

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292981** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.02

(51) Int. Cl. **C07K 7/64** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.04.28

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДОСТАВКИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СРЕДСТВ

(31) 63/017,281

(32) 2020.04.29

(33) US

(86) PCT/US2021/029528

(87) WO 2021/222336 2021.11.04

(71) Заявитель:
МЕДИММЬОН, ЭЛЭЛСИ (US)

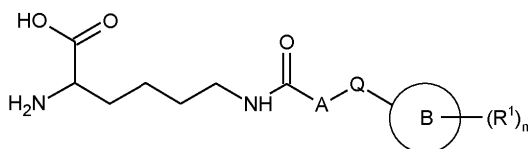
(72) Изобретатель:

**Кристи Роналд Джеймс, Урелло
Морган Одри (US)**

(74) Представитель:

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) Изобретение относится к модифицированным лизинам формулы (I). Дополнительно настоящее изобретение относится к полипептидам, содержащим один или несколько остатков модифицированного лизина, фармацевтическим системам доставки, содержащим такие полипептиды, фармацевтическим композициям, содержащим их, и к их применению в терапии.



A1

202292981

202292981

A1

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДОСТАВКИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СРЕДСТВ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета согласно 35 USC 119(e) по предварительной заявке на патент США № 63/017281, поданной 29 апреля 2020 г., полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к модифицированным лизинам, полипептидам, содержащим такие модифицированные лизины, и к применению таких полипептидов для доставки фармацевтически активных средств, в частности генетического материала, в клетку. Настоящее изобретение также относится к применению таких полипептидов в терапии.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Генная терапия представляет собой область медицины, которая фокусируется на терапевтической доставке (чужеродного) генетического материала (такого как ДНК и РНК) в клетки пациента с целью лечения болезни. На сегодняшний день несколько средств генной терапии, включая Luxturna® (слепота, вызванная мутацией RPE65) и Kymriah® (терапия Т-клетками с химерными антигенными рецепторами), получили одобрение регулирующих органов в отношении ряда различных медицинских состояний.

Доставка генов является процессом, применяемым для введения генетического материала в клетку. Для успешной доставки генетический материал должен оставаться стабильным во время транспортировки и, в конечном итоге, быть интернализованным в клетку-мишень. Если генетический материал представляет собой ДНК, он должен быть интернализован в клетку-мишень и доставлен в ядро. Для доставки генов требуется вектор, и подходящие векторы обычно делятся на две категории: вирусные и невирусные векторы.

В опосредованной вирусом доставке генов используется способность вируса вводить свою ДНК внутрь клетки-хозяина. Генетический материал упаковывается в вирусную частицу с дефицитом репликации с образованием вирусного вектора. Способы с применением вирусов высокоэффективны, но могут вызывать иммунный ответ. Кроме того, с их помощью можно доставить в клетки только очень маленькие фрагменты генетического материала, их получение является трудоемким, а также существуют риски возникновения случайных сайтов вставки, цитопатических эффектов и мутагенеза.

Для вариантов применения, касающихся доставки генов, искусственные векторы имеют ряд преимуществ по сравнению с вирусами с точки зрения структурной

универсальности и масштабируемости; и они могут быть разработаны исключительно и специально для достижения одной необходимой цели. Эти материалы могут быть разработаны для упаковки генетического материала в наночастицы или везикулы, которые были сконструированы для преодоления биологических барьеров, ассоциированных с захватом клетками, транспортом в цитозоль и (при необходимости) доставкой в ядро. Обычный подход заключается в упаковке генетического материала в мультимолекулярные сборки с такими материалами, как полимеры, пептиды или липиды с положительными зарядами, которые ассоциированы с анионными нуклеиновыми кислотами. Электростатические взаимодействия между положительными и отрицательными зарядами приводят к самосборке в структуры нано- или микрочастиц, а размер и форма этих частиц могут контролироваться типом материала и условиями конденсации (Park *et al.* Adv Drug Del Rev, 2006, 58(4):467-86).

Включение ДНК, например в подходящий вектор, подобный наночастице, значительно улучшает захват ДНК клетками по сравнению с захватом ДНК в свободной форме. ДНК имеет чистый отрицательный заряд и, как правило, сама по себе не интернализируется в клетки (которые также имеют чистый отрицательный заряд). ДНК в свободной форме также имеет тенденцию запускать иммунный ответ, что приводит к ее разрушению. Включение ДНК в подходящий вектор может нейтрализовать ее отрицательный заряд и защитить ее от разрушения во внеклеточном пространстве.

Для эффективного интернализирования вектора он должен быть транспортирован в клетку *посредством* процесса, называемого эндоцитозом. В ходе данного процесса вектор окружается участком клеточной мембраны, который затем отпочковывается внутрь клетки с образованием эндосомы. Вектор должен быть выполнен с возможностью протекания данного процесса, но при этом уменьшать вероятность захвата лизосомами, т. е. секвестрации в кислые компартменты лизосом, что связаны с мембраной. Одним из способов достижения этого является обеспечение разрывов эндосом до того, как может произойти перенос в лизосому. Это может быть достигнуто за счет буферизирующего действия вектора в отношении pH эндосомы (эндосома становится еще более кислой после захвата клеткой) до тех пор, пока полученный осмотический градиент не приведет к разрыву эндосомы и высвобождению генетического материала в цитоплазму, где он может быть доступен для транскрипции/трансляции. Подходящие векторные материалы с эффективной буферной емкостью в диапазоне буферизации эндосом (pH 7,4-pH 5,0) могут замедлять подкисление эндосомы за счет принятия протонов, что вызывает приток дополнительных протонов и противоионов из цитозоля.

Существующие искусственные системы доставки генов ограничены *in vivo* низкой стабильностью, высокой токсичностью и низкоэффективным проникновением генетического материала в цитоплазму. Конструирование многофункционального материала, подходящего для доставки генов, что позволяет достичь оптимального баланса между свойствами состава (размером, зарядом и т. д.), стабильностью, буферной емкостью и токсичностью при сохранении высокой эффективности доставки, оказалось затруднительным и сложным, но это значительно упростит получение итогового состава.

Полилизин (PL) представляет собой линейный полипептид, несущий боковые ответвления со свободными аминогруппами, которые способны взаимодействовать с отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами и образовывать комплексы *посредством* электростатического взаимодействия. Именно поэтому PL и его сополимеры широко применяются в лаборатории в качестве переносчиков для невирусной доставки генов. Например, наночастицы на основе PL, содержащие ДНК, продемонстрировали высокую эффективность трансфекции в нескольких клеточных линиях в сочетании со вспомогательными средствами трансфекции, такими как хлорохин (Yamauchi *et al.* Biomaterials, 2003 24(24): 4495-4506), и являются крайне важным компонентом блок-сополимеров или гибридных систем (Incani *et al.* ACS Appl. Mater. Interfaces, 2009, 1(4): 841-848). PL также биоразлагаем, что является преимуществом для вариантов применения *in vivo*. Однако эффективность трансфекции PL намного ниже, чем у других катионных полимерных трансфекционных средств (например, полиэтиленимина (PEI)), несмотря на обеспечение аналогичных уровней захвата ДНК клетками. Эта низкоэффективная трансфекция связана с неспособностью полученных наночастиц, содержащих ДНК, выйти из эндосомы, вероятно из-за их неспособности буферизовать pH в эндосоме (Hwang *et al.* Biomacrog., 2014, 15(10):2577-86).

Было показано, что внедрение способных к протонированию групп с $pK_a < 6,5$, таких как имидазольные или гистидиновые, усиливает трансфекцию наночастиц на основе PL (Roufai *et al.* Bioconjug. Chem., 2001 12(1): 92-99, и Hwang *et al.* Biomacrog., 2014, 15(10):2577-86); однако для обеспечения стабильности наночастиц при нейтральном pH необходимо соблюдение крайне важного баланса между способными к протонированию группами с pK_a выше и ниже 7,4. Например, в предыдущих исследованиях (Benns *et al.* Bioconjug. Chem., 2000, 11(5):637-45) изучали аминокислоту гистидин ($pK_a = 6$), как функциональную группу для улучшения буферизации PL. Было показано, что гистидин, привитый к полилизину, повышает буферную емкость вплоть до 3,5 раз по сравнению с PL. Беннс также прививал полигистидин к другим полимерам и сообщил о еще большем

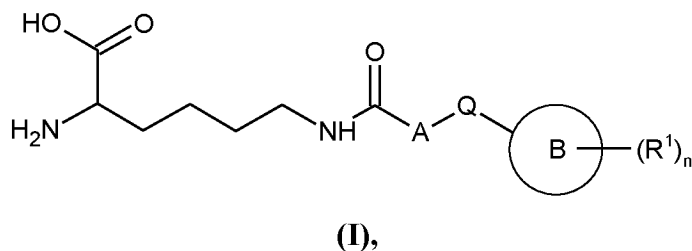
усилении буферизации (~4,5-кратно (Hwang *et al.* Biomacro., 2014, 15(10):2577-86) наряду со значительными улучшениями в трансфекции.

В настоящей заявке описаны конкретные модифицированные лизины, которые можно использовать для формирования модифицированных PL с повышенной эффективностью доставки генетического материала по сравнению с немодифицированными PL. Эти модифицированные PL уникальны тем, что они многофункциональны, в отличие от модификаций гистидина, которые только облегчают буферизацию эндосом. Такие модифицированные PL i) обладают улучшенными буферными свойствами, отрегулированными для обеспечения протонирования во время перехода pH, который происходит во время интернализации в клетку и переноса в лизосому, ii) являются более стабильными благодаря усиленному связыванию нуклеиновых кислот посредством электростатических и неэлектростатических (например, пи-пи стекинг) взаимодействий и/или iii) характеризуются повышенной биосовместимостью при использовании компонентов ядра на основе метаболитов, которые встречаются в природе и, вероятно, будут менее токсичными или иммуногенными. Такие модифицированные PL образуют наночастицы с плазмидными ДНК, подобные тем, которые образуются с немодифицированными PL (~ 100 нм, сферы, палочки и тороиды), и демонстрируют более высокую стабильность в сыворотке крови и пролонгированную циркуляцию в крови после внутривенной инъекции мышам без проявления ассоциированной с этим токсичности. Они защищают инкапсулированный генетический материал, не так легко отделяясь, и дольше остаются в кровотоке.

