.

[0451] Остаточная интенсивность флуоресценции мышей, обработанных оголенной анти-микроРНК, свидетельствовала о быстрой локализации в почке, а через 6 часов сигнал почти исчезал. При применении мицелл, нагруженных анти-микроРНК (ASO-MDS), интенсивность флуоресценции в основном наблюдали в скелетной мускулатуре. Эти результаты показали, что клиренс оголенной РНК происходит быстро в течение 6 часов с выведением с мочой из-за небольшого размера молекулы. С другой стороны, при применении мицеллы, нагруженной анти-микроРНК, наблюдали непрерывную интенсивность флуоресценции в месте инъекции и частично усиленную флуоресценцию в лимфатическом узле, что указывает на устойчивое высвобождение анти-микроРНК из мицеллы, нагруженной анти-микроРНК. См. **ФИГ. 27**

[0452] Следует понимать, что для интерпретации формулы изобретения предназначен раздел «Подробное описание», а не разделы «Реферат» и «Раскрытие изобретения». В разделах «Реферат» и «Раскрытие изобретения» могут быть изложены один или более, но не все примерные аспекты настоящего изобретения, как предполагается изобретателем(ями), и, таким образом, не предназначены для ограничения настоящего изобретения и прилагаемой формулы изобретения каким-либо образом.

[0453] Настоящее изобретение было описано выше с помощью функционально-структурных блоков, иллюстрирующих реализацию заданных функций и взаимосвязей между ними. Границы этих функциональных структурных элементов были произвольно определены в настоящем документе для удобства описания. Альтернативные границы могут быть определены до тех пор, пока указанные функции и взаимосвязи между ними выполняются надлежащим образом.

[0454] Вышеприведенное описание конкретных вариантов осуществления настолько полно раскрывает общий характер изобретения, что другие могут, применяя знания в рамках компетентности в данной области, легко модифицировать и/или адаптировать для различных применений такие конкретные варианты осуществления без излишних

экспериментов, не отступая от общей концепции настоящего изобретения. Поэтому подобные адаптации и модификации должны быть в пределах значения и диапазона эквивалентов раскрытых вариантов осуществления, основанных на идеях и руководстве, представленных в настоящем документе. Следует понимать, что приведенные здесь фразы или термины предназначены для целей описания, а не для ограничения, так что термины или фразы настоящего описания изобретения должны интерпретироваться квалифицированным специалистом в свете идей и руководства.

[0455] Охват и объем настоящего изобретения не должны ограничиваться ни одним из описанных выше примерных вариантов осуществления, а должны определяться только в соответствии со следующей формулой изобретения и ее эквивалентами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

1. Молекула катионного носителя, содержащая

[WP]-L1-[CC]-L2-[AM] (схема I)

или

[WP]-L1-[AM]-L2-[CC] (схема II),

где

WP — фрагмент водорастворимого биополимера;

CC — фрагмент положительно заряженного носителя;

AM — фрагмент адьюванта; и

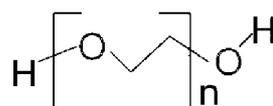
L1 и L2 — самостоятельные необязательные линкеры, и

при этом будучи смешанным с нуклеиновой кислотой в соотношении ионов около 1:1, молекула катионного носителя образует мицеллу.

2. Молекула катионного носителя по п. 1, в которой водорастворимый полимер содержит поли(алкиленгликоли), поли(оксиэтилированный полиол), поли(спирт олефинового ряда), поли(винилпирролидон), поли(гидроксиалкилметакриламид), поли(гидроксиалкилметакрилат), поли(сахариды), поли(α -гидроксикислоту), поли(виниловый спирт), полиглицерин, полифосфазен, полиоксазолины (POZ), поли(N-акрилоилморфолин) или любые их комбинации.

3. Молекула катионного носителя по п. 1, в которой водорастворимый полимер содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ), полиглицерин или поли(пропиленгликоль) (ППГ).

4. Молекула катионного носителя по любому из пп. 1–3, в которой водорастворимый полимер содержит:



где n составляет 1–1000.

5. Молекула катионного носителя по п. 4, где n составляет по меньшей мере около 110, по меньшей мере около 111, по меньшей мере около 112, по меньшей мере около 113, по меньшей мере около 114, по меньшей мере около 115, по меньшей мере около 116, по меньшей мере около 117, по меньшей мере около 118, по меньшей мере около 119, по меньшей мере около 120, по меньшей мере около 121, по меньшей мере около 122, по меньшей мере около 123, по меньшей мере около 124, по меньшей мере около 125, по меньшей мере около 126, по меньшей мере около 127, по меньшей мере около 128, по меньшей мере около 129, по меньшей мере около 130, по меньшей мере около 131, по меньшей мере около 132, по меньшей мере около 133, по меньшей мере около 134, по

меньшей мере около 135, по меньшей мере около 136, по меньшей мере около 137, по меньшей мере около 138, по меньшей мере около 139, по меньшей мере около 140 или по меньшей мере около 141.

6. Молекула катионного носителя по п. 4, где n составляет от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 140 до около 150, от около 150 до около 160.

7. Молекула катионного носителя по любому из пп. 1–6, в которой водорастворимый полимер является линейным, разветвленным или дендритным.

8. Молекула катионного носителя по любому из пп. 1–7, в которой фрагмент катионного носителя содержит одну или более основных аминокислот.

9. Молекула катионного носителя по п. 8, в которой фрагмент катионного носителя содержит по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять, по меньшей мере десять, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29, по меньшей мере 30, по меньшей мере 31, по меньшей мере 32, по меньшей мере 33, по меньшей мере 34, по меньшей мере 35, по меньшей мере 36, по меньшей мере 37, по меньшей мере 38, по меньшей мере 39, по меньшей мере 40, по меньшей мере 41, по меньшей мере 42, по меньшей мере 43, по меньшей мере 44, по меньшей мере 45, по меньшей мере 46, по меньшей мере 47, по меньшей мере 48, по меньшей мере 49, по меньшей мере 50, по меньшей мере 51, по меньшей мере 52, по меньшей мере 53, по меньшей мере 54, по меньшей мере 55, по меньшей мере 56, по меньшей мере 57, по меньшей мере 58, по меньшей мере 59, по меньшей мере 60, по меньшей мере 61, по меньшей мере 62, по меньшей мере 63, по меньшей мере 64, по меньшей мере 65, по меньшей мере 66, по меньшей мере 67, по меньшей мере 68, по меньшей мере 69, по меньшей мере 70, по меньшей мере 71, по меньшей мере 72, по меньшей мере 73, по меньшей мере 74, по меньшей мере 75, по меньшей мере 76, по меньшей мере 77, по меньшей мере 78, по меньшей мере 79 или по меньшей мере 80 основных аминокислот.

10. Молекула катионного носителя по п. 8, в которой фрагмент катионного носителя содержит по меньшей мере 60, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 90, по меньшей мере около 100, по меньшей мере около 110, по

меньшей мере около 120, по меньшей мере около 130, по меньшей мере около 140 или по меньшей мере около 150 основных аминокислот.

11. Молекула катионного носителя по п. 9, в которой фрагмент катионного носителя содержит от около 30 до около 50 основных аминокислот.

12. Молекула катионного носителя по п. 10, в которой фрагмент катионного носителя содержит от около 60 до около 100, например, от около 70 до около 90, например, около 80 основных аминокислот.

13. Молекула катионного носителя по любому из пп. 9–12, в которой основная аминокислота содержит аргинин, лизин, гистидин или любую их комбинацию.

14. Молекула катионного носителя по любому из пп. 1–13, в которой фрагмент катионного носителя содержит около 40 мономеров лизина.

15. Молекула катионного носителя по любому из пп. 1–13, в которой фрагмент катионного носителя содержит около 70, около 75, около 80 или около 85 мономеров лизина.

16. Молекула катионного носителя по любому из пп. 1–15, в которой фрагмент адьюванта способен модулировать иммунный ответ, воспалительный ответ и/или микроокружение ткани.

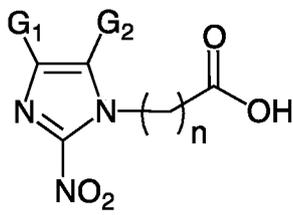
17. Молекула катионного носителя по п. 16, в которой фрагмент адьюванта способен модулировать иммунный ответ.

18. Молекула катионного носителя по п. 16, в которой фрагмент адьюванта способен модулировать микроокружение опухоли у субъекта с опухолью.

19. Молекула катионного носителя по п. 16, в которой фрагмент адьюванта способен ингибировать или уменьшать гипоксию в микроокружении опухоли.

20. Молекула катионного носителя по любому из пп. 17–18, в которой фрагмент адьюванта содержит производное имидазола, аминокислоту, витамин или любую их комбинацию.

21. Молекула катионного носителя по п. 20, в которой фрагмент адьюванта содержит:



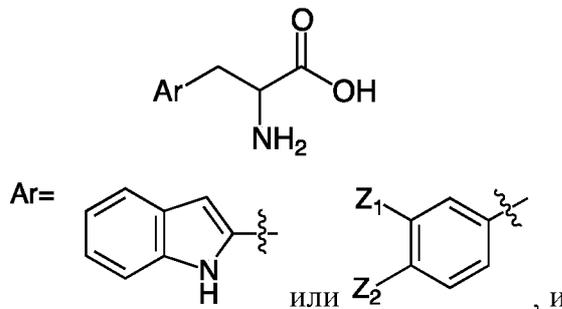
где каждый из G1 и G2 является H, ароматическим кольцом или 1–10 алкилом, либо G1 и G2 вместе образуют ароматическое кольцо, и где n составляет 1–10.

22. Молекула катионного носителя по п. 21, в которой фрагмент адьюванта содержит нитроимидазол.

23. Молекула катионного носителя по п. 22, в которой фрагмент адьюванта содержит метронидазол, тинидазол, ниморазол, диметридазол, претоманид, орнидазол, мегазол, азанидазол, бензнидазол или любую их комбинацию.

24. Молекула катионного носителя по п. 16, в которой фрагмент адьюванта содержит аминокислоту.

25. Молекула катионного носителя по п. 16, в которой фрагмент адьюванта содержит



где Ar представляет собой

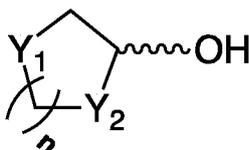
где каждый из Z1 и Z2 является H или OH.

26. Молекула катионного носителя по п. 16, в которой фрагмент адьюванта способен ингибировать или уменьшать воспалительный ответ.

27. Молекула катионного носителя по п. 26, в которой фрагмент адьюванта представляет собой витамин.

28. Молекула катионного носителя по п. 27, в которой витамин содержит циклическое кольцо или циклическое кольцо с гетероатомом, и карбоксильную группу или гидроксильную группу.

29. Молекула катионного носителя по п. 28, в которой витамин содержит:



где каждый из Y1 и Y2 является C, N, O или S, и где n — 1 или 2.

30. Молекула катионного носителя по любому из пп. 27–29, в которой витамин выбран из группы, состоящей из витамина А, витамина В1, витамина В2, витамина В3, витамина В6, витамина В7, витамина В9, витамина В12, витамина С, витамина D2, витамина D3, витамина Е, витамина М, витамина Н и любой их комбинации.

31. Молекула катионного носителя по любому из пп. 30, в которой витамин представляет собой витамин В3.

32. Молекула катионного носителя по любому из пп. 1–31, в которой фрагмент адьюванта содержит по меньшей мере около двух, по меньшей мере около трех, по меньшей мере около четырех, по меньшей мере около пяти, по меньшей мере около шести, по меньшей мере около семи, по меньшей мере около восьми, по меньшей мере около девяти,

по меньшей мере около десяти, по меньшей мере около 11, по меньшей мере около 12, по меньшей мере около 13, по меньшей мере около 14, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 16, по меньшей мере около 17, по меньшей мере около 18, по меньшей мере около 19 или по меньшей мере около 20 молекул витамина В3.

33. Молекула катионного носителя по любому из пп. 1–31, в которой фрагмент адьюванта содержит меньшей мере около 20, по меньшей мере около 21, по меньшей мере около 22, по меньшей мере около 23, по меньшей мере около 24, по меньшей мере около 25, по меньшей мере около 26, по меньшей мере около 27, по меньшей мере около 28, по меньшей мере около 29, по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 31, по меньшей мере около 32, по меньшей мере около 33, по меньшей мере около 34, по меньшей мере около 35, по меньшей мере около 36, по меньшей мере около 37, по меньшей мере около 38, по меньшей мере около 39 или по меньшей мере около 40 молекул витамина В3.

34. Молекула катионного носителя по п. 32 или п. 33, в которой фрагмент адьюванта содержит около 10 молекул витамина В3, около 20 молекул витамина В3, около 30 молекул витамина В3, около 40 молекул витамина В3 или около 50 молекул витамина В3.

35. Молекула катионного носителя по любому из пп. 1–34, которая приблизительно содержит фрагмент водорастворимого биополимера с от около 120 до около 130 молекул ПЭГ, фрагмент катионного носителя, содержащего полилизин с от около 30 до около 40 молекул лизина, и фрагмент адьюванта с от около 5 до около 10 молекул витамина В3.

36. Молекула катионного носителя по любому из пп. 1–34, которая приблизительно содержит фрагмент водорастворимого биополимера с от около 120 до около 130 молекул ПЭГ, фрагмент катионного носителя, содержащего полилизин с от около 70 до около 90 молекул лизина, например, около 80 молекул лизина, и фрагмент адьюванта с от около 20 до около 40 молекул витамина В3, например, около 30 молекул витамина В3.

37. Молекула катионного носителя по любому из пп. 1–36, дополнительно содержащая анионную полезную нагрузку, которая взаимодействует с молекулой катионного носителя посредством ионной связи.

38. Мицелла, содержащая молекулу катионного носителя по любому из пп. 1–37 и анионную полезную нагрузку, причем фрагмент катионного носителя комплекса катионного носителя и анионная полезная нагрузка ассоциированы друг с другом.

39. Мицелла по п. 38, в которой ассоциация представляет собой ковалентную связь.

40. Мицелла по п. 38, в которой ассоциация представляет собой нековалентную связь.

41. Мицелла по п. 40, в которой ассоциация представляет собой ионную связь.

42. Мицелла по любому из пп. 38–41, в которой содержится молекула катионного носителя по любому из пп. 1–36, причем положительный заряд фрагмента катионного

носителя молекулы катионного носителя достаточный для образования мицеллы при смешивании его с анионной полезной нагрузкой в растворе, причем общее соотношение ионов с положительными зарядами фрагмента катионного носителя молекулы катионного носителя и ионов с отрицательными зарядами анионной полезной нагрузки в растворе составляет около 1: 1.