Модифицированные лизины, описанные в данном документе, представляют собой многофункциональные единицы, которые могут быть включены в векторы и улучшают трансфекцию искусственных систем доставки генов, сохраняя при этом высокую биосовместимость.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе раскрываются, в частности, модифицированные лизины формулы (I),



где

A представляет собой связь, C₁-алкилен, карбоциклил или гетероциклил, при этом указанный карбоциклил или гетероциклил может быть необязательно замещен при атоме углерода одним или несколькими R², и при этом, если указанный гетероциклил содержит фрагмент -NH-, то атом азота может быть необязательно замещен группой, выбранной из R^A;

Q представляет собой связь, карбоциклил или гетероциклил; при этом указанный карбоциклил или гетероциклил может быть необязательно замещен при атоме углерода одним или несколькими R³, и при этом, если указанный гетероциклил содержит фрагмент -NH-, то атом азота может быть необязательно замещен группой, выбранной из R^B;

кольцо В представляет собой морфолинил или тиоморфолинил, при этом, если указанный морфолинил или тиоморфолинил содержит фрагмент -NH-, то атом азота может быть необязательно замещен группой, выбранной из R^C;

каждый из R¹, R² и R³ независимо выбран из галогена, нитро, циано, гидроксид, трифторметокси, трифторметила, амино, карбокси, карбамоила, меркапто, сульфоамила, метила, этила, метокси, этокси, ацетила, ацетокси, метиламино, этиламино, диметиламино, диэтиламино, N-метил-N-этиламино, ацетиламино, N-метилкарбамоила, N-этилкарбамоила, N,N-диметилкарбамоила, N,N-диэтилкарбамоила, N-метил-N-этилкарбамоила, метилтио, этилтио, метилсульфинила, этилсульфинила, мезила, этилсульфонила, метоксикарбонила, этоксикарбонила, N-метилсульфоамила, N-этилсульфоамила, N,N-диметилсульфоамила, N,N-диэтилсульфоамила и N-метил-N-этилсульфоамила;

n равняется 0-4;

R^A, R^B и R^C независимо выбраны из метила, этила, пропила, изопропила, ацетила, мезила, этилсульфонила, метоксикарбонила, этоксикарбонила, пропоксикарбонила, бутоксикарбонила, карбамоила, N-метилкарбамоила, N-этилкарбамоила, N,N-диметилкарбамоила, N,N-диэтилкарбамоила и N-метил-N-этилкарбамоила.

В данном документе также описан, в частности, полипептид, содержащий один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе.

В данном документе также описан, в частности, полипептид, как описано в данном документе, для применения в качестве фармацевтической системы доставки.

В данном документе также описана, в частности, фармацевтическая композиция, которая содержит полипептид, как описано в данном документе, и фармацевтически активное средство.

В данном документе также описан, в частности, способ терапии теплокровного животного, такого как человек, который включает введение указанному животному эффективного количества фармацевтической композиции, как описано в данном документе.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе подробно описаны многие варианты осуществления настоящего изобретения и они будут понятны читателю, являющемуся специалистом в данной области техники. Настоящее изобретение не должно интерпретироваться как ограниченное каким-либо из перечисленных вариантов осуществления.

«А» означает «по меньшей мере один». В любом варианте осуществления, где «а» применяется для обозначения указанного материала или элемента, «а» может означать один.

«Содержащий» означает, что указанный материал или элемент может содержать другие материалы или элементы. В любом варианте осуществления, где указано «содержащий», приведенный материал или элемент может иметь в составе по меньшей мере 10% вес./вес., по меньшей мере 20% вес./вес., по меньшей мере 30% вес./вес. или по меньшей мере 40% вес./вес. данного материала или элемента. В любом варианте осуществления, где указано «содержащий», «содержащий» также может означать «состоящий из» (или «состоит из») или «по сути состоящий из» (или «по сути состоит из») указанного материала или элемента.

«Состоящий из» или «состоит из» означает, что приведенный материал или элемент полностью сформирован из данного материала или элемента. В любом варианте осуществления, где указано «состоящий из» или «состоит из», приведенный материал или элемент может иметь в составе 100% вес./вес. данного материала или элемента.

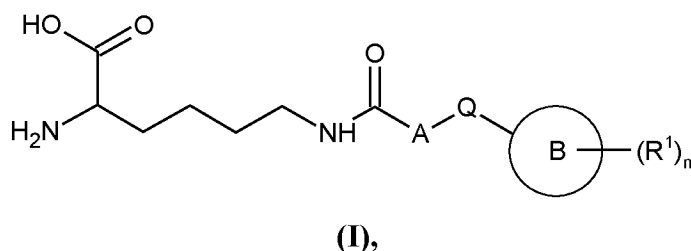
«По сути состоящий из» или «по сути состоит из» означает, что приведенный материал или элемент практически полностью состоит из данного материала или элемента. В любом варианте осуществления, где указано «по сути состоящий из» или «по сути состоит из», приведенный материал или элемент может иметь в составе по меньшей мере 50% вес./вес., по меньшей мере 60% вес./вес., по меньшей мере 70% вес./вес., по меньшей мере 80% вес./вес., по меньшей мере 90% вес./вес., по меньшей мере 95% вес./вес. или по меньшей мере 99% вес./вес. данного материала или элемента.

В любом варианте осуществления, где для определения материала или элемента применяют «представляет собой» или «может представлять собой», «представляет собой» или «может представлять собой» могут означать, что материал или элемент «состоит из» или «по сути состоит из» данного материала или элемента.

В любом варианте осуществления данного описания, где указано «приблизительно», «приблизительно» может означать ± 0 (т. е. без отклонения), $\pm 0,01$, $\pm 0,05$, $\pm 0,1$, $\pm 0,5$, ± 1 , ± 2 , ± 5 , ± 10 или ± 20 процентов от указанного числа. Если указано число, в дополнительном варианте осуществления оно дополнительно относится к приближенному значению от указанного числа.

Пункты формулы изобретения являются вариантами осуществления.

В данном документе раскрыт модифицированный лизин формулы (I),



где A, Q, B, R^1 и n являются такими, как описано в данном документе.

В одном варианте осуществления A представляет собой связь.

В одном варианте осуществления A представляет собой C1-балкилен.

В одном варианте осуществления A представляет собой метилен.

В одном варианте осуществления A представляет собой карбоциклил, при этом указанный карбоциклил может быть необязательно замещен при атоме углерода одним или несколькими R^2 .

В одном варианте осуществления A представляет собой гетероциклил, при этом указанный гетероциклил может быть необязательно замещен при атоме углерода одним или несколькими R^2 , и при этом, если указанный гетероциклил содержит фрагмент -NH-, то атом азота может быть необязательно замещен группой, выбранной из R^A .

В одном варианте осуществления A представляет собой гетероциклил.

В одном варианте осуществления A представляет собой пиридил.

В одном варианте осуществления A представляет собой связь, C1-балкилен или гетероциклил.

В одном варианте осуществления A представляет собой связь, метилен или пиридил.

В одном варианте осуществления Q представляет собой связь.

В одном варианте осуществления Q представляет собой карбоциклил, при этом указанный карбоциклил может быть необязательно замещен при атоме углерода одним или несколькими R^3 .

В одном варианте осуществления Q представляет собой гетероциклил, при этом указанный гетероциклил может быть необязательно замещен при атоме углерода одним

или несколькими R^3 , и при этом, если указанный гетероцикл содержит фрагмент $-NH-$, то атом азота может быть необязательно замещен группой, выбранной из R^B .

В одном варианте осуществления кольцо В представляет собой морфолинил.

В одном варианте осуществления кольцо В представляет собой морфолинил, при этом, если указанный морфолинил содержит фрагмент $-NH-$, то атом азота может быть необязательно замещен группой, выбранной из R^C .

В одном варианте осуществления кольцо В представляет собой тиоморфолинил.

В одном варианте осуществления кольцо В представляет собой тиоморфолинил, при этом, если указанный тиоморфолинил содержит фрагмент $-NH-$, то атом азота может быть необязательно замещен группой, выбранной из R^C .

В одном варианте осуществления R1 представляет собой галоген.

В одном варианте осуществления n равняется 0.

В одном варианте осуществления n равняется 1.

В одном варианте осуществления n равняется 2.

В одном варианте осуществления n равняется 3.

В одном варианте осуществления n равняется 4.

В одном варианте осуществления предусмотрен модифицированный лизин формулы (I), где

A представляет собой связь, C_{1-6} алкилен или гетероцикл;

Q представляет собой связь;

кольцо В представляет собой морфолинил или тиоморфолинил; и

n равняется 0.

В одном варианте осуществления предусмотрен модифицированный лизин формулы (I), где

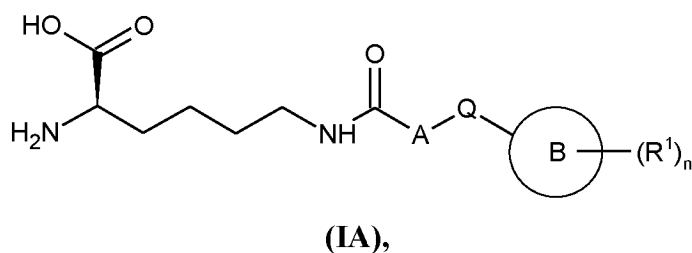
A представляет собой связь, метилен или пиридил;

Q представляет собой связь;

кольцо В представляет собой морфолинил или тиоморфолинил; и

n равняется 0.

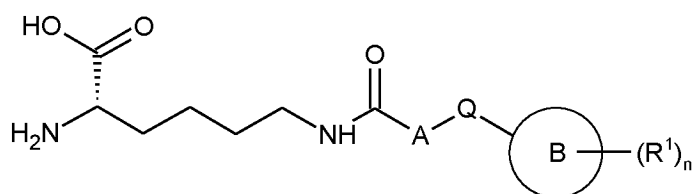
В одном аспекте настоящего изобретения модифицированный лизин формулы (I) представляет собой модифицированный лизин формулы (IA),



где A, Q, B, R¹ и n являются такими, как описано в данном документе.

Модифицированный лизин формулы **(IA)** может также называться модифицированным D-лизином.

В одном аспекте настоящего изобретения модифицированный лизин формулы **(I)** представляет собой модифицированный лизин формулы **(IB)**,



(IB),

где A, Q, B, R¹ и n являются такими, как описано в данном документе.

Модифицированный лизин формулы **(IB)** может также называться модифицированным L-лизином.

В одном аспекте настоящего изобретения модифицированный лизин формулы **(I)** выбран из

2-амино-6-{[6-(морфолин-4-ил)пиридин-3-карбонил]амино}гексановой кислоты,
2-амино-6-[(тиоморфолин-3-карбонил)амино]гексановой кислоты и
2-амино-6-[2-(морфолин-4-ил)ацетамидо]гексановой кислоты.

В одном аспекте настоящего изобретения модифицированный лизин формулы **(I)** выбран из

(R)-2-амино-6-{[6-(морфолин-4-ил)пиридин-3-карбонил]амино}гексановой кислоты,
(R)-2-амино-6-[(тиоморфолин-3-карбонил)амино]гексановой кислоты и
(R)-2-амино-6-[2-(морфолин-4-ил)ацетамидо]гексановой кислоты.

В одном аспекте настоящего изобретения модифицированный лизин формулы **(I)** выбран из

(S)-2-амино-6-{[6-(морфолин-4-ил)пиридин-3-карбонил]амино}гексановой кислоты,
(S)-2-амино-6-[(тиоморфолин-3-карбонил)амино]гексановой кислоты и
(S)-2-амино-6-[2-(морфолин-4-ил)ацетамидо]гексановой кислоты.