43. Мицелла по любому из пп. 38–41, в которой содержится молекула катионного носителя по любому из пп. 1–36, причем положительный заряд фрагмента катионного носителя молекулы катионного носителя достаточный для образования мицеллы при смешивании его с анионной полезной нагрузкой в растворе, причем общее соотношение ионов с положительными зарядами фрагмента катионного носителя молекулы катионного носителя и ионов с отрицательными зарядами анионной полезной нагрузки в растворе составляет от около 1:3 до около 3:1.

44. Мицелла по любому из пп. 38–43, в которой молекула катионного носителя способна защищать анионную полезную нагрузку от деградации ДНазой и/или РНазой.

45. Мицелла по любому из пп. 38–44, в которой анионная полезная нагрузка не конъюгирована с молекулой катионного носителя ковалентной связью, и/или анионная полезная нагрузка взаимодействует с фрагментом катионного носителя молекулы катионного носителя только посредством ионного взаимодействия.

46. Мицелла по любому из пп. 38–45, в которой время полужизни анионной полезной нагрузки увеличено по сравнению с временем полужизни свободной анионной полезной нагрузки, не включенной в мицеллу.

47. Мицелла по любому из пп. 36–46, в которой положительные заряды фрагмента катионного носителя молекулы катионного носителя и отрицательные заряды анионной полезной нагрузки в мицелле находятся в соотношении ионов около 2:1, около 1,9:1, около 1,8:1, около 1,7:1, около 1,6:1, около 1,5:1, около 1,4:1, около 1,3:1, около 1,2:1, около 1:1, около 1:1,1, около 1:1,2, около 1:1,3, около 1:1,4, около 1:1,5, около 1:1,6, около 1:1,7, около 1:1,8, около 1:1,9 или около 1:2.

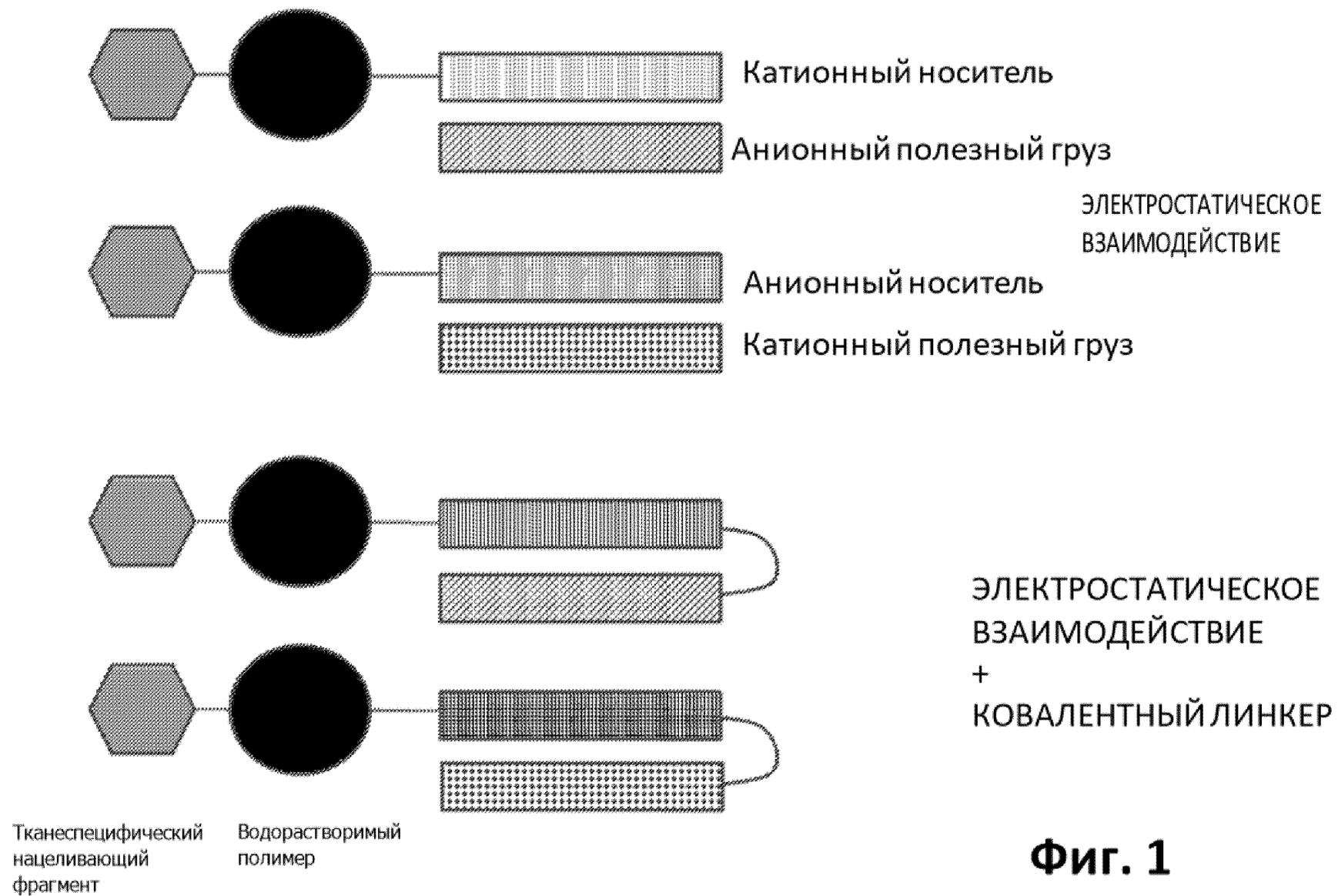
48. Мицелла по любому из пп. 36–46, в которой положительные заряды фрагмента катионного носителя молекулы катионного носителя и отрицательные заряды анионной полезной нагрузки в мицелле находятся в соотношении ионов около 3:1, около 2,9:1, около 2,8:1, около 2,7:1, около 2,6:1, около 2,5:1, около 2,4:1, около 2,3:1, около 2,2:1, около 2,1:1, около 1:2,1, около 1:2,2, около 1:2,3, около 1:2,4, около 1:2,5, около 1:2,6, около 1:2,7, около 1:2,8, около 1:2,9 или около 1:3.

49. Мицелла по п. 48, в которой положительные заряды фрагмента катионного носителя молекулы катионного носителя и отрицательные заряды анионной полезной нагрузки в мицелле находятся в соотношении зарядов около 1: 1.
50. Мицелла по любому из пп. 38–49, в которой диаметр мицеллы составляет от около 1 нм до 100 нм, от около 10 нм до около 100 нм, от около 10 нм до около 90 нм, от около 10 нм до около 80 нм, от около 10 нм до около 70 нм, от около 20 нм до около 100 нм, от около 20 нм до около 90 нм, от около 20 нм до около 80 нм, от около 20 нм до около 70 нм, от около 30 нм до около 100 нм, от около 30 нм до около 90 нм, от около 30 нм до около 80 нм, от около 30 нм до около 70 нм, от около 40 нм до около 100 нм, от около 40 нм до около 90 нм, от около 40 нм до около 80 нм или от около 40 нм до около 70 нм.
51. Мицелла по любому из пп. 38–50, в которой анионная полезная нагрузка содержит нуклеиновую кислоту.
52. Мицелла по п. 51, в которой нуклеиновая кислота содержит мРНК, миРНК, миРНК-губку, прочную миРНК-ловушку, антимир, малую РНК, рРНК, киРНК, кшРНК, гДНК, кДНК, пДНК, ПНК, МНК, антисмысловой олигонуклеотид (ASO), аптамер, циклический динуклеотид или любую их комбинацию.
53. Мицелла по любому из пп. 1–52, в которой нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере один аналог нуклеозида.
54. Мицелла по любому из пп. 53, в которой аналог нуклеозида содержит закрытую нуклеиновую кислоту (LNA); 2'-0-алкил-РНК; 2'-амино-ДНК; 2'-фтор-ДНК; арабинонуклеиновую кислоту (ANA); 2'-фтор-ANA, гекситолнуклеиновую кислоту (HNA), интеркалирующую нуклеиновую кислоту (INA), затрудненный этилом нуклеозид (сEt), 2'-0-метилнуклеиновую кислоту (2'-OMe), 2'-0-метоксиэтилнуклеиновую кислоту (2'-MOE) или любую их комбинацию.
55. Мицелла по любому из пп. 51–54, в которой нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность длиной от 5 до 30 нуклеозидов.
56. Мицелла по п. 55, в которой нуклеотидная последовательность имеет длину в 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 нуклеотидов.
57. Мицелла по п. 55 или п. 56, в которой нуклеотидная последовательность имеет остов, содержащий фосфодисложноэфирную связь, фосфотрисложноэфирную связь, метилфосфонатную связь, фосфорамидатную связь, фосфотиоатную связь и их комбинации.
58. Мицелла по любому из пп. 38–57, в которой молекула катионного носителя дополнительно содержит нацеливающий фрагмент, который связан с водорастворимым полимером необязательно посредством линкера.
59. Мицелла по п. 58, в которой нацеливающий фрагмент способен нацеливать на ткань.

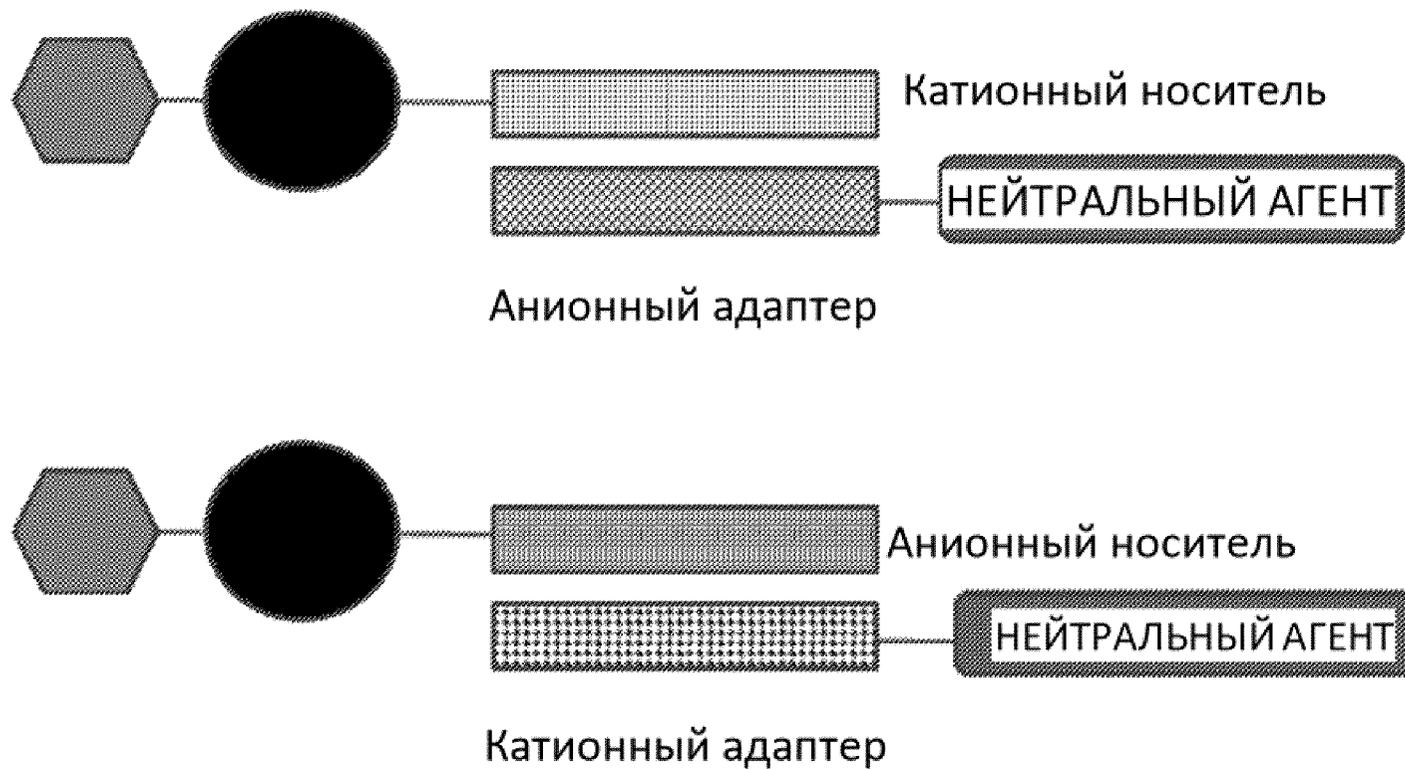
60. Мицелла по п. 59, для которой ткань представляет собой печень, головной мозг, почку, легкое, яичник, поджелудочную железу, щитовидную железу, молочную железу, желудок или любую их комбинацию.
61. Мицелла по п. 59, для которой ткань представляет собой ткань злокачественной опухоли.
62. Мицелла по п. 59, для которой ткань представляет собой печень.
63. Мицелла по п. 62, для которой нацеливающий фрагмент содержит холестерин.
64. Мицелла по п. 59, для которой ткань представляет собой поджелудочную железу.
65. Мицелла по п. 59, в которой нацеливающий фрагмент содержит лиганд, нацеленный на интегрин.
66. Мицелла по п. 59, в которой нацеливающий фрагмент нацеливает на центральную нервную систему.
67. Мицелла по п. 66, в которой нацеливающий фрагмент способен транспортироваться переносчиком крупных нейтральных аминокислот типа 1 (LAT1).
68. Мицелла по п. 67, в которой нацеливающий фрагмент представляет собой аминокислоту.
69. Мицелла по п. 68, в которой нацеливающий фрагмент содержит аминокислоту с разветвленной цепью или ароматическую аминокислоту.
70. Мицелла по п. 68, в которой аминокислота представляет собой валин, лейцин и/или изолейцин.
71. Мицелла по п. 68, в которой аминокислота представляет собой триптофан и/или тирозин.
72. Композиция, содержащая молекулу катионного носителя по любому из пп. 1–37 и отрицательно заряженную молекулу.
73. Фармацевтическая композиция, содержащая молекулу катионного носителя по любому из пп. 1–37, композицию по п. 72 или мицеллу по любому из пп. 38–71, а также фармацевтически приемлемый носитель.
74. Способ получения молекулы катионного носителя по любому из пп. 1–37, включающий в себя синтез молекулы катионного носителя.
75. Способ получения мицеллы по любому из пп. 38–71, включающий в себя смешивание молекулы катионного носителя с отрицательно заряженной молекулой в соотношении ионов 1:1 в растворе.
76. Способ получения мицеллы по любому из пп. 38–71, включающий в себя смешивание молекулы катионного носителя с отрицательно заряженной молекулой в соотношении ионов от около 1:3 до около 3:1 в растворе.