В одном аспекте настоящего изобретения модифицированный лизин формулы **(I)** выбран из

2-амино-6-{[6-(морфолин-4-ил)пиридин-3-карбонил]амино}гексановой кислоты,
2-амино-6-[(тиоморфолин-3-карбонил)амино]гексановой кислоты и
2-амино-6-[2-(морфолин-4-ил)ацетамидо]гексановой кислоты
в форме соли.

В одном аспекте настоящего изобретения модифицированный лизин формулы (I) выбран из

(R)-2-амино-6-{[6-(морфолин-4-ил)пиридин-3-карбонил]амино}гексановой кислоты,

(R)-2-амино-6-[(тиоморфолин-3-карбонил)амино]гексановой кислоты и

(R)-2-амино-6-[2-(морфолин-4-ил)ацетамидо]гексановой кислоты

в форме соли.

В одном аспекте настоящего изобретения модифицированный лизин формулы (I) выбран из

(S)-2-амино-6-{[6-(морфолин-4-ил)пиридин-3-карбонил]амино}гексановой кислоты,

(S)-2-амино-6-[(тиоморфолин-3-карбонил)амино]гексановой кислоты и

(S)-2-амино-6-[2-(морфолин-4-ил)ацетамидо]гексановой кислоты

в форме соли.

Применяемый в данном документе термин «замещенный», если он относится к химической группе, означает химическую группу, где один или несколько атомов водорода удален(ы) и замещен(ы) заместителями. Применяемый в данном документе термин «заместитель» имеет обычное значение, известное в уровне техники, и относится к химическому фрагменту, ковалентно присоединенному к исходной группе. Применяемый в данном документе термин «необязательно замещенный» означает, что химическая группа может не иметь заместителей (т. е. является незамещенной) или может иметь один или несколько заместителей (т. е. является замещенной). Следует понимать, что замещение при конкретном атоме ограничено валентностью. В случае, когда необязательные заместители выбраны из перечня групп, следует понимать, что данное определение включает все заместители, выбранные из одной из указанных групп, или заместители, выбранные из двух или более указанных групп. В случае, когда могут присутствовать несколько одинаковых заместителей, например R^2 , следует понимать, что данное определение также предусматривает, что все такие заместители выбраны из одной из указанных групп или заместители выбраны из двух или более указанных групп.

Используемый в данном документе термин « C_{i-j} » обозначает диапазон количества атомов углерода, при этом i и j представляют собой целые числа, диапазон количества атомов углерода включает конечные точки (т. е. i и j) и каждое целое число между ними, и при этом j больше, чем i . Например, C_{1-6} обозначает диапазон от одного до шести атомов углерода, включая один атом углерода, два атома углерода, три атома углерода, четыре атома углерода, пять атомов углерода и шесть атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления термин « C_{1-6} » означает от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2 атомов углерода.

Применяемый в данном документе термин «алкил», либо как часть другого термина, либо при использовании независимо, относится к насыщенную углеводородной цепи. Вышеупомянутая углеводородная цепь может быть прямой цепью или разветвленной цепью. Термин «C_{i-j}-алкил» относится к алкилу, содержащему от *i* до *j* атомов углерода. Примеры C₁₋₆-алкила включают без ограничения метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, изобутил, втор-бутил; высшие гомологи, такие как 2-метил-1-бутил, н-пентил, 3-пентил, н-гексил, 1,2,2-триметилпропил и т. п. Ссылки на такие группы, как «бутил», без дополнительного уточнения относятся ко всем формам бутила, например, н-бутилу, трет-бутилу и т. д.

Применяемый в данном документе термин «алкилен», либо как часть другого термина, либо при использовании независимо, относится к насыщенную углеводородной цепи. Вышеупомянутая углеводородная цепь может быть прямой цепью или разветвленной цепью. Термин «C_{i-j}-алкилен» относится к алкилу, содержащему от *i* до *j* атомов углерода. Примеры C₁₋₆-алкилена включают без ограничения метилен (-CH₂-), этилен (-CH₂-CH₂-), пропилен (-CH₂-CH₂-CH₂-), бутилен (-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH(CH₃)-CH₂- и т. д.) и т. п.

Применяемый в данном документе термин «галоген» относится к фтору, хлору, бром и йоду.

«Гетероцикл» представляет собой насыщенное, частично насыщенное или ненасыщенное моно- или бициклическое кольцо, содержащее 4-12 атомов, из которых по меньшей мере один атом выбран из атома азота, серы или кислорода, которое, если не указано иное, может быть соединено атомом углерода или азота, где группа -CH₂- может быть необязательно замещена с помощью -C(O)-, и атом серы кольца может являться необязательно окисленным с образованием S-оксидов. Примеры и подходящие значения термина «гетероцикл» представляют собой морфолино, пиперидил, пиридил, пиранил, пирролил, пиразолил, изотиазолил, индолил, хинолил, тиенил, 1,3-бензодиоксолил, тиадiazолил, пиперазинил, тиазолидинил, пирролидинил, тиоморфолино, пирролинил, гомопиперазинил, 3,5-диоксапиперидинил, тетрагидропиранил, имидазолил, пиримидил, пиразинил, пиридазинил, изоксазолил, N-метилпирролил, 4-пиридон, 1-изохинолон, 2-пирролидон и 4-тиазаolidон. Конкретным примером термина «гетероцикл» является пиридил. В одном аспекте настоящего изобретения «гетероцикл» представляет собой насыщенное, частично насыщенное или ненасыщенное моноциклическое кольцо, содержащее 5 или 6 атомов, из которых по меньшей мере один атом выбран из атома азота, серы или кислорода, причем, если не указано иное, оно может быть соединено атомом углерода или азота, группа -CH₂- может необязательно является замещенной с

помощью -C(O)-, и атом серы в кольце может является необязательно окисленным с образованием S-оксидов.

«Карбоциклил» представляет собой насыщенное, частично насыщенное или ненасыщенное, моно- или бициклическое углеродное кольцо, которое содержит 3-12 атомов, где группа -CH₂- может быть необязательно замещена с помощью -C(O)-. В одном варианте осуществления «карбоциклил» представляет собой моноциклическое кольцо, содержащее 5 или 6 атомов, или бициклическое кольцо, содержащее 9 или 10 атомов. Подходящие значения для «карбоциклила» включают циклопропил, циклобутил, 1-оксоциклопентил, циклопентил, циклопентенил, циклогексил, циклогексенил, фенил, нафтил, тетралинил, инданил или 1-оксоинданил. Конкретным примером «карбоциклила» является фенил.

«Соединения» по настоящему изобретению охватывают все изотопы атомов в соединениях. Изотопы атома включают атомы, характеризующиеся одинаковым атомным числом, но разными значениями массового числа. Например, если не указано иное, подразумевается, что водород, углерод, азот, кислород, фосфор, сера, фтор, хлор, бром или йод в «соединении» по настоящему изобретению также включают их изотопы, такие как без ограничения ¹H, ²H, ³H, ¹¹C, ¹²C, ¹³C, ¹⁴C, ¹⁴N, ¹⁵N, ¹⁶O, ¹⁷O, ¹⁸O, ³¹P, ³²P, ³²S, ³³S, ³⁴S, ³⁶S, ¹⁷F, ¹⁹F, ³⁵Cl, ³⁷Cl, ⁷⁹Br, ⁸¹Br, ¹²⁷I и ¹³¹I. В некоторых вариантах осуществления водород включает протий, дейтерий и тритий. В некоторых вариантах осуществления водород относится к протию. В некоторых вариантах осуществления водород относится к дейтерию. В некоторых вариантах осуществления водород относится к тритию. В некоторых вариантах осуществления термин «замещенный дейтерием» или «замещенный с помощью дейтерия» используется для замены другой изоформы водорода (например, протия) в химической группе на дейтерий. В некоторых вариантах осуществления углерод включает ¹²C и ¹³C.

Остаток

Аминокислоты в описанных в данном документе полипептидах связаны вместе с образованием цепи посредством пептидных связей между α-аминогруппой и карбоксильными группами. После присоединения к цепи отдельная аминокислота называется «остатком».

Модифицированный лизин

В любом варианте осуществления, где указаны модифицированные лизины или остатки модифицированного лизина, они относятся к лизинам, модифицированным в соответствии с формулой (I) и ее вариантами осуществления.

В любом варианте осуществления, где указан модифицированный лизин или остаток модифицированного лизина, он может относиться к модифицированному D-лизину.

В любом варианте осуществления, где указан модифицированный лизин или остаток модифицированного лизина, он может относиться к модифицированному L-лизину.

В любом варианте осуществления, где указан модифицированный лизин или остаток модифицированного лизина, он может относиться к модифицированному лизину или остатку модифицированного лизина в форме соли.

Применяемый в данном документе термин «солевая форма» относится к производным модифицированного лизина, остатка модифицированного лизина или полипептидов, описанных в данном документе, где исходное соединение модифицировано путем превращения одного или нескольких имеющихся кислотных фрагментов (например, карбоксил и т. п.) и/или основных фрагментов (например, амин, щелочь и т. п.) в его солевую форму. Во многих случаях соединения по настоящему изобретению способны образовывать кислые и/или основные соли благодаря наличию amino- и/или карбоксильных групп или групп, подобных им. Конкретная солевая форма представляет собой фармацевтически приемлемую соль. Применяемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемая соль» представляет собой соль, которая безопасна и эффективна для применения у млекопитающих, в частности у людей.

Подходящие солевые формы модифицированного лизина, остатка модифицированного лизина или полипептидов, описанных в данном документе, включают, например, соль присоединения кислоты, которая может быть получена из, например, неорганической кислоты (например, хлористоводородной, бромистоводородной, серной, азотной, фосфорной кислоты и т. п.) или органической кислоты (например, муравьиной, уксусной, пропионовой, гликолевой, щавелевой, малеиновой, малоновой, янтарной, фумаровой, винной, тримезиновой, лимонной, молочной, фенилуксусной, бензойной, миндальной, метансульфоновой, нападизиловой, этансульфоновой, толуолсульфоновой, трифторуксусной, салициловой, сульфосалициловой кислот и т. п.). Конкретной солью присоединения кислоты является гидрохлорид.

Подходящие солевые формы модифицированного лизина, остатка модифицированного лизина или полипептидов, описанных в данном документе, включают, например, соль присоединения основания, которая может быть получена из, например, неорганических оснований (например, натриевая, калиевая, аммониевая соли и гидроксид, карбонат, бикарбонатные соли металлов из столбцов I-XII периодической таблицы элементов, таких как кальций, магний, железо, серебро, цинк, медь и т. п.) или органических оснований (например, первичных, вторичных и третичных аминов, замещенных аминов, в том числе

встречающихся в природе замещенных аминов, циклических аминов, основных ионообменных смол и т. п.). Некоторые органические амины включают без ограничения изопропиламин, бензатин, холинат, диэтанолламин, диэтиламин, лизин, меглумин, пиперазин и трометамин. Перечни дополнительных подходящих солей можно найти, например, в «Remington's Pharmaceutical Sciences», 20th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985) и в «Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use» by Stahl and Wermuth (Wiley-VCH, Вайнхайм, Германия, 2002).

Полипептид

Еще одной особенностью настоящего изобретения является полипептид, содержащий один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе. В данном документе, где указан полипептид, он относится к цепи аминокислотных остатков.

В любом варианте осуществления, где указан полипептид, он может относиться к полипептиду, синтезированному посредством методик, которые позволяют точно контролировать его состав и чистоту. Подходящие методики включают твердофазный синтез пептидов.

В любом варианте осуществления, где указан полипептид, он может относиться к полипептиду, синтезированному *посредством* реакции полимеризации. Подходящие методики включают аддитивную или конденсационную полимеризацию.

В любом варианте осуществления, где указан полипептид, он может относиться к непрерывной и неразветвленной цепи из аминокислотных остатков.

В любом варианте осуществления, где указан полипептид, он может относиться к полипептиду, содержащему 2-1000 аминокислотных остатков.

В любом варианте осуществления, где указан полипептид, он может относиться к полипептиду, содержащему 2-50 аминокислотных остатков.

В любом варианте осуществления, где указан полипептид, он может относиться к полипептиду, содержащему 10-500 аминокислотных остатков.

В любом варианте осуществления, где указан полипептид, он может относиться к полипептиду, содержащему 15-40 аминокислотных остатков.

В любом варианте осуществления, где указан полипептид, он может относиться к полипептиду, содержащему 20-100 аминокислотных остатков.

В любом варианте осуществления, где указан полипептид, он может относиться к полипептиду, содержащему 20-50 аминокислотных остатков.

В любом варианте осуществления, где указан полипептид, он может относиться к полипептиду, содержащему 25-1000 аминокислотных остатков.

В любом варианте осуществления, где указан полипептид, он может относиться к полипептиду, содержащему 25-500 аминокислотных остатков.

В любом варианте осуществления, где указан полипептид, он может относиться к полипептиду, содержащему 25-100 аминокислотных остатков.

В любом варианте осуществления, где указан полипептид, он может относиться к полипептиду, содержащему 25-40 аминокислотных остатков.

В любом варианте осуществления, где указан полипептид, он может относиться к полипептиду, содержащему 30-40 аминокислотных остатков.

В любом варианте осуществления, где указан полипептид, полипептид может быть представлен в форме соли.

Полилизин

Полилизин представляет собой полипептид, содержащий два или больше остатков модифицированного лизина, или смесь лизина и остатков модифицированного лизина, где пептидные связи в цепи образованы между α -карбоксильными и α -аминогруппами остатков лизина и/или остатков модифицированного лизина, и где все аминокислотные остатки выбраны из остатков модифицированного лизина или смеси лизина и остатков модифицированного лизина.

В любом варианте осуществления, где указан полилизин, он может относиться к полилизину, где все остатки модифицированного лизина являются одинаковыми.

В любом варианте осуществления, где указан полилизин, он может относиться к полилизину, содержащему два или больше разных остатков модифицированного лизина.

В любом варианте осуществления, где указан полилизин, он может относиться к поли-D-лизину.

В любом варианте осуществления, где указан полилизин, он может относиться к поли-L-лизину.

В любом варианте осуществления, где указан полилизин, он может относиться к рацемическому полилизину.

В любом варианте осуществления, где указан полилизин, он может относиться к поли-L/D-лизину.

В любом варианте осуществления, где указан полилизин, он может относиться к полилизину, содержащему 2-1000 аминокислотных остатков.

В любом варианте осуществления, где указан полилизин, он может относиться к полилизину, содержащему 2-50 аминокислотных остатков.

В любом варианте осуществления, где указан полилизин, он может относиться к полилизину, содержащему 10-500 аминокислотных остатков.

В одном варианте осуществления концевая аминокетуппа полипептида может являться немодифицированной. Немодифицированная концевая аминокетуппа означает, что она представляет собой группу $-NH_2$.

В одном варианте осуществления концевая аминокетуппа полипептида может представлять собой модифицированную аминокетуппу.

Модификации, как правило, представляют собой химические модификации, которые включают без ограничения, добавление химических групп, создание новых связей и удаление химических групп. Модифицированные аминокетуппы хорошо известны специалистам в данной области техники и включают без ограничения ацетилированные, дезамино, N-нижий алкил-, N-ди-нижий алкил-, ограниченные алкильные (например, разветвленные, циклические, конденсированные, адамантильные) и N-ацильные модификации. Модифицированные аминокетуппы могут также включать без ограничения внутреннюю амидную связь, предусматривающую N-концевые (например, γ -Glu) защищенные аминокетуппы или присоединяющую радиоактивную, флуоресцентную метку, или аффинную метку (например, биотин), или лиганд, нацеливающий на клетку.

Лиганды, нацеливающие на клетку, относятся к нацеливающему фрагменту, который связывается с клеткой и/или способствует интернализации в клетку. Лиганды, нацеливающие на клетку, могут включать без ограничения материалы на основе полипептидов, такие как циклический RGD, пептиды, связывающие трансферриновый рецептор, антитела или проникающие в клетку пептиды, сахара или малые молекулы, подобные фолату.

Подходящей защитной группой для аминокетуппы является, например, ацильная группа, например алканойльная группа, такая как ацетильная, алкоксикарбонильная группа, например, метоксикарбонильная, этоксикарбонильная или трет-бутоксикарбонильная группа, арилметоксикарбонильная группа, например бензилоксикарбонильная, или ароильная группа, например бензойная. Конкретная модифицированная аминокетуппа представляет собой ациламино. Конкретная модифицированная аминокетуппа представляет собой ацетиламино.

Нижий алкил представляет собой C_{1-4} алкил, включая трет-бутил, бутил, пропил, изопропил, этил и метил.

В одном варианте осуществления концевая аминокетуппа полипептида может быть модифицирована путем добавления дополнительного полимера, необязательно посредством связывающей группы.

В одном варианте осуществления концевая аминогруппа полипептида может быть модифицирована путем добавления полимера полиэтиленгликоля, необязательно посредством связывающей группы, с образованием полиэтиленгликоль-полилизина.

Концевая карбоксильная группа может необязательно представлять собой модифицированную карбоксильную группу.

В одном варианте осуществления концевая карбоксильная группа полипептида является немодифицированной. Немодифицированная концевая карбоксильная группа означает, что она представляет собой группу -C(O)OH .

В одном варианте осуществления концевая карбоксильная группа полипептида представляет собой модифицированную карбоксильную группу.

Модификации, как правило, представляют собой химические модификации, которые включают без ограничения добавление химических групп, создание новых связей и удаление химических групп. Модифицированные карбоксильные группы хорошо известны специалистам в данной области техники и включают без ограничения модификации с помощью амида, низшего алкиламида, конформационно ограниченного алкила (например, разветвленного, циклического, конденсированного, адамантового), диалкиламида и сложного эфира низших алкилов. Модифицированные карбоксильные группы могут также включать без ограничения защищенные карбоксильные группы или присоединяющие радиоактивную метку, флуоресцентную метку, или аффинную метку (например, биотин), или лиганд, нацеливающий на клетки. Подходящая защитная группа для карбоксильной группы представляет собой, например, этерифицирующую группу, например, метилэтильную группу, трет-бутильную группу или бензильную группу. Конкретная модифицированная карбоксильная группа представляет собой $\text{-CO}_2\text{NH}_2$. Конкретная модифицированная карбоксильная группа является амидированной с С-конца. Конкретная модифицированная карбоксильная группа представляет собой карбоксамидную группу. Конкретная модифицированная карбоксильная группа представляет собой $N\text{-(C}_{1-4}\text{алкил)карбамоильную}$ группу.

В одном варианте осуществления концевая карбоксильная группа полипептида может быть модифицирована путем добавления дополнительного полимера, необязательно посредством связывающей группы.

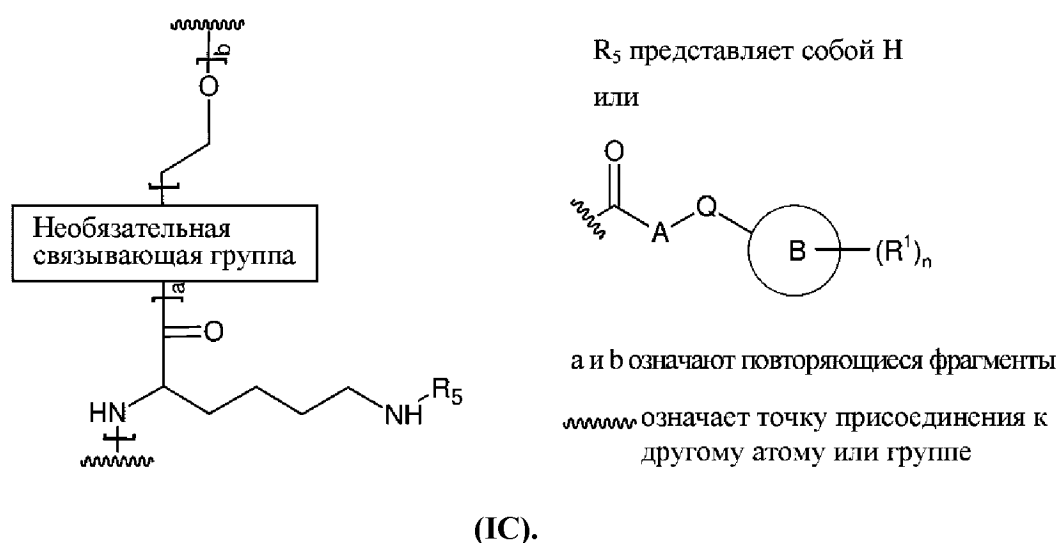
В одном варианте осуществления концевая карбоксильная группа полипептида может быть модифицирована за счет добавления полимера полиэтиленгликоля, необязательно посредством связывающей группы, с образованием полиэтиленгликоль-полилизина.

Полиэтиленгликоль-полилизин

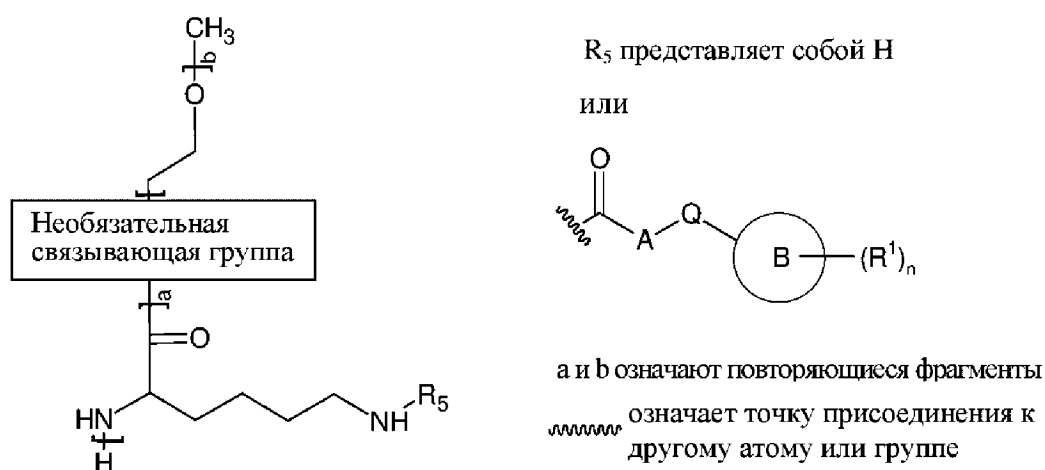
Полиэтиленгликоль (PEG) представляет собой полимер, состоящий из повторяющихся субъединиц $-(OCH_2CH_2)_n-$, где $n > 3$. Как правило, его синтезируют с применением полимеризации оксида этилена с раскрытием кольца.