77. Способ по п. 76, дополнительно включающий в себя очистку мицеллы.
78. Способ лечения заболевания или патологического состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий в себя введение субъекту мицеллы по любому из пп. 38–71.
79. Способ по п. 78, в котором анионная полезная нагрузка в сердцевине мицеллы имеет более длительное время полужизни, чем соответствующая анионная полезная нагрузка, не включенная в мицеллу.
80. Способ по п. 78 или п. 79, в котором субъект представляет собой млекопитающее.
81. Способ лечения злокачественного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества мицеллы по любому из пп. 38–71.
82. Способ по п. 81, в котором злокачественное заболевание представляет собой глиому, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак печени, рак кожи или рак шейки матки.
83. Способ по п. 82, в котором рак поджелудочной железы представляет собой аденокарциному поджелудочной железы.
84. Способ уменьшения воспаления у нуждающегося в этом субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества мицеллы по любому из пп. 38–71.
85. Способ восстановления и/или индуцирования нейрогенеза у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества мицеллы по любому из пп. 38–71.
86. Способ улучшения когнитивной функции у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества мицеллы по любому из пп. 38–71.
87. Способ по любому из пп. 84–86, в котором нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера.
88. Способ уменьшения выраженности амилоидных бляшек у субъекта, страдающего болезнью Альцгеймера, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества мицеллы по любому из пп. 38–71.
89. Способ по любому из пп. 84–88, в котором мицелла содержит молекулу катионного носителя, нацеленную на LAT1, и полезная нагрузка, содержащая антисмысловой олигонуклеотид с SEQ ID NO: 18 или его фрагмент, вариант или производное.
90. Способ по п. 89, в котором фрагмент содержит 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 последовательный нуклеотид с SEQ ID NO: 18.

91. Способ по п. 89, в котором вариант имеет последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную SEQ ID NO: 18.
92. Способ по п. 89, в котором производное содержит по меньшей мере одну модификацию сахара и/или по меньшей мере одну модификацию остова.



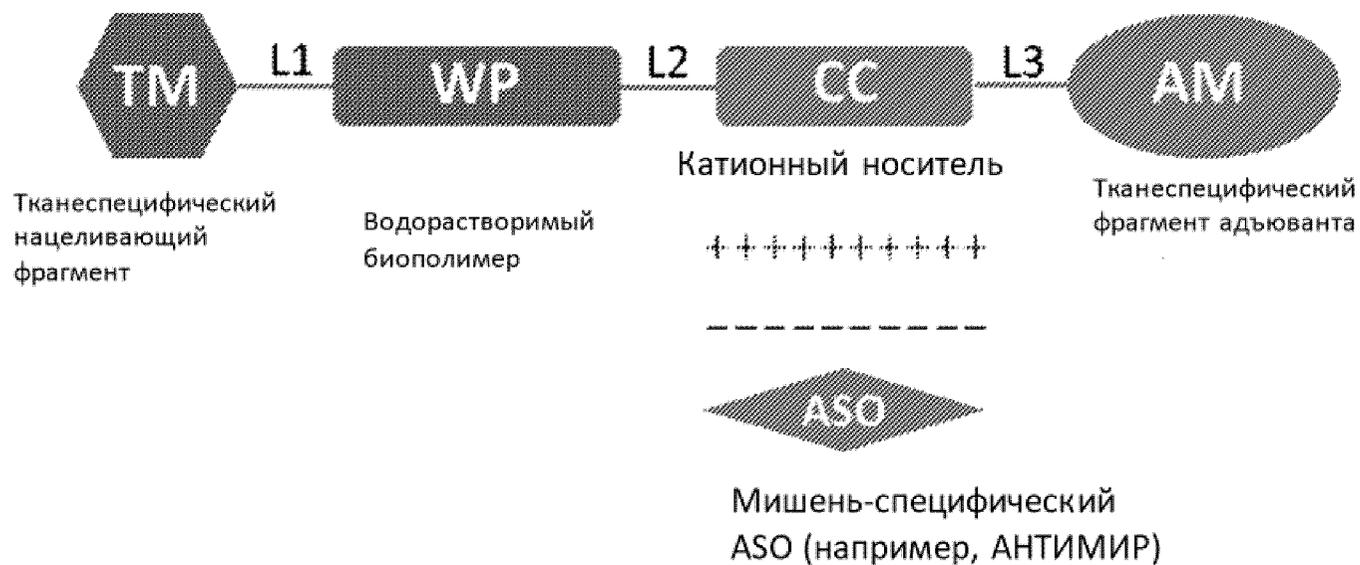
Фиг. 1



Фиг. 2

Молекула катионного носителя

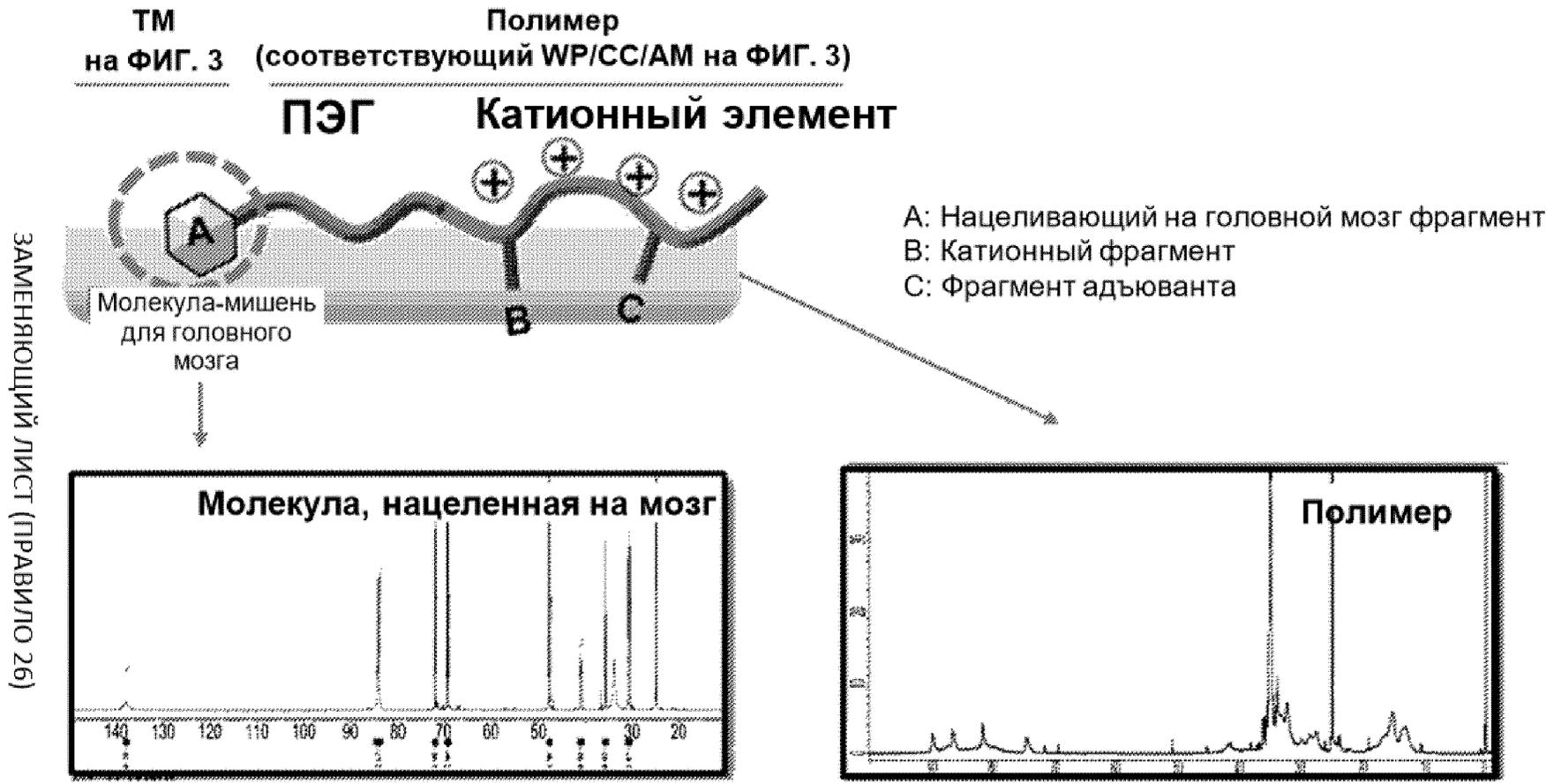
L1, L2, L3 — фрагменты факультативных линкеров (каждый из фрагментов может содержать один или более линкеров, которые могут быть одинаковыми или отличаться)



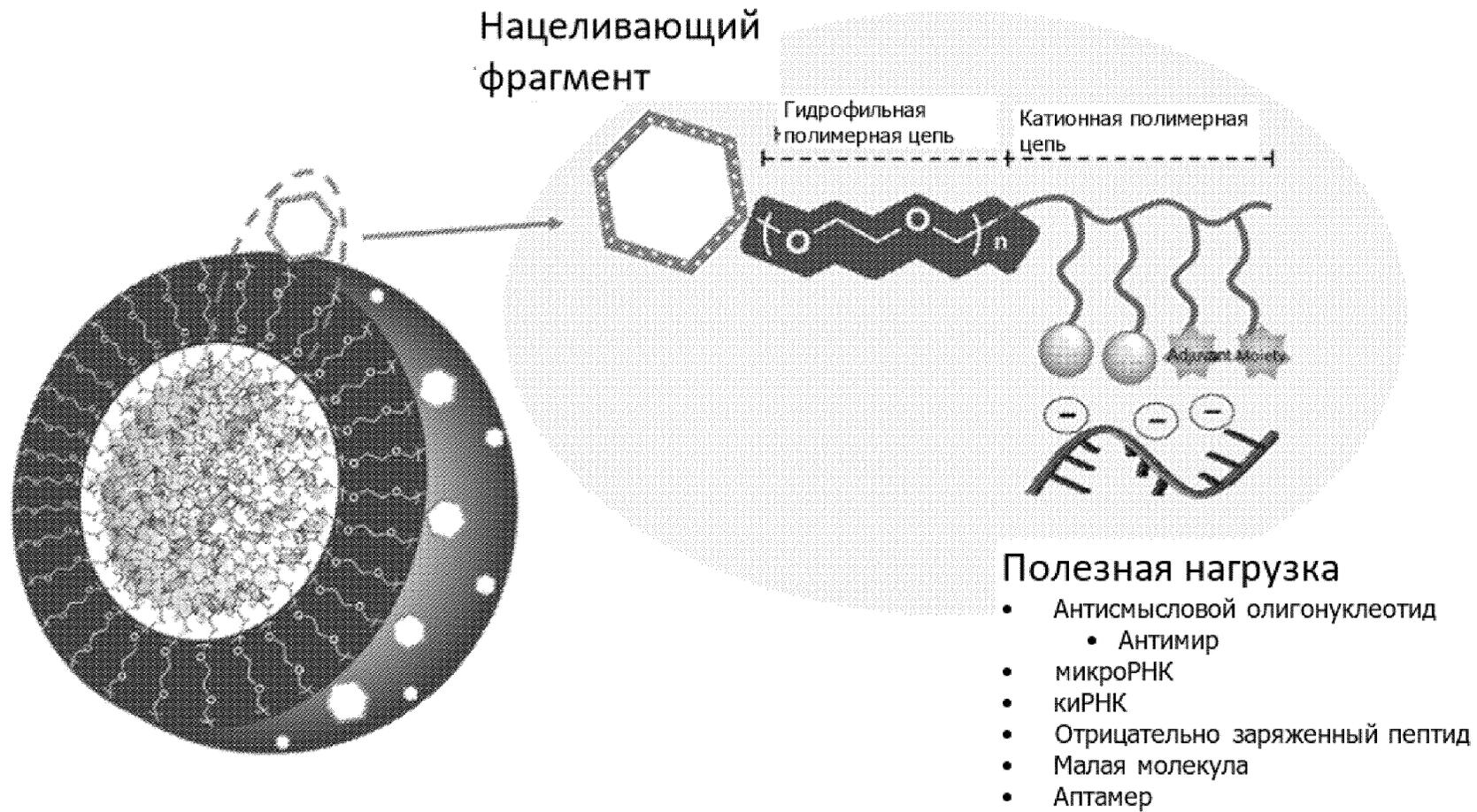
3/30

Анионный полезный груз

Фиг. 3



Фиг. 4

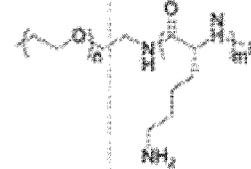


Фиг. 5

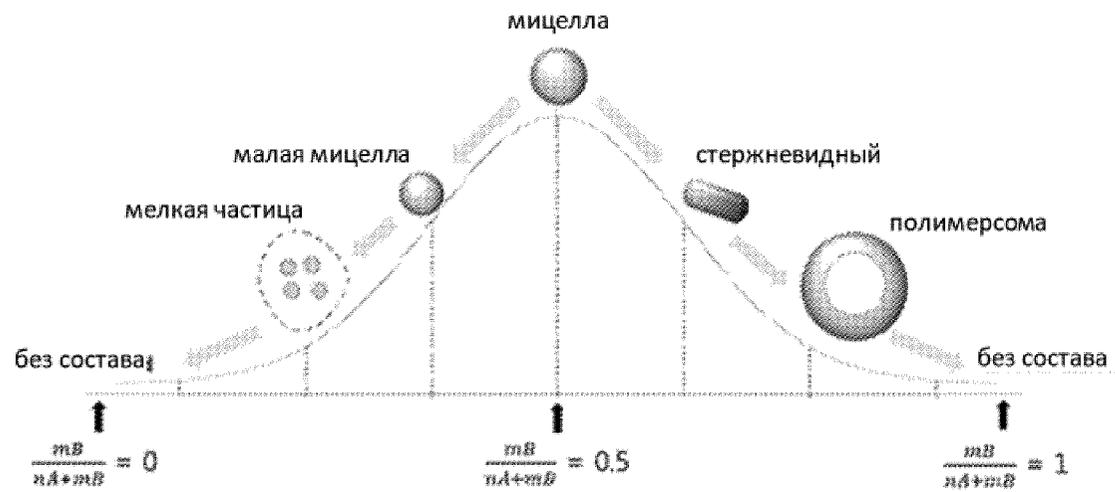
ФОРМУЛА:

$$0 < \frac{mB}{nA+mB} < 1$$

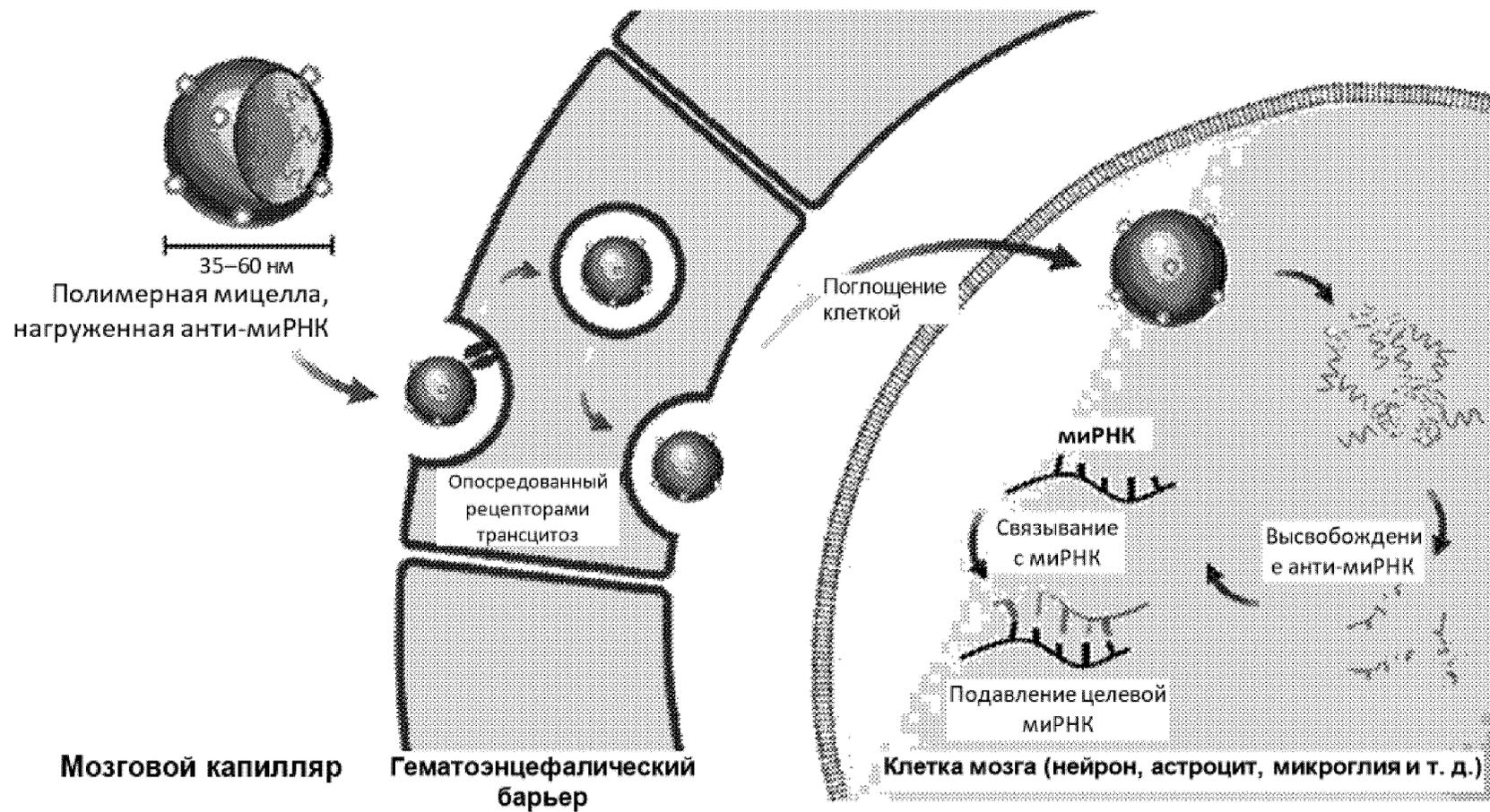
$$nA = \sum_{i=0}^{1000} PEG$$



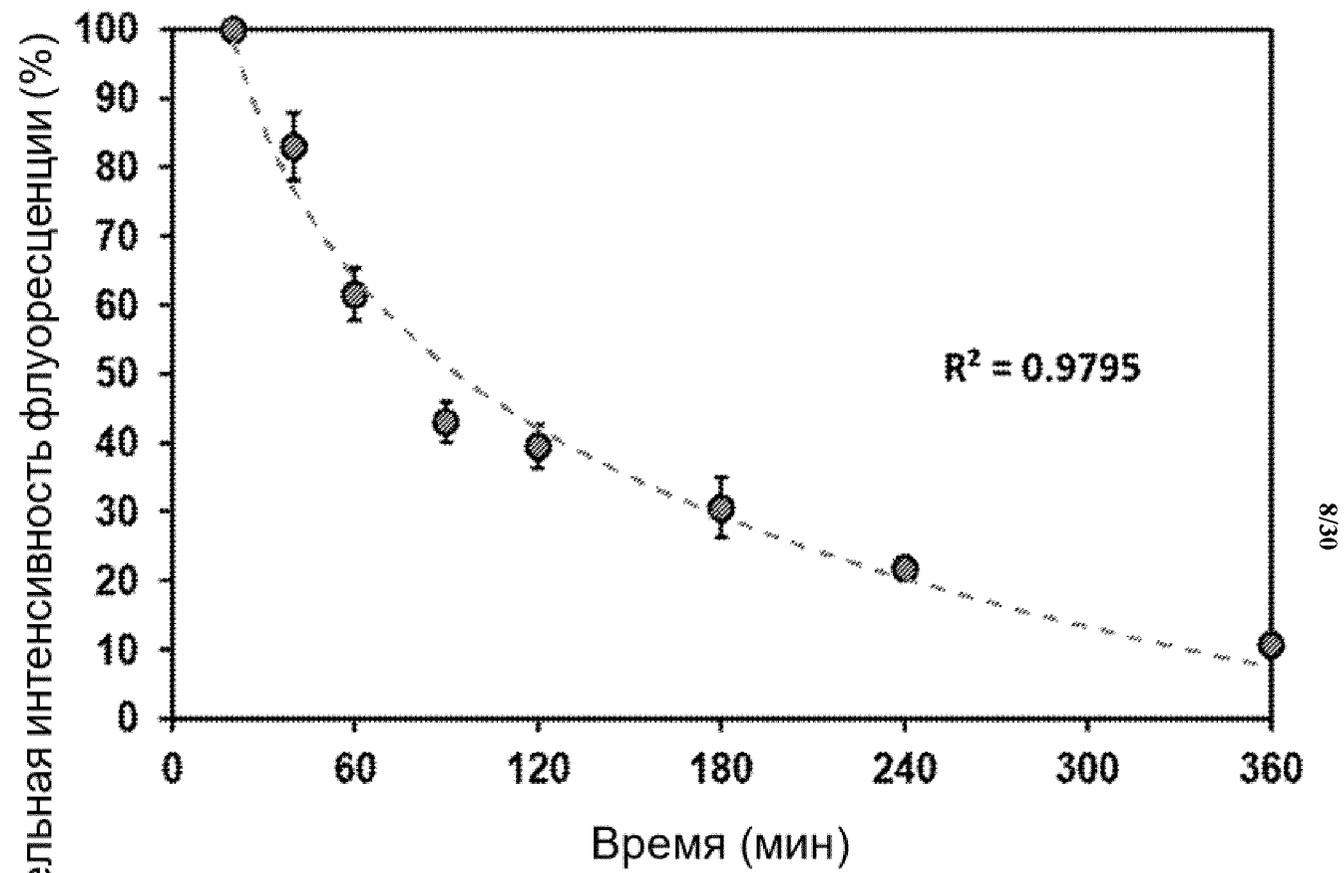
$$mB = \sum_{i=0}^{1000} Lys$$



Фиг. 6

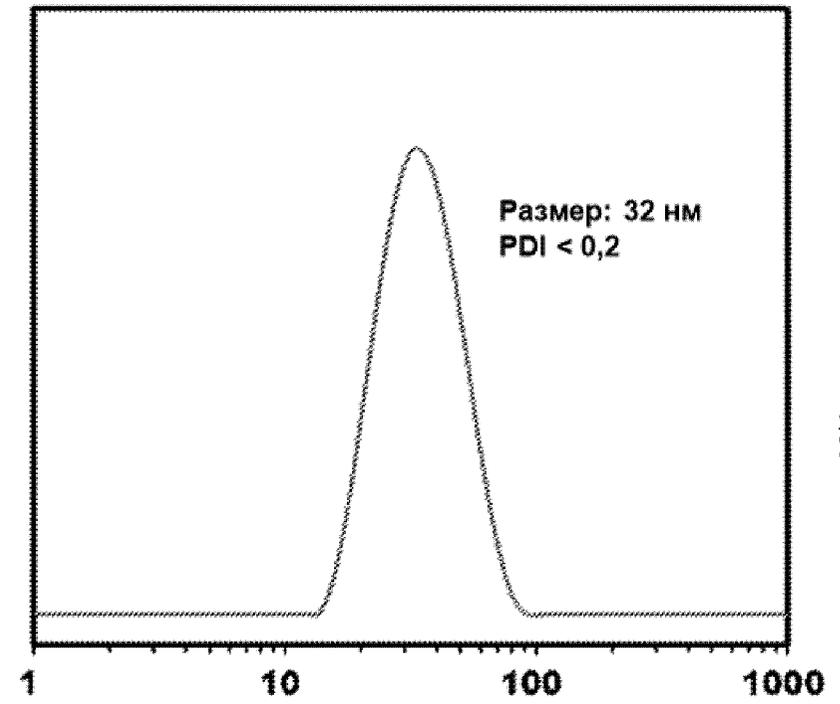


Фиг. 7



8/30

Фиг. 8

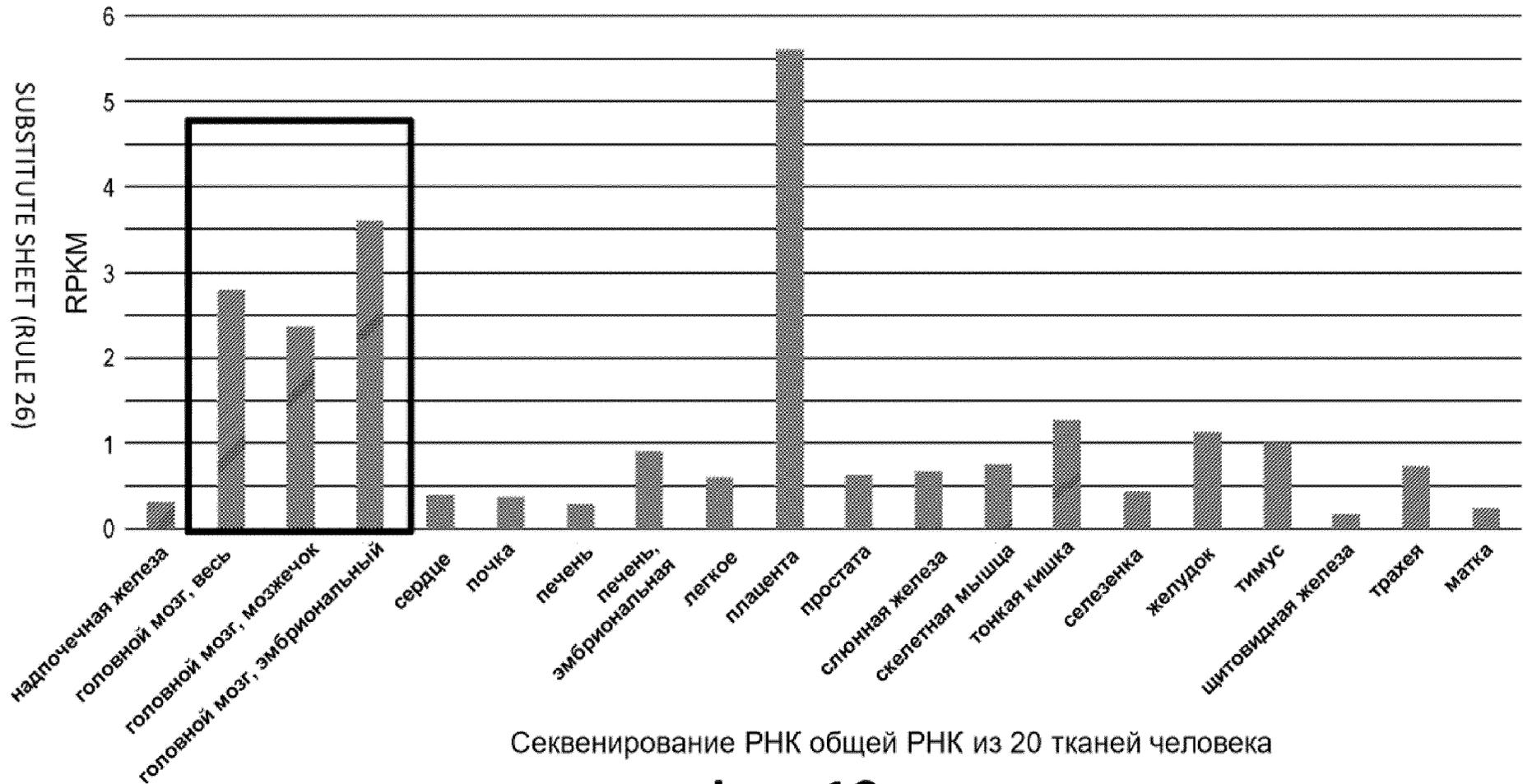


Фиг. 9

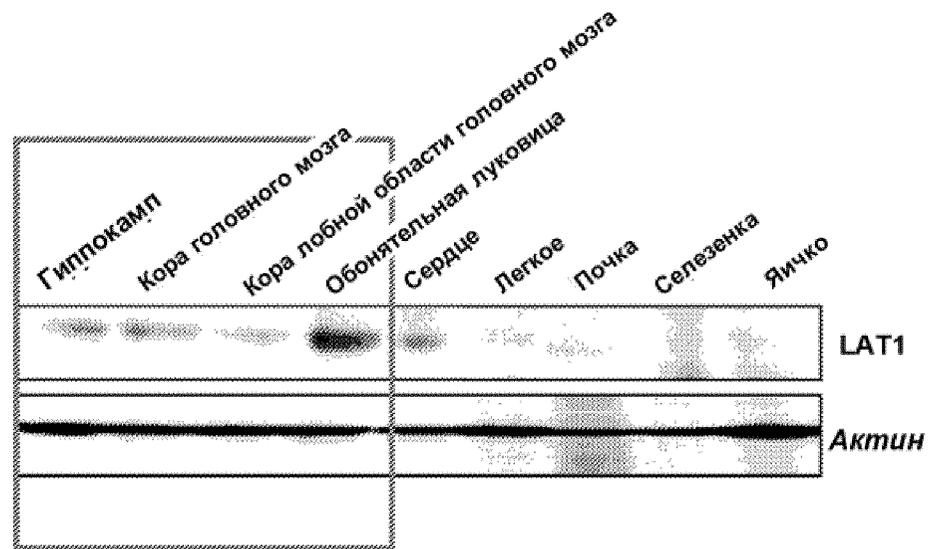
член 5 семейства 7 переносчиков растворенных веществ SLC7A5 [*Homo sapiens* (человек)]
№ гена: 8140, обновлено 5 мая 2019 г.

Секвенирование РНК общей РНК из 20 тканей человека

- Название проекта Секвенирование РНК общей РНК из 20 тканей человека
- Описание: Секвенирование РНК общей РНК из 20 тканей человека

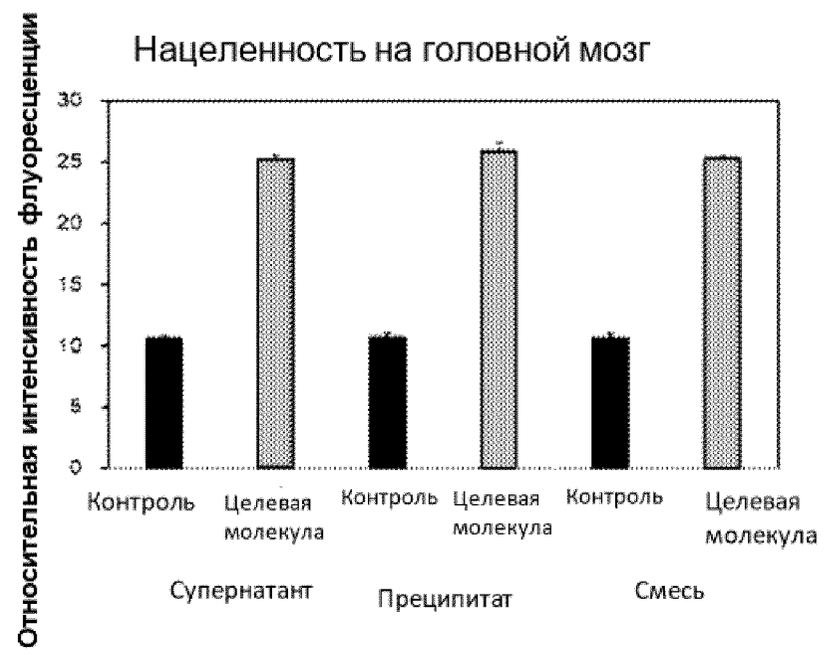
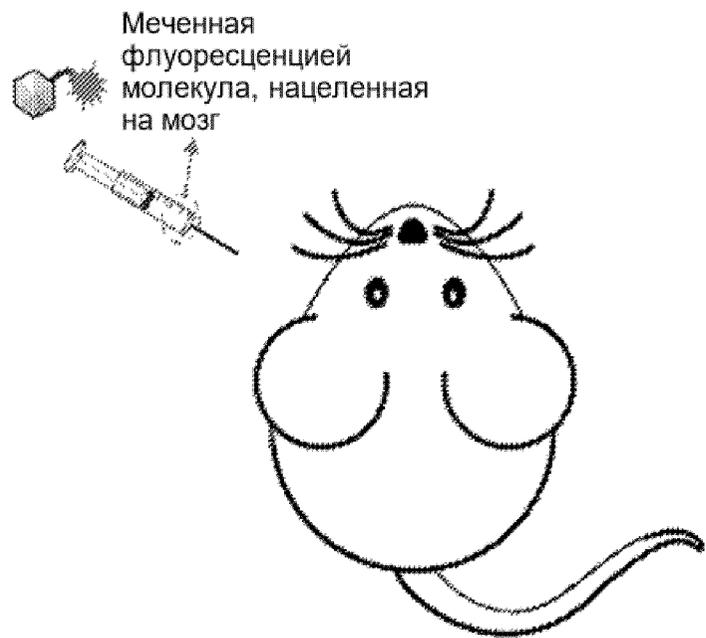


Фиг. 10

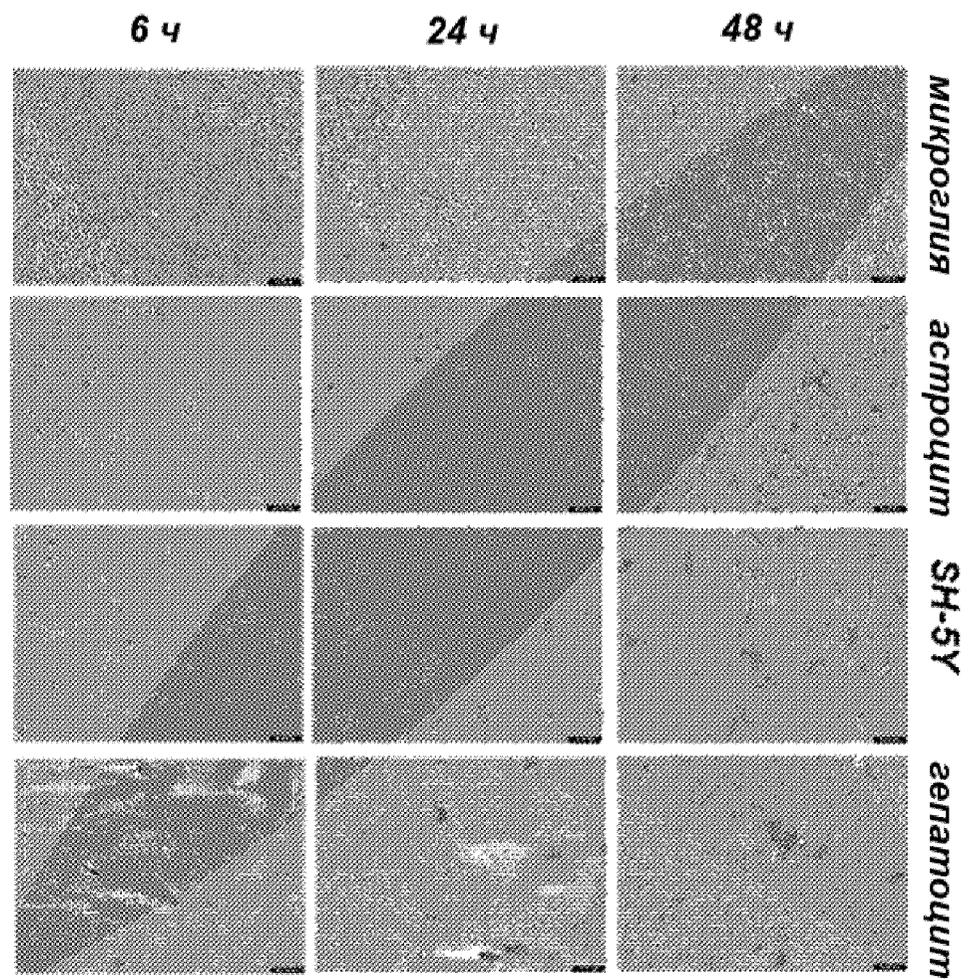


11/30

Фиг. 11

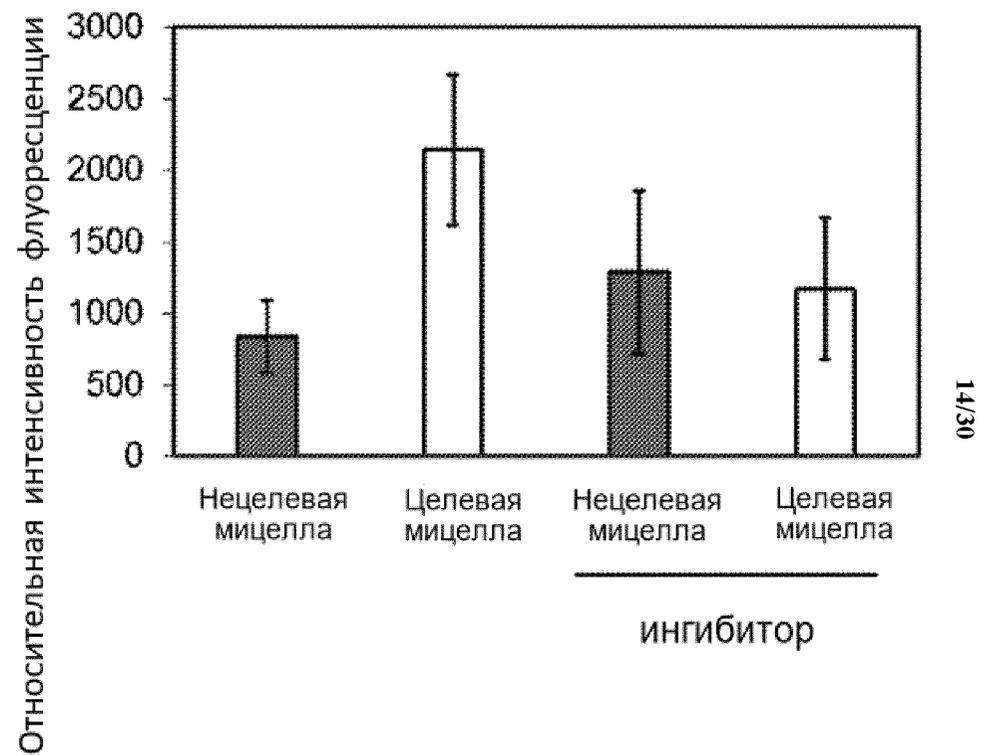


Фиг. 12

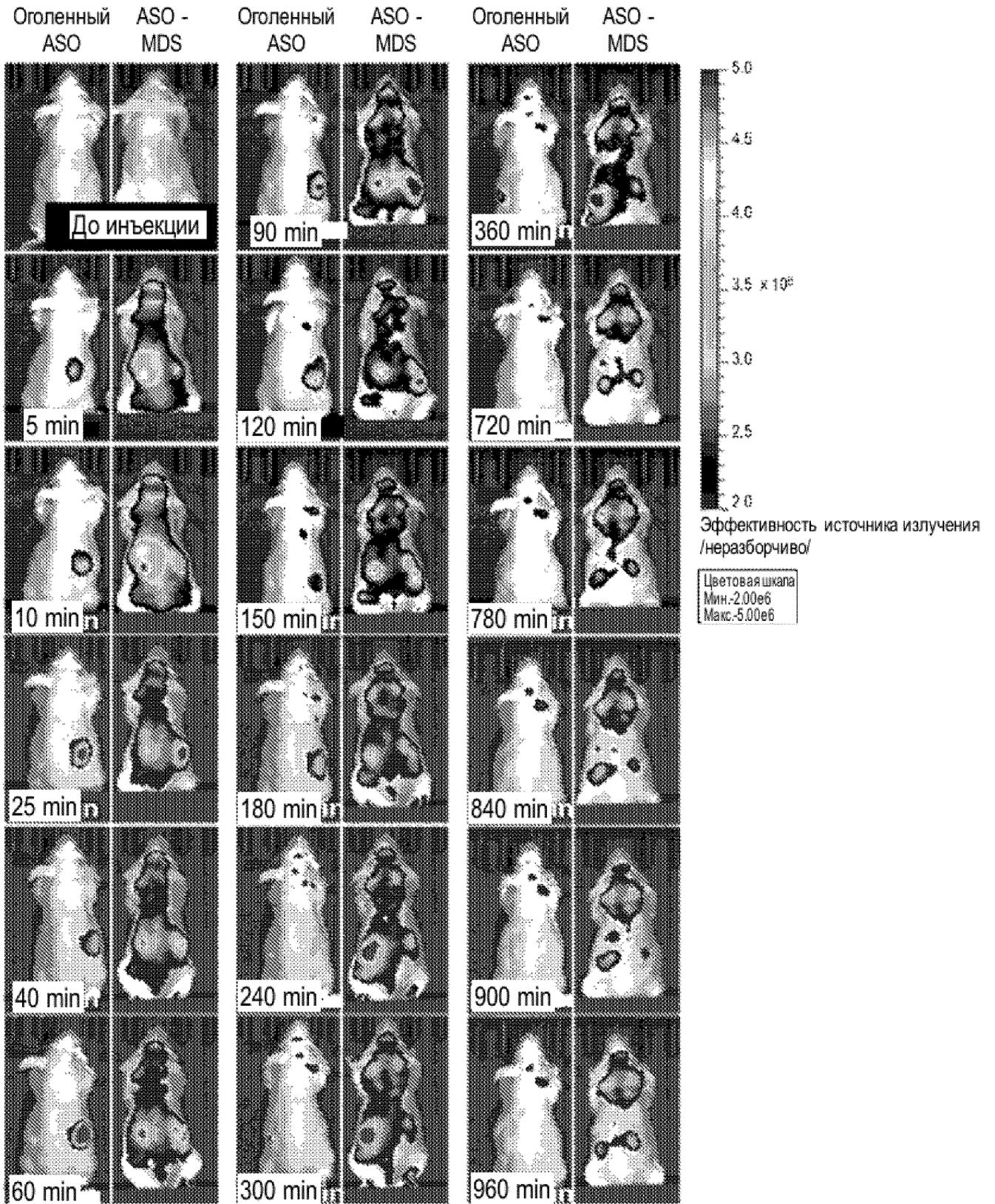


13/30

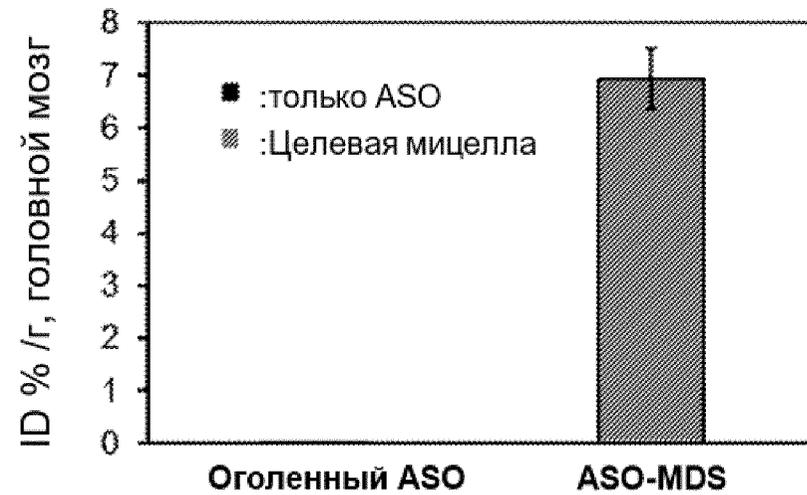
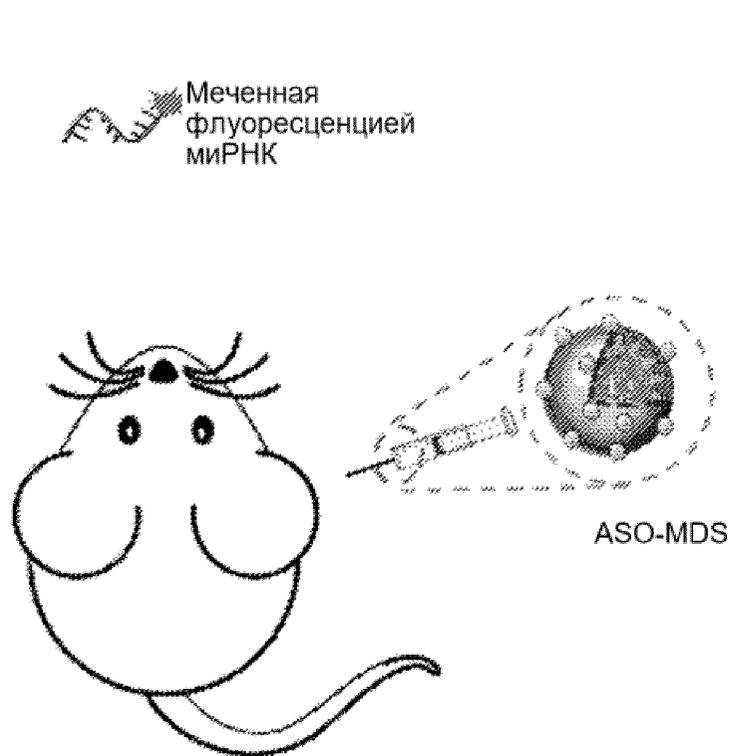
Фиг. 13