В любом варианте осуществления, где указан полиэтиленгликоль-полилизин, он относится к полипептиду, содержащему как полимер полиэтиленгликоль, так и полипептид полилизин.

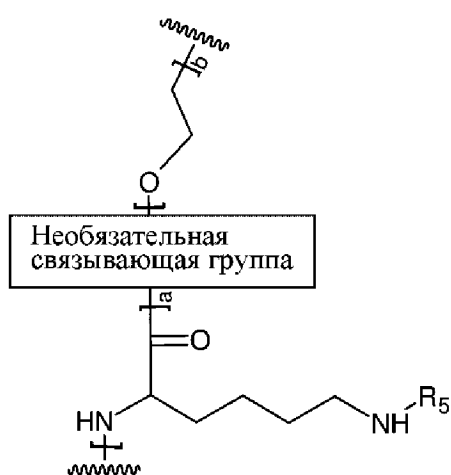
В любом варианте осуществления, где указан полиэтиленгликоль-полилизин, он может представлять собой полиэтиленгликоль-полилизин, содержащий подструктуру формулы (IC),



Конкретным полиэтиленгликоль-полилизин формулы (IC) является, например

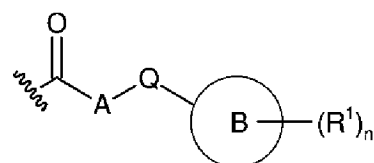


В любом варианте осуществления, где указан полиэтиленгликоль-полилизин, он может представлять собой полиэтиленгликоль-полилизин, содержащий подструктуру формулы (ID),



R_5 представляет собой H

или

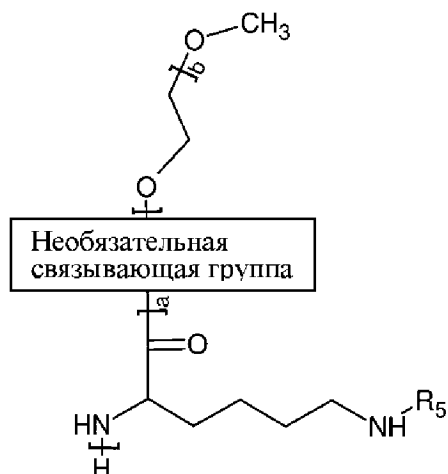


a и b означают повторяющиеся фрагменты

~~~~~ означает точку присоединения к другому атому или группе

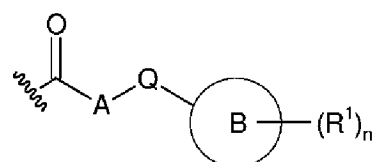
(ID).

Конкретным полиэтиленгликоль-полилизин формулы (ID) является, например



$R_5$  представляет собой H

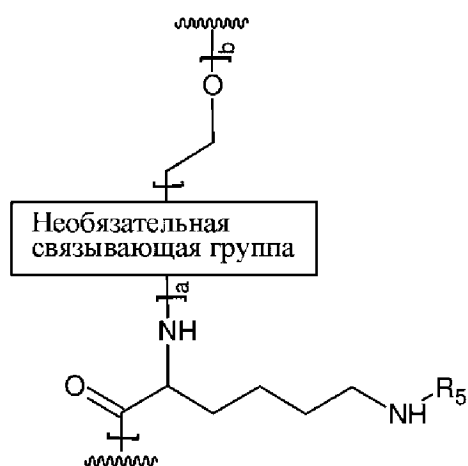
или



a и b означают повторяющиеся фрагменты

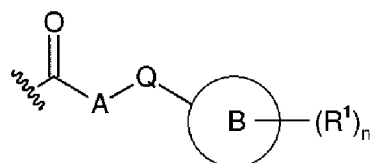
~~~~~ означает точку присоединения к другому атому или группе

В любом варианте осуществления, где указан полиэтиленгликоль-полилизин, он может представлять собой полиэтиленгликоль-полилизин, содержащий подструктуру формулы (IE),



R_5 представляет собой H

или

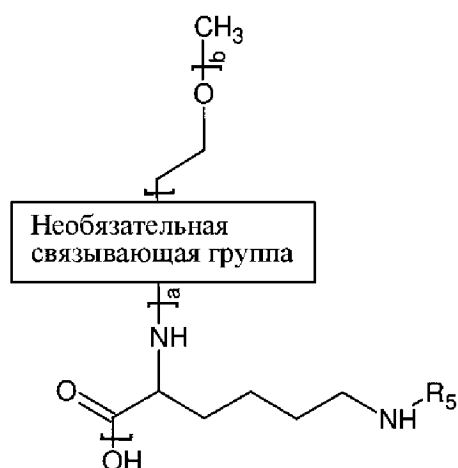


a и b означают повторяющиеся фрагменты

~~~~~ означает точку присоединения к другому атому или группе

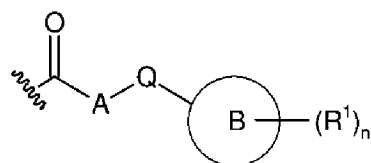
(IE).

Конкретным полиэтиленгликоль-полилизин формулы (IE) является, например



$R_5$  представляет собой H

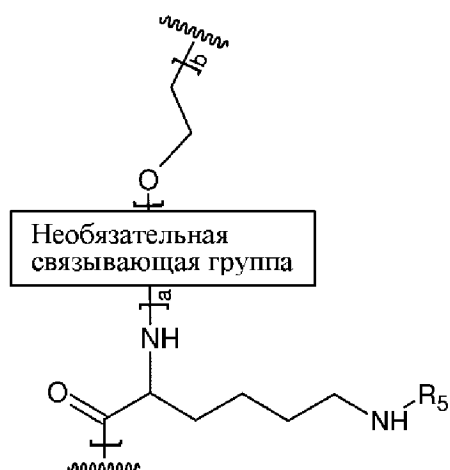
или



a и b означают повторяющиеся фрагменты

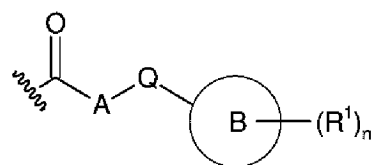
~~~~~ означает точку присоединения к другому атому или группе

В любом варианте осуществления, где указан полиэтиленгликоль-полилизин, он может представлять собой полиэтиленгликоль-полилизин, содержащий подструктуру формулы (IF),



R_5 представляет собой H

или

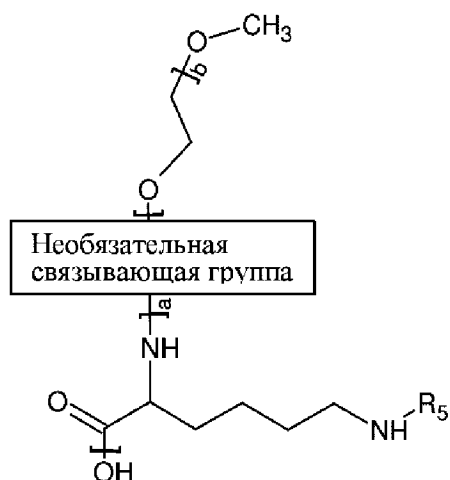


a и b означают повторяющиеся фрагменты

~~~~~ означает точку присоединения к другому атому или группе

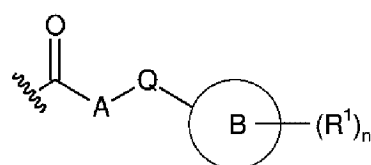
(IF).

Конкретным полиэтиленгликоль-полилизин формулы (IF) является, например



$R_5$  представляет собой H

или



a и b означают повторяющиеся фрагменты

~~~~~ означает точку присоединения к другому атому или группе

В любом варианте осуществления, где указан полиэтиленгликоль-полилизин, на одном из концевых участков могут присутствовать модификации, или концевые участки могут

быть представлены водородом. Подходящей модификацией концевого участка полиэтиленгликоля является, например C_{1-4} алкил, например метил, или C_{1-4} алкокси, например метокси.

В любом варианте осуществления, где указан PEG, PEG может содержать реакционноспособную группу на концевом участке, который не соединен с полилизин. Подходящие реакционноспособные группы включают малеимид, азид, алкин (например, C_{2-6} алкин) и цикlopentadien. Данная реакционноспособная группа может использоваться для присоединения таких частиц, как радиоактивные метки, красители и лиганды, нацеливающие на клетки, до или после конъюгации PEG с полипептидом.

В любом варианте осуществления, где указан полиэтиленгликоль-полилизин, модификации могут присутствовать на обоих концевых участках.

В любом варианте осуществления, где указан полиэтиленгликоль-полилизин, между полиэтиленгликолем и полимером полилизин может присутствовать связывающая группа. Подходящая связывающая группа представляет собой C_{1-4} алкиламино, например - CH_2-CH_2-NH- , при этом образуется, например, полипептид $PEG-CH_2-CH_2-NH-PL$ или полипептид $PEG-NH-CH_2-CH_2-PL$; или C_{1-4} алкилен, например - CH_2-CH_2- , при этом образуется, например полипептид $PEG-CH_2-CH_2-PL$.

В любом варианте осуществления, где указан PEG, он может относиться к полимеру с молекулярной массой в диапазоне 0,5-30 кДа.

В любом варианте осуществления, где указан PEG, он может относиться к полимеру с молекулярной массой в диапазоне 2-20 кДа.

В любом варианте осуществления, где указан PEG, он может относиться к полимеру с молекулярной массой в диапазоне 4-11 кДа.

В любом варианте осуществления, где указан PEG, он может относиться к полимеру с молекулярной массой в диапазоне 1-6 кДа.

В любом варианте осуществления, где указан PEG, он может относиться к полимеру с молекулярной массой в пределах приблизительно 2 кДа.

В любом варианте осуществления, где указан PEG, он может относиться к полимеру с молекулярной массой в пределах приблизительно 5 кДа.

В любом варианте осуществления, где указан PEG, он может относиться к полимеру с молекулярной массой в пределах приблизительно 10 кДа.

В любом варианте осуществления, где указан полилизин, он может относиться к полиэтиленгликоль-поли-D-лизину.

В любом варианте осуществления, где указан полилизин, он может относиться к полиэтиленгликоль-поли-L-лизину.

В любом варианте осуществления, где указан полилизин, он может относиться к полиэтиленгликоль-поли-L/D-лизину.

В любом варианте осуществления, где указан полилизин, он может относиться к полиэтиленгликоль-полилизину, содержащему 2-1000 остатков лизина.