Фиг. 14

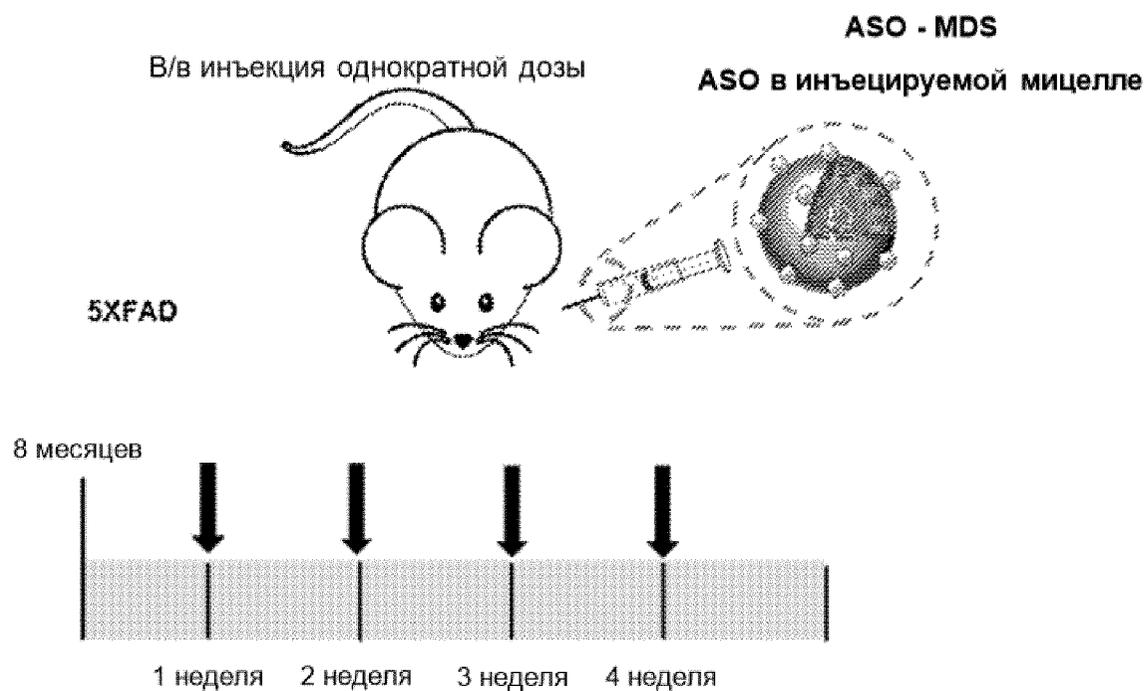


Фиг. 15



16/30

Фиг. 16



Исследование трансгенных мышей при в/в инъекции.

Схематическое изображение экспериментальной процедуры. ASO в мицелле вводили еженедельно в течение 4 недель 8-месячным мышам 5XFAD.

Фиг. 17

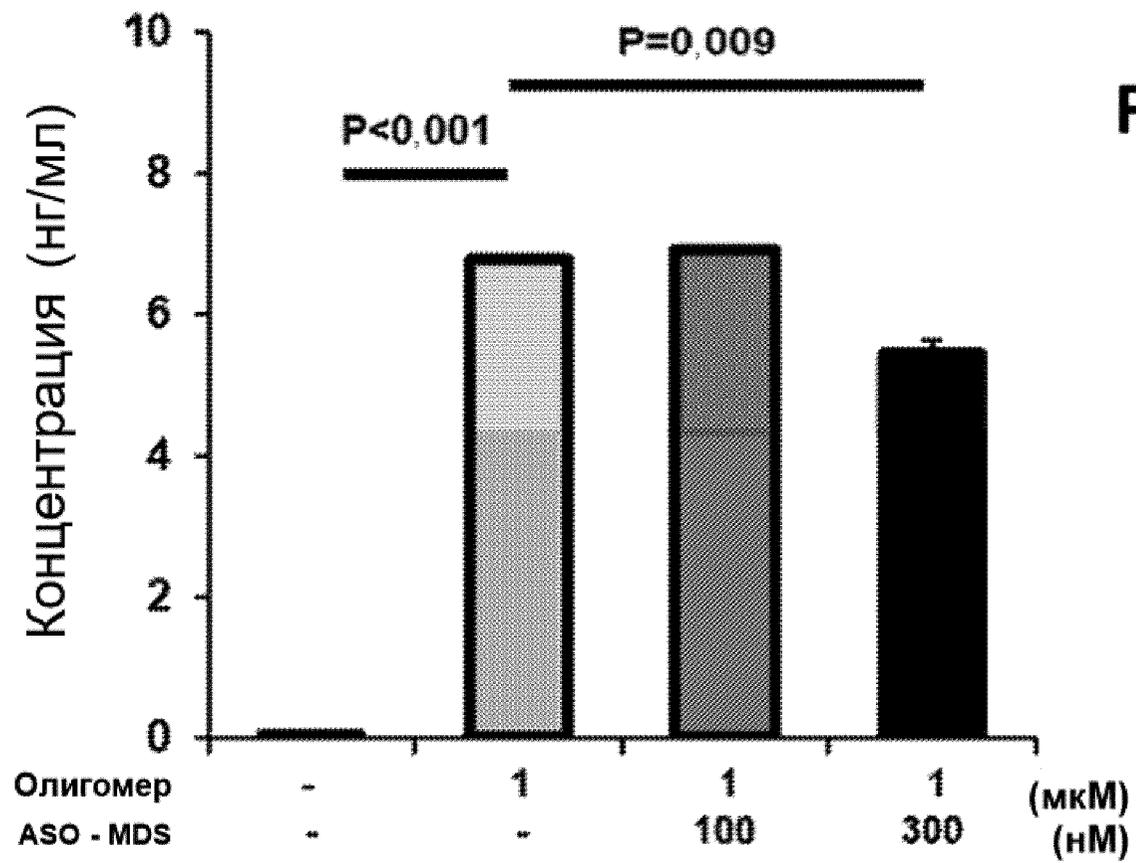


FIG.18A

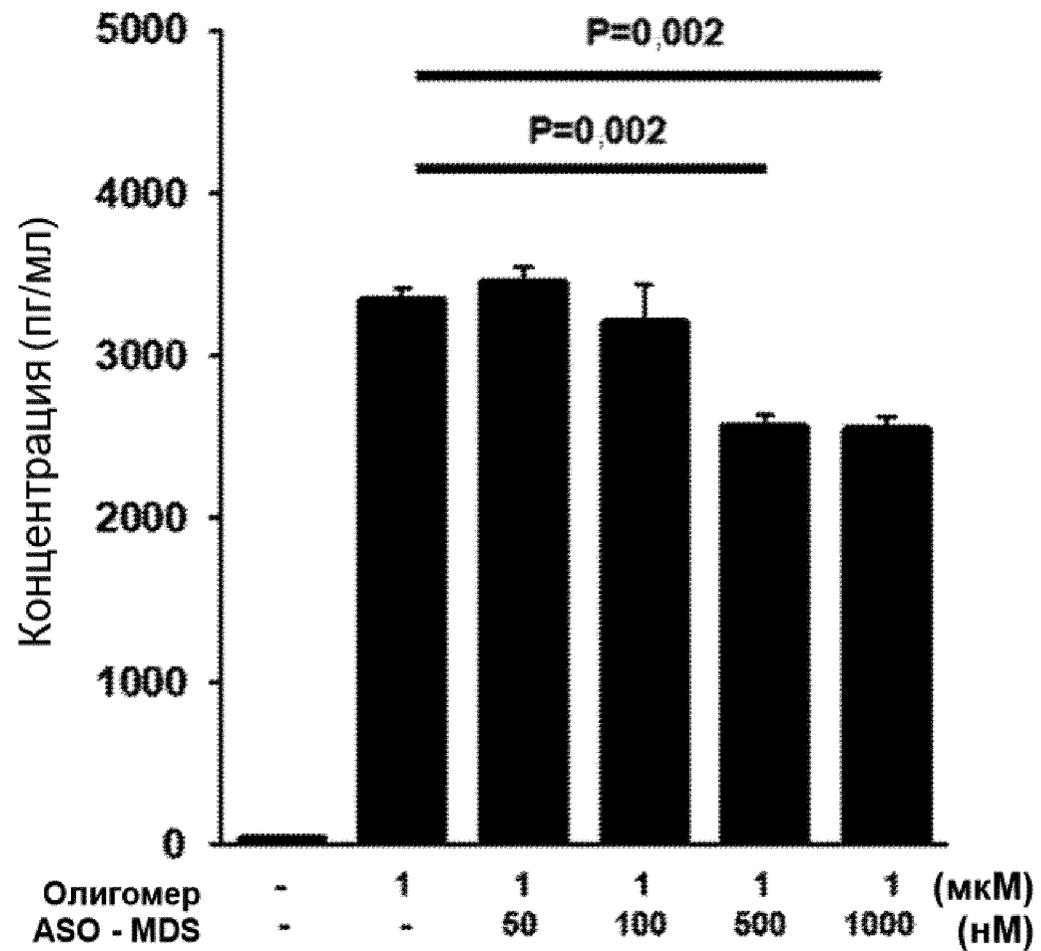
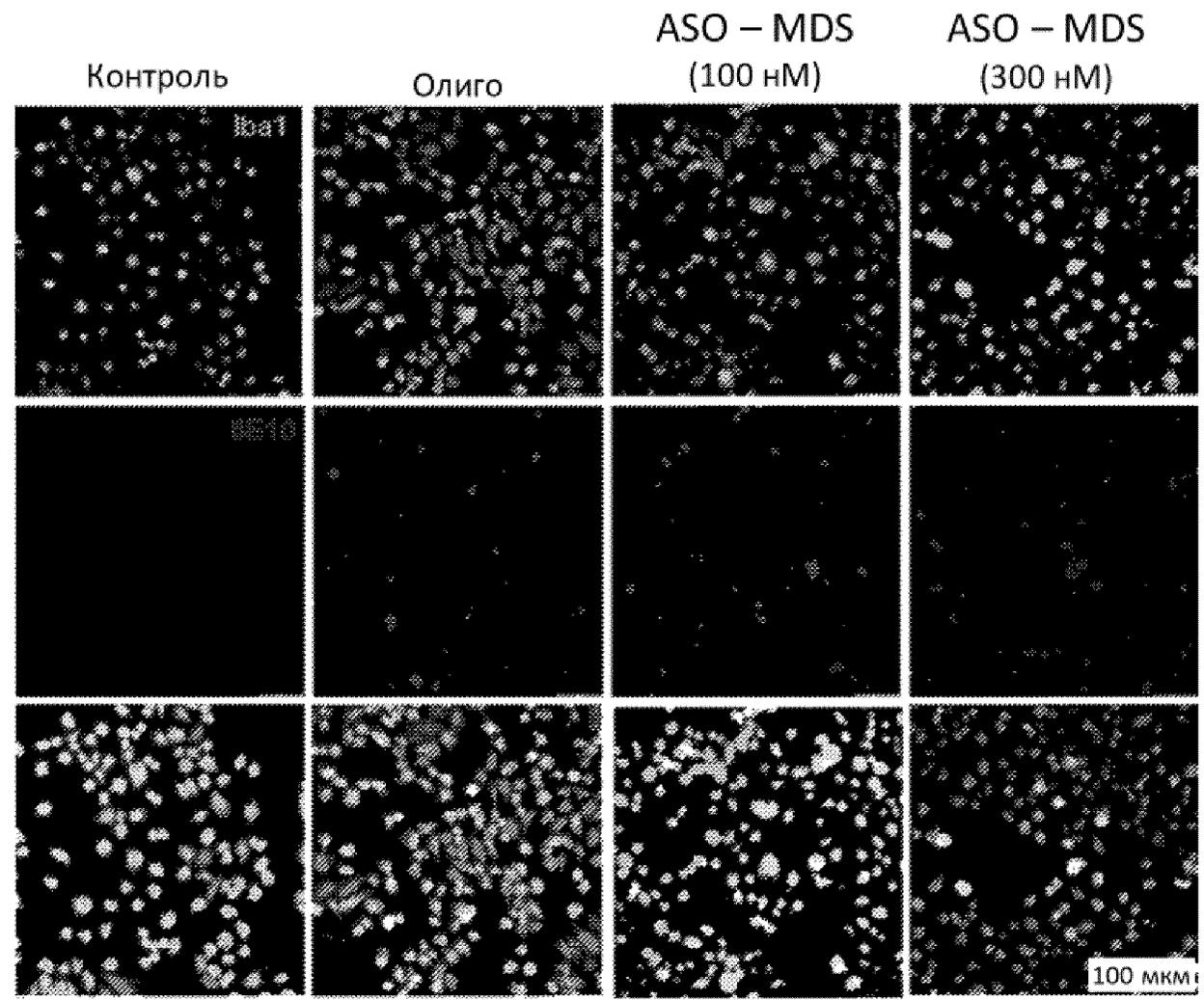