В любом варианте осуществления, где указан полилизин, он может относиться к полиэтиленгликоль-полилизину, содержащему 2-1000 остатков модифицированного лизина.

В любом варианте осуществления, где указан полилизин, он может относиться к полиэтиленгликоль-полилизину, содержащему 10-500 остатков лизина.

В любом варианте осуществления, где указан полилизин, он может относиться к полиэтиленгликоль-полилизину, содержащему 10-500 остатков модифицированного лизина.

В любом варианте осуществления, где указан полилизин, он может относиться к полиэтиленгликоль-полилизину, содержащему 20-100 остатков лизина.

В любом варианте осуществления, где указан полилизин, он может относиться к полиэтиленгликоль-полилизину, содержащему 20-100 остатков модифицированного лизина.

В любом варианте осуществления, где указан полилизин, он может относиться к полиэтиленгликоль-полилизину, содержащему 20-50 остатков лизина.

В любом варианте осуществления, где указан полилизин, он может относиться к полиэтиленгликоль-полилизину, содержащему 20-50 остатков модифицированного лизина.

В любом варианте осуществления, где указан полилизин, он может относиться к полиэтиленгликоль-полилизину, содержащему 25-40 остатков лизина.

В любом варианте осуществления, где указан полилизин, он может относиться к полиэтиленгликоль-полилизину, содержащему 25-40 остатков модифицированного лизина.

Фармацевтически активные средства

Композиции и способы, описанные в данном документе, являются подходящими для доставки фармацевтически активных средств. Фармацевтически активное средство представляет собой любое вещество, способное оказывать фармакологическое действие на организм человека или животного, что приводит к терапевтическому результату.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из генетического материала, химически модифицированных нуклеиновых кислот, терапевтических пептидов,

химиотерапевтических средств, белков, белковых конъюгатов, визуализирующих средств, белковых нуклеиновых кислот, связанных с технологией CRISPR, и природных компонентов вируса, таких как капсиды или ферменты.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из генетического материала.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из генетического материала, такого как ДНК или РНК.

В любом варианте осуществления, где указана ДНК, это может быть плаزمид, линейная ДНК, одноцепочечная ДНК, минимизированные векторы, такие как мини-кольца и мини-нити, свернутая ДНК, включая «шпилькообразную» и «крестообразную» ДНК, и ДНК вирусного происхождения.

В любом варианте осуществления, где указана РНК, она может представлять собой mRNA или siRNA.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из ДНК.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из РНК.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из химически модифицированных нуклеиновых кислот.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из терапевтических пептидов.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из химиотерапевтических средств.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из белков.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из белковых конъюгатов.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из визуализирующих средств.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из белковых нуклеиновых кислот, связанных с технологией CRISPR.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из природных компонентов вируса, таких как капсиды или ферменты.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из нуклеиновых кислот (т. е. плазмид и mRNA), которые кодируют терапевтические белки, такие как моноклональные антитела, например, абциксимаб, адалимумаб, алефацепт, алемтузумаб, базиликсимаб, белимумаб, безлтоксумаб, канакинумаб, цертолизумаба пегол, цетуксимаб, даклизумаб, деносумаб, эфализумаб, голимумаб, инфлектру, ипилимумаб, иксекизумаб, натализумаб, ниволумаб, оларатумаб, омализумаб, паливизумаб, панитумумаб, пембролизумаб, ритуксимаб, тоцилизумаб, трастузумаб, секукинумаб и устекинумаб; ферменты, например, агалзидазу бета, имиглюцеразу, велаглюцеразу альфа, талиглюцеразу, алглюкозидазу альфа, алглюкозидазу альфа, ларонидазу, идурсульфазу для внутривенного введения и галсульфазу; факторы роста и цитокины, например, IL-2 и IFN- α .

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из нуклеиновых кислот (т. е. плазмид и mRNA), которые кодируют терапевтические белки, такие как моноклональные антитела, ферменты, факторы роста и цитокины.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из нуклеиновых кислот (т. е. плазмид и mRNA), которые кодируют моноклональные антитела.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из нуклеиновых кислот (т. е. плазмид и mRNA), которые кодируют моноклональные антитела, выбранные из абциксимаба, адалимумаба, алефацепта, алемтузумаба, базиликсимаба, белимумаба, безлтоксумаба, канакинумаба, цертолизумаба пегола, цетуксимаба, даклизумаба, деносумаба, эфализумаба, голимумаба, инфлектры, ипилимумаба, иксекизумаба, натализумаба, ниволумаба, оларатумаба, омализумаба, паливизумаба, панитумумаба, пембролизумаба, ритуксимаба, тоцилизумаба, трастузумаба, секукинумаба и устекинумаба.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из нуклеиновых кислот (т. е. плазмид и mRNA), которые кодируют ферменты.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из нуклеиновых кислот (т. е.

плазмид и mRNA), которые кодируют ферменты, выбранные из агалтидазы бета, имиглуцеразы, велаглуцеразы альфа, талиглуцеразы, алглюкозидазы альфа, алглюкозидазы альфа, ларонидазы, идурсульфазы для внутривенного введения и галсульфазы.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из нуклеиновых кислот (т. е. плазмид и mRNA), которые кодируют факторы роста.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из нуклеиновых кислот (т. е. плазмид и mRNA), которые кодируют цитокины.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из нуклеиновых кислот (т. е. плазмид и mRNA), которые кодируют цитокины, выбранные из IL-2 и IFN- α .

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из siRNA.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из siRNA, применяемой для снижения экспрессии белка в вариантах применения, включающих регуляцию экспрессии онкогена, фактора роста и цитокинов.

Состав

В одном варианте осуществления предусмотрена фармацевтическая система доставки, которая содержит полипептид, содержащий один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе. Фармацевтическая система доставки представляет собой систему доставки, которую можно использовать для доставки фармацевтически активного средства в организм человека или животного.

В одном варианте осуществления предусмотрено применение одного или нескольких остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе, в фармацевтической системе доставки.

В одном варианте осуществления предусмотрено применение полипептида, как описано в данном документе, в фармацевтической системе доставки.

В одном варианте осуществления предусмотрен полипептид, как описано в данном документе, для применения в качестве фармацевтической системы доставки.

В одном варианте осуществления предусмотрена система доставки для фармацевтически активного средства, что содержит полипептид, содержащий один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе.

Полипептиды, содержащие остатки модифицированного лизина, как описано в данном документе, и фармацевтически активное средство могут быть объединены при осторожном перемешивании в физиологически изотоническом буфере (например, 5% трегалоза или сахароза, 20 мМ HEPES или фосфатно-солевой буфер (PBS)) с образованием наночастиц. Такие составы могут доставляться немедленно, храниться при 4°C или могут быть лиофилизированы для длительного хранения.

Полипептиды, содержащие остатки модифицированного лизина, как описано в данном документе, могут быть получены в форме, подходящей для перорального введения, например, в виде таблеток или капсул, для парентеральной инъекции (включая внутривенную, подкожную, внутрикожную, внутримышечную, внутрисосудистую инъекцию или инфузию), для местного применения в виде мази или крема или для ректального введения в виде суппозитория. В частности, полипептиды, содержащие остатки модифицированного лизина, как описано в данном документе, могут быть получены в форме, подходящей для инъекции, например, внутривенной, подкожной, внутрикожной или внутримышечной инъекции.

Применения

Полипептиды, содержащие один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе, могут применяться для доставки фармацевтически активного средства, подходящего для лечения широкого спектра заболеваний, включая нарушения обмена веществ, иммунологические нарушения, гормональные нарушения, рак, гематологические нарушения, генетические нарушения, инфекционную болезнь, заболевание сердца, заболевание костей, респираторные заболевания, неврологические нарушения, применения как вспомогательной терапии, для лечения нарушений со стороны органа зрения или нарушений всасывания. Терапевтическое применение может включать системную экспрессию белков (т. е. антител для лечения от вирусов) или направленную доставку (например, к метастатическим опухолям, CAR-T *in vivo*).

В одном варианте осуществления предусмотрена фармацевтическая система доставки, которая содержит полипептид, содержащий один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе, для применения в терапии.

В одном варианте осуществления предусмотрена система доставки для фармацевтически активного средства, что содержит полипептид, содержащий один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе, для применения в терапии.

В одном варианте осуществления предусмотрена фармацевтическая система доставки, которая содержит полипептид, содержащий один или несколько остатков

модифицированного лизина, как описано в данном документе, для применения в лечении нарушений обмена веществ, иммунологических нарушений, гормональных нарушений, рака, гематологических нарушений, генетических нарушений, инфекционного заболевания, заболевания сердца, заболеваний костей, респираторных заболеваний, неврологических нарушений, применения как вспомогательной терапии, в лечении нарушений со стороны органа зрения или нарушений всасывания.

В одном варианте осуществления предусмотрена система доставки для фармацевтически активного средства, что содержит полипептид, содержащий один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе, для применения в лечении нарушений обмена веществ, иммунологических нарушений, гормональных нарушений, рака, гематологических нарушений, генетических нарушений, инфекционного заболевания, заболевания сердца, заболеваний костей, респираторных заболеваний, неврологических нарушений, во вспомогательной терапии, в лечении нарушений со стороны органа зрения или нарушений всасывания.

В одном варианте осуществления предусмотрена система доставки для фармацевтически активного средства, что содержит полипептид, содержащий один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе, для применения в генной терапии.

Применяемые в данном документе термины «лечение» и «лечить» означают реверсию, облегчение, отсрочку начала или подавление прогрессирования заболевания или нарушения или одного или нескольких их симптомов, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления лечение можно проводить после развития одного или нескольких симптомов. В других вариантах осуществления лечение можно проводить при отсутствии симптомов. Например, лечение предрасположенного индивидуума можно проводить до появления симптомов (например, с учетом наличия симптомов в анамнезе и/или с учетом генетических или других факторов предрасположенности). Лечение также можно продолжать после исчезновения симптомов, например, чтобы предупредить или отсрочить их рецидив.

Фармацевтические композиции

В одном варианте осуществления предусмотрена фармацевтическая композиция, которая содержит полипептид, содержащий один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе.

В одном варианте осуществления предусмотрена фармацевтическая композиция, которая содержит полипептид, содержащий один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе, и фармацевтически активное средство.

В одном варианте осуществления предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид, содержащий один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе, для применения в терапии.

В одном варианте осуществления предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид, содержащий один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе, и фармацевтически активное средство для применения в терапии.

В одном варианте осуществления предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид, содержащий один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе, для применения в лечении нарушений обмена веществ, иммунологических нарушений, гормональных нарушений, рака, гематологических нарушений, генетических нарушений, инфекционного заболевания, заболевания сердца, заболеваний костей, респираторных заболеваний, неврологических нарушений, применения как вспомогательной терапии, в лечении нарушений со стороны органа зрения или нарушений всасывания.

В одном варианте осуществления предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид, содержащий один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе, и фармацевтически активное средство для применения в лечении нарушений обмена веществ, иммунологических нарушений, гормональных нарушений, рака, гематологических нарушений, генетических нарушений, инфекционного заболевания, заболевания сердца, заболеваний костей, респираторных заболеваний, неврологических нарушений, применения как вспомогательной терапии, в лечении нарушений со стороны органа зрения или нарушений всасывания.