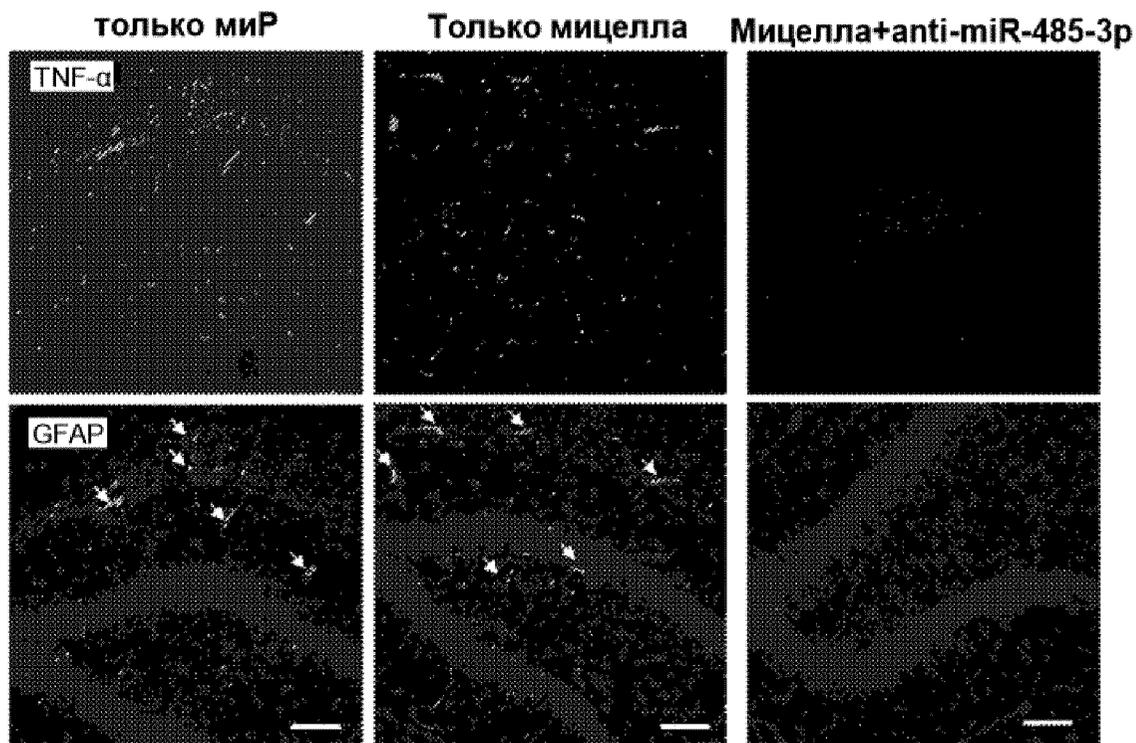
FIG.18B



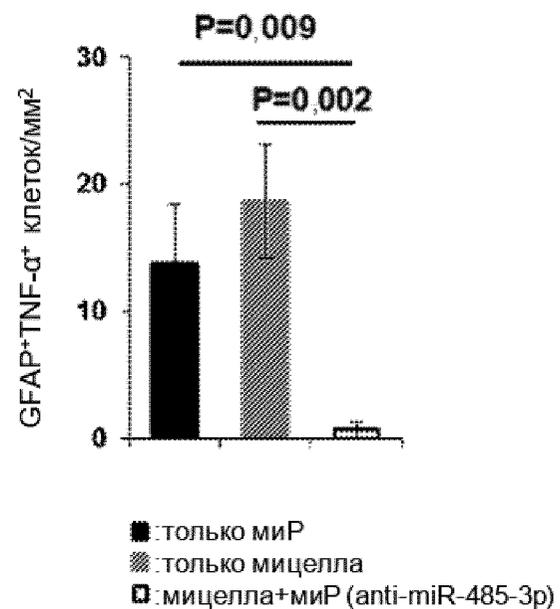
20/30

FIG.18C

Гиппокамп

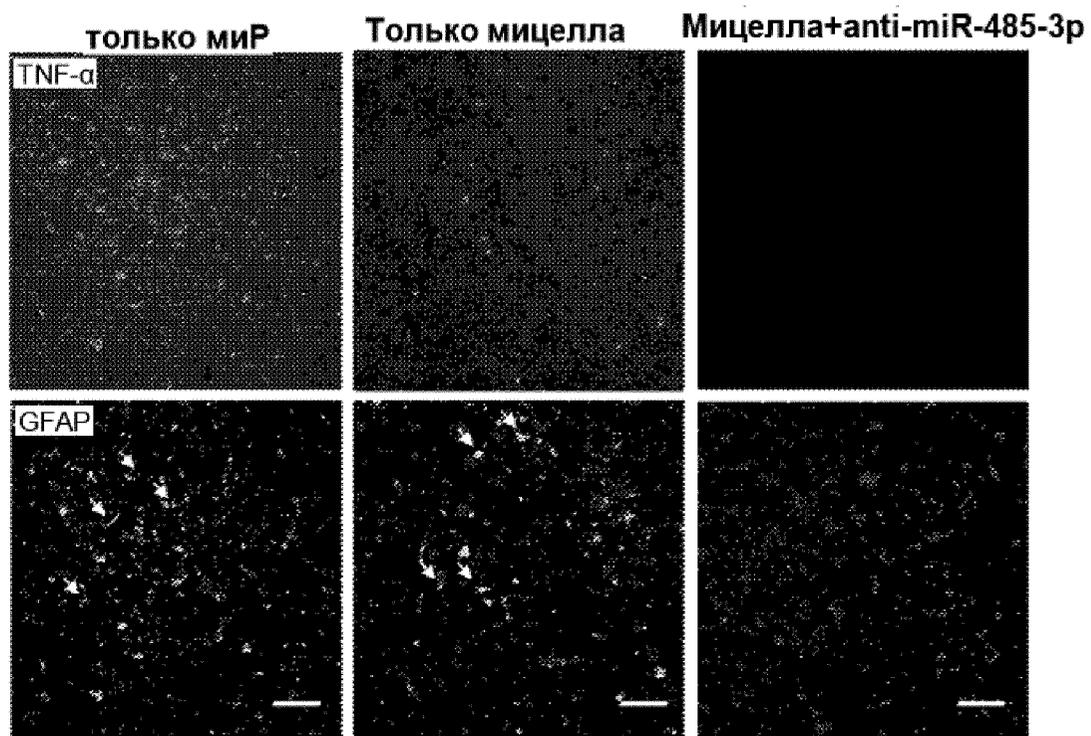


Фиг. 19А

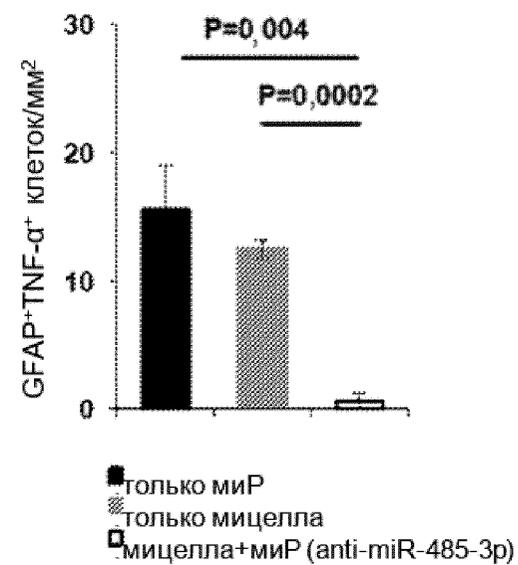


Фиг. 19В

Кора головного мозга

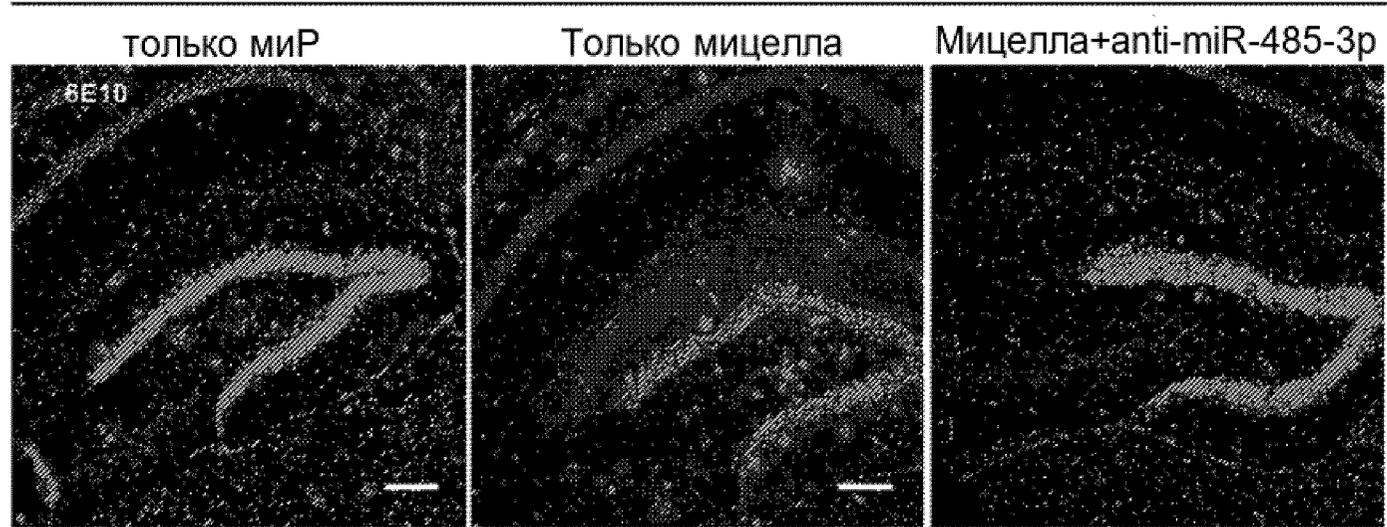


Фиг. 20А



Фиг. 20В

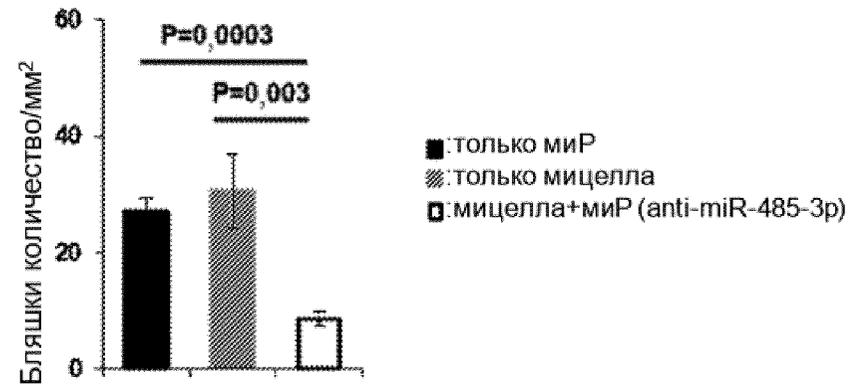
Гиппокамп



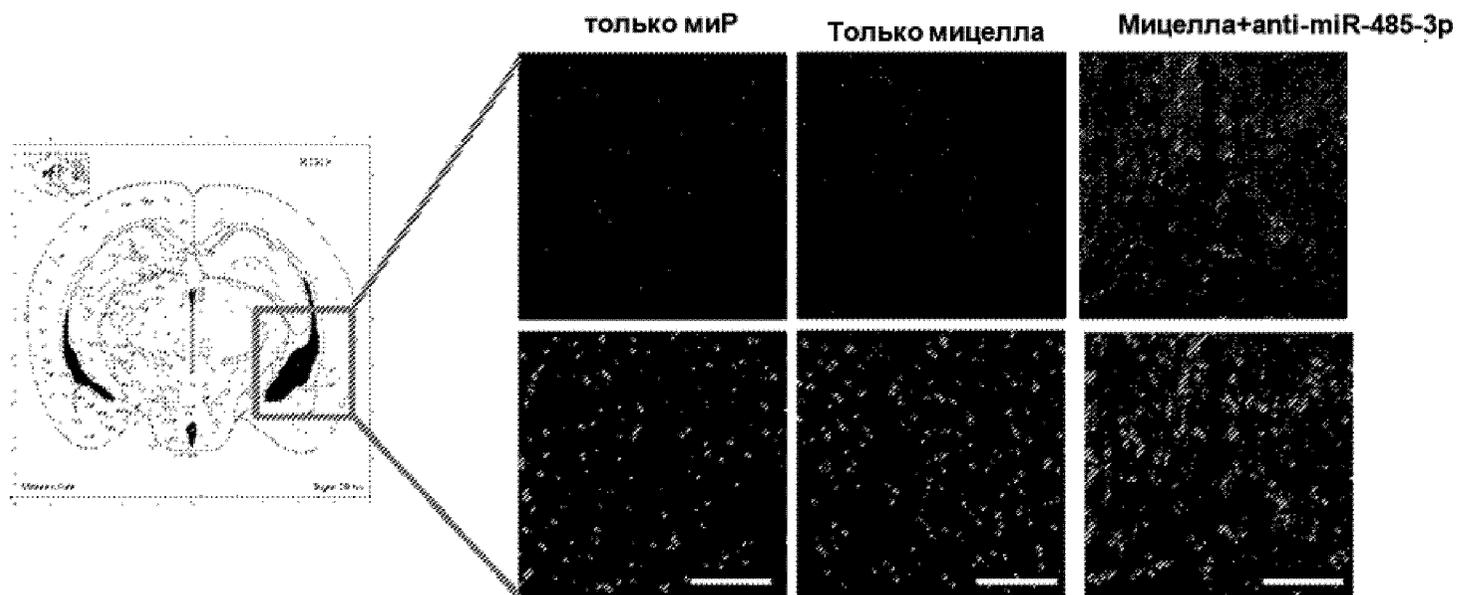
23/30

Фиг. 21А

Фиг. 21В

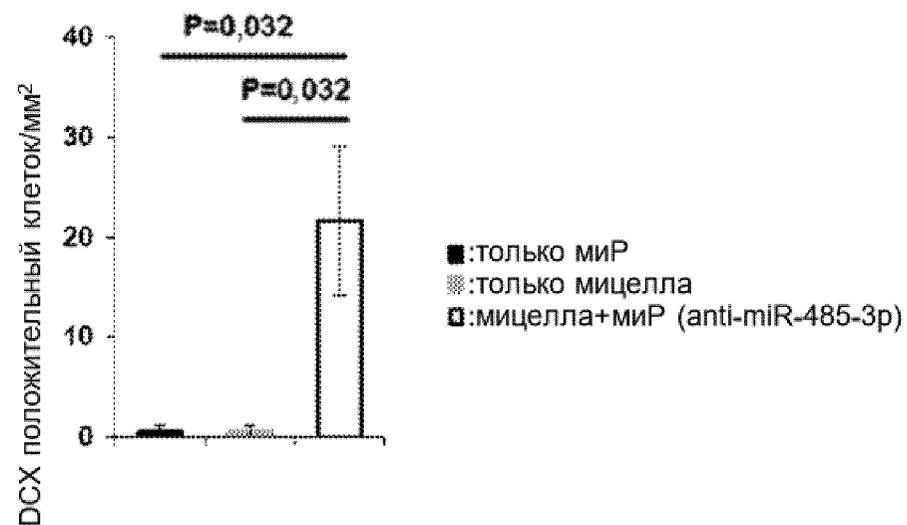


DCX (маркер нейрогенеза) в БЖ (боковом желудочке)