В одном варианте осуществления предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид, содержащий один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе, и фармацевтически активное средство для применения в генной терапии.

В одном варианте осуществления предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид, содержащий один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе, для применения в генной терапии.

Способы лечения

В одном варианте осуществления предусмотрен способ лечения нарушений обмена веществ, иммунологических нарушений, гормональных нарушений, рака, гематологических нарушений, генетических нарушений, инфекционного заболевания, заболевания сердца, заболеваний костей, респираторных заболеваний, неврологических нарушений, применения как вспомогательной терапии, лечения нарушений со стороны органа зрения или нарушений всасывания у теплокровного животного, такого как человек, который включает введение указанному животному эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей полипептид, содержащий один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе.

В одном варианте осуществления предусмотрен способ лечения нарушений обмена веществ, иммунологических нарушений, гормональных нарушений, рака, гематологических нарушений, генетических нарушений, инфекционного заболевания, заболевания сердца, заболеваний костей, респираторных заболеваний, неврологических нарушений, применения как вспомогательной терапии, лечения нарушений со стороны органа зрения или нарушений всасывания у теплокровного животного, такого как человек, который включает введение указанному животному эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей полипептид, содержащий один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе, и фармацевтически активное средство.

В одном варианте осуществления предусмотрен способ генной терапии, который включает введение полипептида, содержащего один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе.

В одном варианте осуществления предусмотрен способ генной терапии, который включает введение полипептида, содержащего один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе, и фармацевтически активного средства.

Применение фармацевтических композиций

В одном варианте осуществления предусмотрено применение фармацевтической композиции, которая содержит полипептид, содержащий один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе, в получении лекарственного препарата для лечения нарушений обмена веществ, иммунологических

нарушений, гормональных нарушений, рака, гематологических нарушений, генетических нарушений, инфекционного заболевания, заболевания сердца, заболеваний костей, респираторных заболеваний, неврологических нарушений, применения как вспомогательной терапии, для лечения нарушений со стороны органа зрения или нарушений всасывания.

В одном варианте осуществления предусмотрено применение фармацевтической композиции, которая содержит полипептид, содержащий один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе, и фармацевтически активное средство, в получении лекарственного препарата для лечения нарушений обмена веществ, иммунологических нарушений, гормональных нарушений, рака, гематологических нарушений, генетических нарушений, инфекционного заболевания, заболевания сердца, заболеваний костей, респираторных заболеваний, неврологических нарушений, применения как вспомогательной терапии, для лечения нарушений со стороны органа зрения или нарушений всасывания.

В одном варианте осуществления предусмотрено применение фармацевтической композиции, которая содержит полипептид, содержащий один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе, в генной терапии.

В одном варианте осуществления предусмотрено применение фармацевтической композиции, которая содержит полипептид, содержащий один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе, и фармацевтически активное средство, в генной терапии.

Наборы

В одном варианте осуществления предусмотрен набор, содержащий:

- a) полипептид, содержащий один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе, в первом компоненте;
- b) фармацевтически активное средство во втором компоненте и
- c) средство-контейнер для вмещения указанных первого и второго компонентов.

В одном варианте осуществления предусмотрен набор, содержащий:

- a) полипептид, содержащий один или несколько остатков модифицированного лизина, как описано в данном документе, в первом компоненте;
- b) фармацевтически активное средство во втором компоненте и
- c) средство-контейнер для вмещения указанных первого и второго компонентов;
- d) инструкции по применению.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1А. Показаны результаты эксперимента 1а) на буферизацию: кислотно-основное титрование. На графике представлены буферные свойства указанных полимеров в растворе в диапазоне рН 4,5-6,5.

Фигура 1В. Показаны результаты эксперимента 1б) на буферизацию: буферизация лизосом. Буферные свойства указанных полимеров в живых клетках представлены в виде коэффициента наложения Мандера (0-1): зеленый сигнал (нейтральный рН), совмещенный с красным сигналом (кислотный рН)/общий зеленый сигнал. Коэффициент Мандера - это величина от 0 до 1, которую можно приблизительно определить как соотношение подкисленных комплексов и общего количества комплексов. Если происходит буферизация, ячейки остаются зелеными, если же буферизация не происходит, ячейки становятся все более красными.

Фигура 2А. Показаны результаты эксперимента 2а) на стабильность наночастиц: анионная диссоциация. Оценка стабильности наночастиц с точки зрения анионного замещения рDNA декстрансульфатом (DS), количественно определяемая по интенсивности полос ДНК наночастиц, подверженных воздействию различных концентраций DS, и анализируемая *с помощью* гель-электрофореза.

Фигура 2В. Показаны результаты эксперимента 2б) на стабильность наночастиц: стабильность наночастиц в кровотоке. Репрезентативные интравитальные РК-изображения мочки уха, полученные в разные моменты времени после инъекции в хвостовую вену наночастиц Cy5-рDNA, где сигнал в сосудистых структурах указывал на то, что наночастицы (NP) остаются в кровотоке. На шкалах делений отображено 100 мкм.

Фигура 3А. Показаны результаты эксперимента 3) на трансфекцию наночастиц. Трансфекция клеток H1299. Нормализованная люминесценция после обработки клеток наночастицами на основе поли-L-лизина (PLL), кодирующими люциферазу в OPTI-MEM.

Фигура 3В. Показаны результаты эксперимента 3) на трансфекцию наночастиц. Трансфекция клетки H1299 в сыворотке крови. Нормализованная люминесценция после обработки клеток наночастицами на основе PLL, кодирующими люциферазу, в среде, дополненной 10% FBS и 100 нМ хлорохина.

Фигура 4. Показаны результаты эксперимента 3) на трансфекцию наночастиц. Трансфекция миотрубок C2C12. Нормализованная люминесценция после обработки клеток наночастицами на основе PLL, кодирующими люциферазу, при следующих условиях: (А) OPTI-MEM, (В) OPTI-MEM, дополненная 100 мкМ хлорохина, (С) среда, дополненная FBS, и (D) среда, дополненная 100 мкМ хлорохина и 10% FBS.

Фигура 5. Показаны результаты эксперимента 5) на внутримышечную трансфекцию. Экспрессия внутримышечной люциферазы у мыши. Люминесценцию в задних

конечностях мышей после внутримышечной инъекции 5 мкг комплексной pDNA оценивали *с помощью* программного обеспечения IVIS и IVIS Perkin Elmer (n=8).

ПРИМЕРЫ

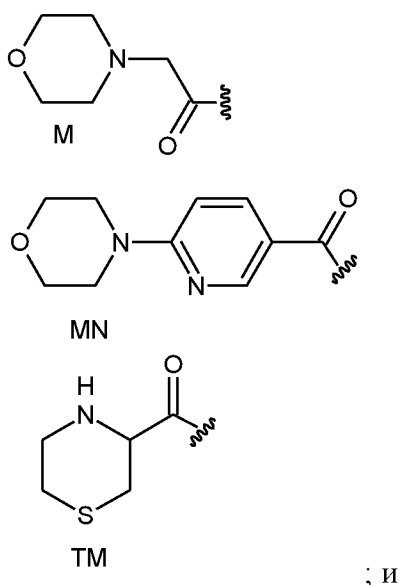
Аббревиатуры, используемые в данном документе

В данном **документе** для обозначения конкретного полимера или наночастицы используется следующее сокращение:

«Р» или «N»: «PLL» или «PEG-PLL» (модификация) % модификации например, «Р: PLL(M) 33» и «N: PEG-PLL(TM) 30».

Пояснение:

- Р: полимер;
- N: наночастица;
- PLL: поли-L-лизин, представляющий собой полипептид;
- PEG-PLL: полипептид, содержащий как полимер полиэтиленгликоль, так и полипептид поли-L-лизин;
- модификация: представляет собой модификацию при ε-атоме азота лизина (как показано в формуле (I) в соответствии с нижеследующими пояснениями «M», «MN» или «TM»:

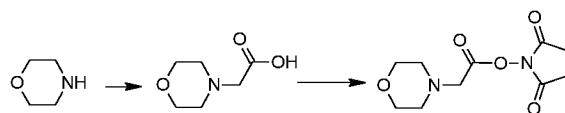


- % модификации: относится к следующему:

$$\frac{\text{модифицированные } \epsilon\text{-атомы азота}}{\text{модифицированные } \epsilon\text{-атомы азота} + \text{немодифицированные } \epsilon\text{-атомы азота}} \times 100\%$$

Способ 1

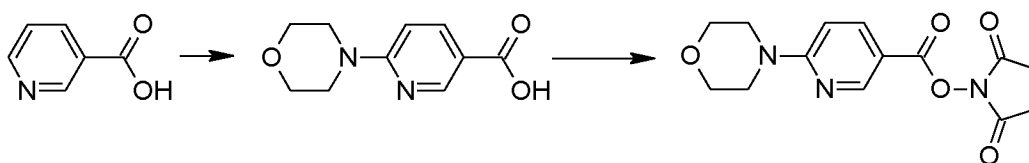
Синтез 1-{[(морфолин-4-ил)ацетил]окси}пирролидин-2,5-диона



(Морфолин-4-ил)уксусную кислоту (1 г, 6,89 ммоль) растворяли в дихлорметане (DCM) (25 мл) и добавляли N-гидроксисукцинимид (NHS) (872 мг, 7,58 ммоль) и N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорид (EDC·HCl) (1,60 г, 8,35 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего фильтровали через слой силикагеля размером 2" x 3". Слой промывали с помощью DCM (3 x 25 мл), и фильтрат объединяли со смывами и концентрировали с получением 1-[(морфолин-4-ил)ацетил]окси}пирролидин-2,5-диона (1,3 г, 78%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 3,75 (d, $J = 3,6$ Гц, 4H), 3,57 (s, 2H), 2,85 (s, 4H), 2,67 (d, $J = 4,2$ Гц, 4H); MS (ESI) расч.: 242,09, изм.: 243,3 (M+1).

Способ 2

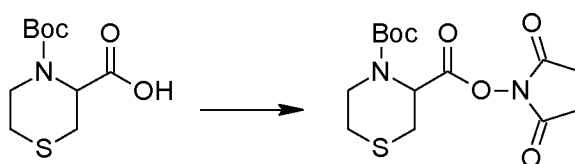
Синтез 1-[[6-(морфолин-4-ил)пиридин-3-карбонил]окси}пирролидин-2,5-диона



6-(Морфолин-4-ил)пиридин-3-карбоновую кислоту (350 мг, 1,68 ммоль) растворяли в DCM (25 мл) при комнатной температуре и при перемешивании. Добавляли NHS (213 мг, 1,85 ммоль) с **последующим** добавлением EDC·HCl (418 мг, 2,18 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч и затем фильтровали через слой силикагеля размером 2" x 3". Слой промывали с помощью DCM (3 x 25 мл) и этилацетата (25 мл). Фильтрат и смывы объединяли и концентрировали с получением 1-[[6-(морфолин-4-ил)пиридин-3-карбонил]окси}пирролидин-2,5-диона (325 мг, 63%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 8,89 (s, 1H), 8,07 (dd, $J = 9,3$ Гц, 1,5 Гц, 1H), 6,60 (d, $J = 9,3$ Гц, 1H), 3,80 (d, $J = 4,2$ Гц, 4H) 3,72 (d, $J = 4,2$ Гц, 4H), 2,89 (s, 4H). MS (ESI) расч.: 305,1, изм.: 306,3 (M+1).