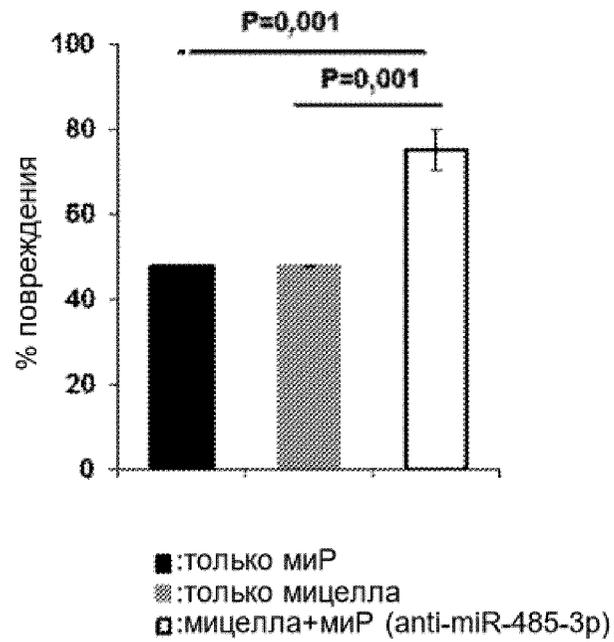


Фиг. 22А

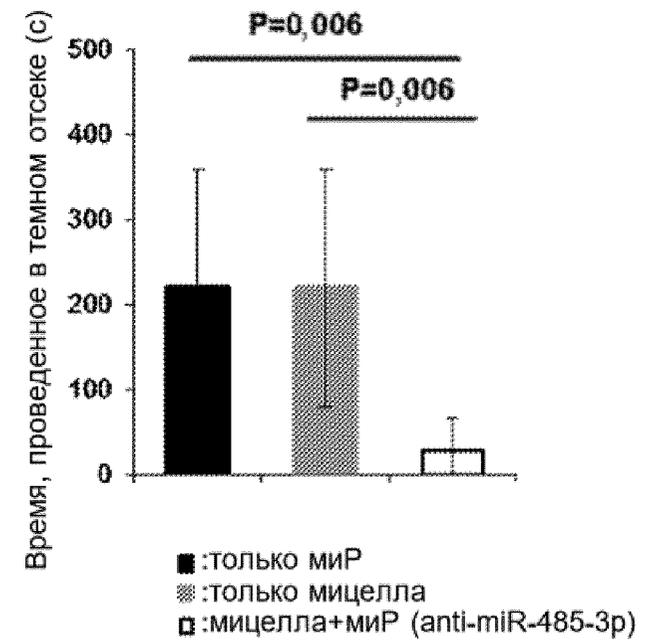
Фиг. 22В



Фиг. 23А



Фиг. 23В



miRNA 485-3p при болезни Альцгеймера

Нейродегенеративное
заболевание

miRNA-485-3p

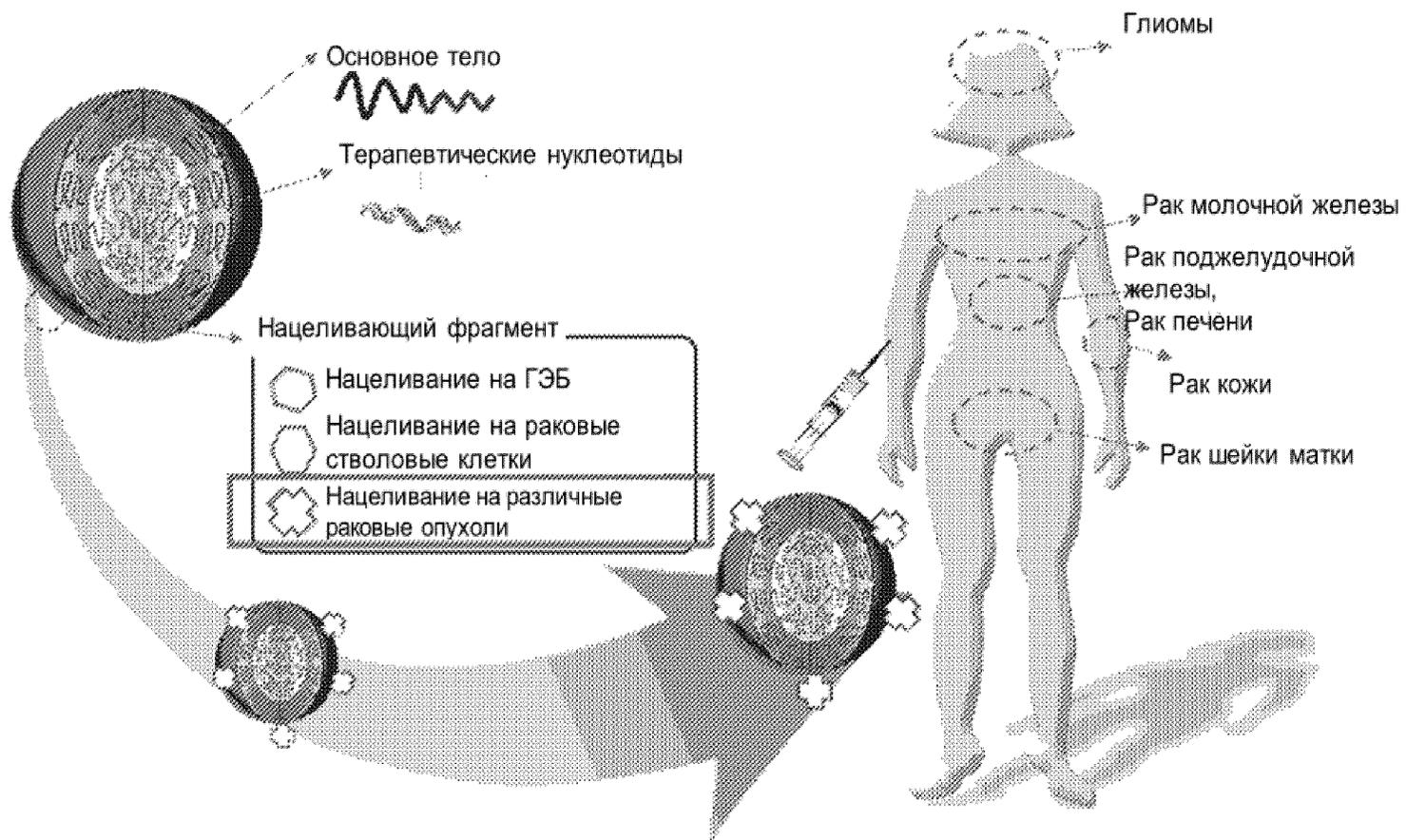
Мишень miRNA-485-3p

Воспаление

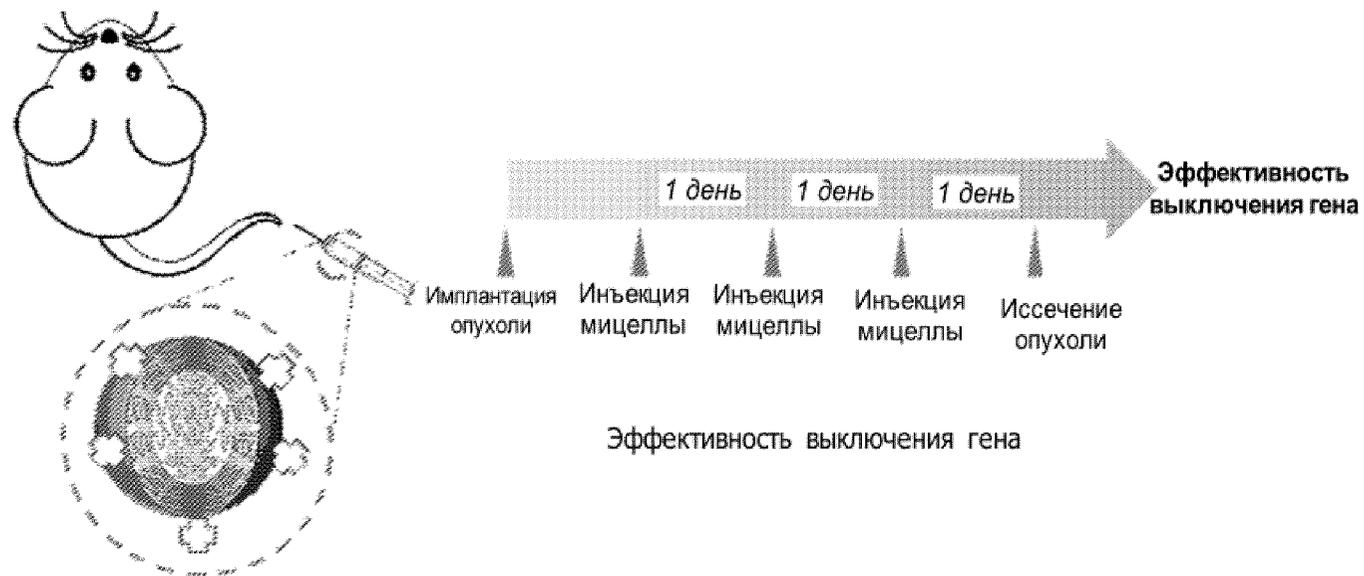
Функция
митохондрий

Апоптоз

Фиг. 24

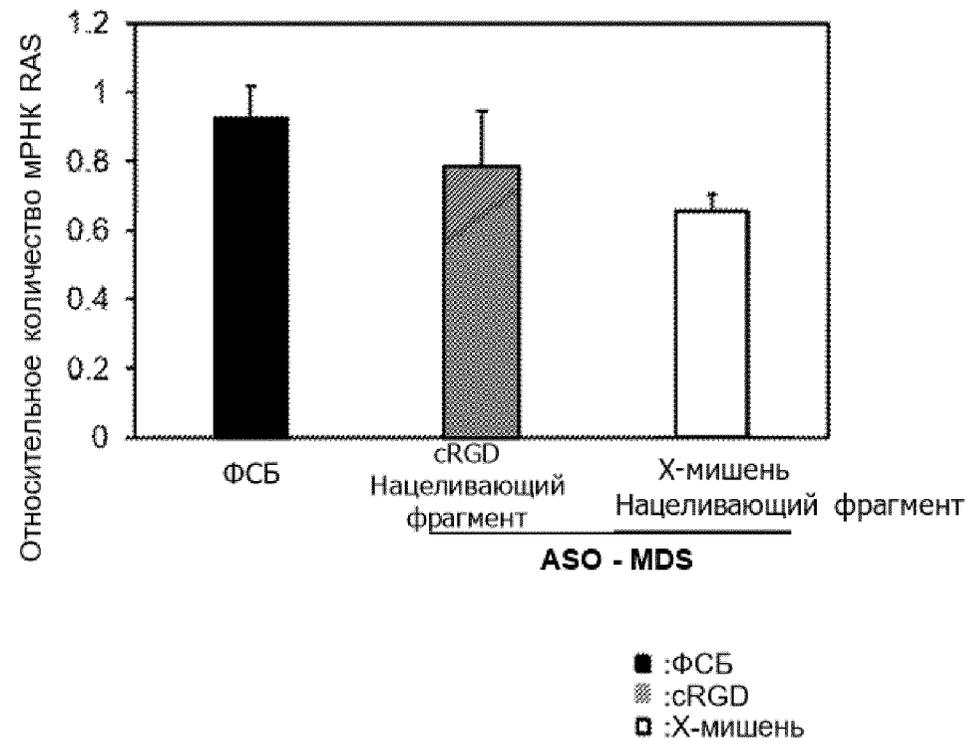


Фиг. 25

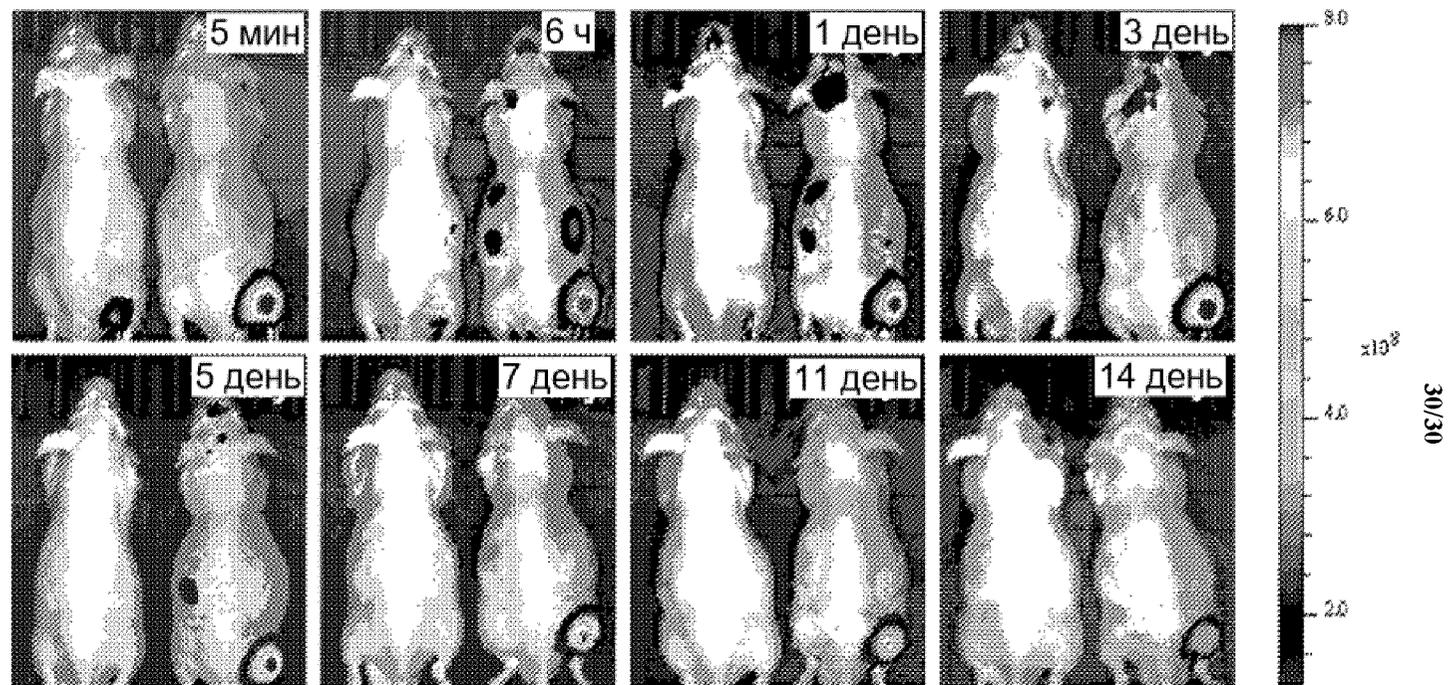


Мицеллы, нагруженные K-Ras олигонуклеотидами

Фиг. 26А



Фиг. 26В



Фиг. 27