Способ 3

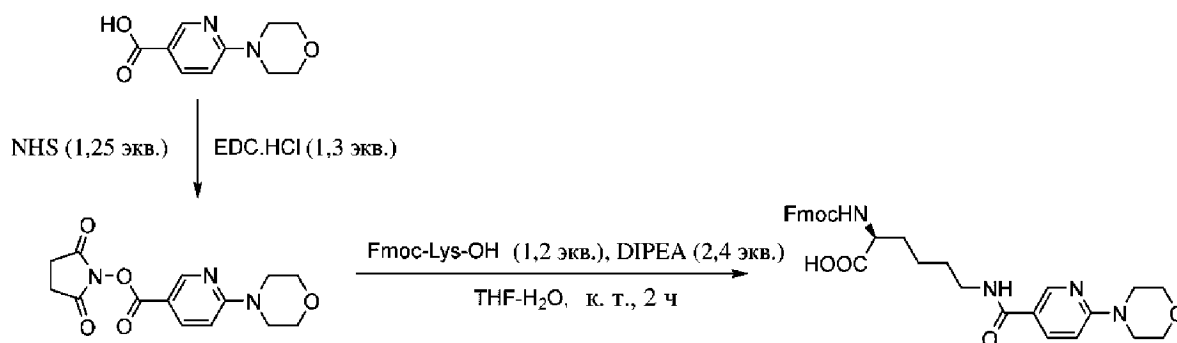
Синтез трет-бутил-3-[[[(2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси]карбонил}тиоморфолин-4-карбоксилата



4-(трет-Бутоксикарбонил)тиоморфолин-3-карбоновую кислоту (1 г, 4,04 ммоль) растворяли в DCM (25 мл) при комнатной температуре и при перемешивании. Добавляли NHS (511 мг, 4,44 ммоль) с последующим добавлением EDC·HCl (1,01 г, 5,25 ммоль). Реакционную смесь **перемешивали** при комнатной температуре в течение 1 ч и затем фильтровали через слой силикагеля размером 2" x 3". Слой промывали с помощью DCM (3 x 25 мл), и фильтрат объединяли со смывами и концентрировали с получением трет-бутил-3-{[(2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси]карбонил}тиоморфолин-4-карбоксилата (1,3 г, 93,4%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 5,38 (br s, 1H), 4,43-4,22 (m, 1H), 3,46-3,21 (m, 1H), 3,19-3,10 (m, 1H), 3,06-2,97 (m, 1H), 2,85 (s, 4H), 2,81-2,62 (m, 1H), 2,61-2,42 (m, 1H), 1,47 (s, 9H). MS (ESI) расч.: 345,4 (M+1).

Способ 4

Синтез N2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-N6-(6-морфолиноникотиноил)-L-лизина



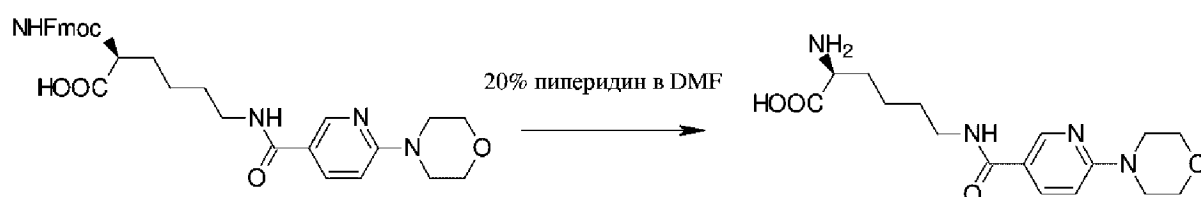
Флуоренилметилоксикарбонилхлорид-L-лизин (Fmoc-Lys-OH) (15,3 г, 41,53 ммоль, 1,2 экв.) растворяли в смеси THF-вода (1:1, 800 мл) при механическом перемешивании и при комнатной температуре. Добавляли одной порцией раствор ранее приготовленного сложного эфира (способ 2) в DCM с последующим добавлением DIPEA (10,73 г, 82,99 ммоль, 2,4 экв.). **Реакционную** смесь дополнительно перемешивали при комнатной температуре до поглощения исходного материала (TLC, 2 ч), затем добавляли этилацетат (EtOAc) (250 мл). Смесь подкисляли с помощью HCl (1 M, 200 мл), выливали в делительную воронку, и слои разделяли. Водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (2 x 250 мл). Органические слои объединяли, промывали солевым раствором (200 мл), высушивали над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт получали в виде маслянистого остатка светло-коричневого цвета, который растворяли в THF, адсорбировали на силикагеле и очищали посредством флэш-хроматографии на колонке (7" x 3") с силикагелем. Колонку промывали с помощью 50% этилацетата в гексанах и с помощью 100% этилацетата с элюированием продукта под вакуумной вытяжкой. Фракции, содержащие необходимый продукт, объединяли и

концентрировали в вакууме с получением N2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-N6-(6-морфолиноникотиноил)-L-лизина (12,6 г, 65%) в виде твердого вещества грязно-белого цвета. ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 9,26 (br s, 1H), 8,62 (d, $J = 1,5$ Гц, 1H), 7,93 (dd, $J = 2,5, 9$ Гц, 1H), 7,71 (d, $J = 7,5$ Гц, 2H), 7,53 (dd, $J = 4,5, 7,5$ Гц, 2H), 7,35 (t, $J = 7,5$ Гц, 2H), 7,23 (q, $J = 6,5$ Гц, 2H), 6,59 (t, $J = 5$ Гц, 1H), 6,48 (d, $J = 9$ Гц, 1H), 5,99 (d, $J = 8$ Гц, 1H), 4,41 (dd, $J = 7,5, 12,5$ Гц, 1H), 4,31 (dd, $J = 12, 18$ Гц, 2H), 4,15 (d, $J = 7$ Гц, 1H), 3,71 (t, $J = 4,5$ Гц, 4H), 3,56-3,32 (m, 6H), 1,98-1,87 (m, 1H), 1,86-1,75 (m, 1H), 1,71-1,57 (m, 2H), 1,56-1,39 (m, 2H) ppm; ^{13}C ЯМР (125 МГц, CDCl_3) δ 175,2, 166,6, 159,9, 156,6, 146,9, 144,1, 143,9, 141,4, 137,7, 127,9, 127,3, 125,3, 120,1, 119,5, 106,3, 67,2, 66,6, 53,8, 47,3, 45,3, 39,5, 32,0, 28,9, 22,4 ppm; MS (ESI) точная расч. масса для $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 559,26; измеренное значение: 559,35.

Пример 1

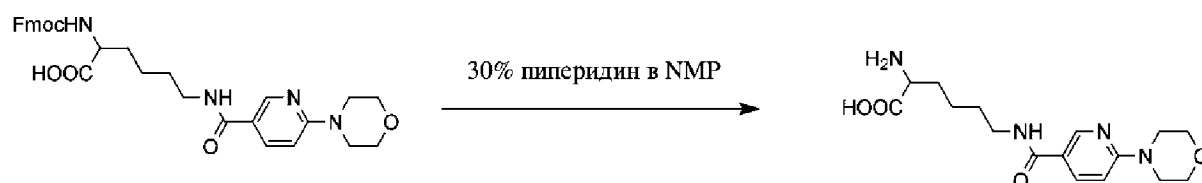
Синтез (2S)-2-амино-6-{[6-(морфолин-4-ил)пиридин-3-карбонил]амино}гексановой кислоты (N6-(6-морфолиноникотиноил)-L-лизина)

Способ 1



Защитную группу Fmoc в N2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-N6-(6-морфолиноникотиноил)-L-лизине (способ 4) можно удалить с помощью стандартных процедур, известных в **уровне** техники, например с применением 20% пиперидина в DMF.

Способ 2

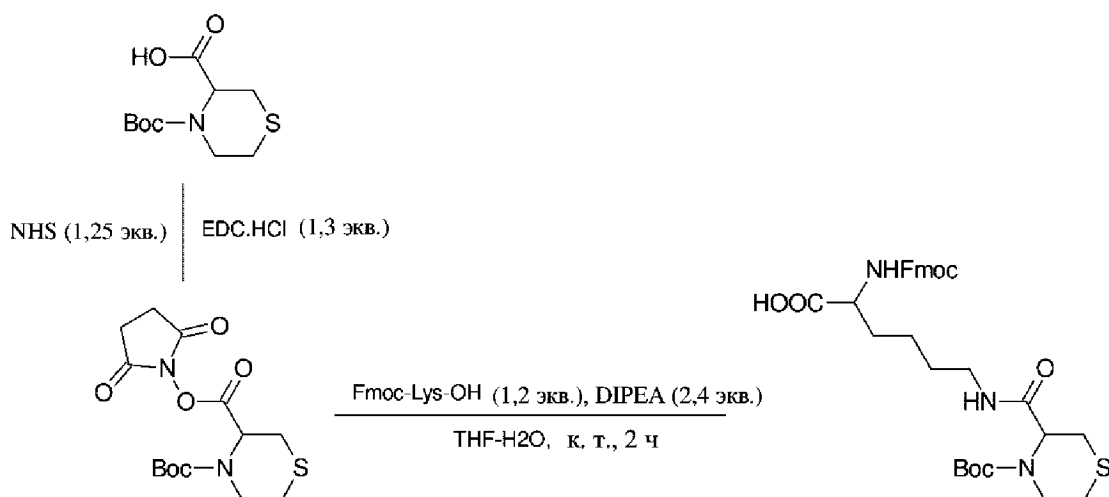


Модифицированный лизин растворяли в 700 мкл NMP (15 мг, 26,87 мкмоль). Затем к раствору (пиперидин:NMP = 7:3; 1 мл) добавляли 300 мкл пиперидина при перемешивании. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем **обеспечивали** осаждение модифицированного лизина и промывали его 3 раза в холодном диэтиловом эфире (10 мл) с применением центрифугирования (4000 g, 10 минут, 4°C). ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) применяли для подтверждения удаления Fmoc. ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 11,89 (s, 1H), 8,85 (dd, 1H), 7,89 (dd, 1H), 7,34 (dd, 1H), 3,52-

3,71(m, 8H), 3,35 (t, 1H), 2,72-2,61 (t, 2H), 2,01-1,57 (m, 6H) ppm. MS (ESI) точная расч. масса $[M+H_2O]^+$: 352,55; измеренное значение: 352,04.

Способ 5

Синтез N2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-N6-(4-(трет-бутоксикарбонил)тиоморфолин-3-карбонил)-L-лизина



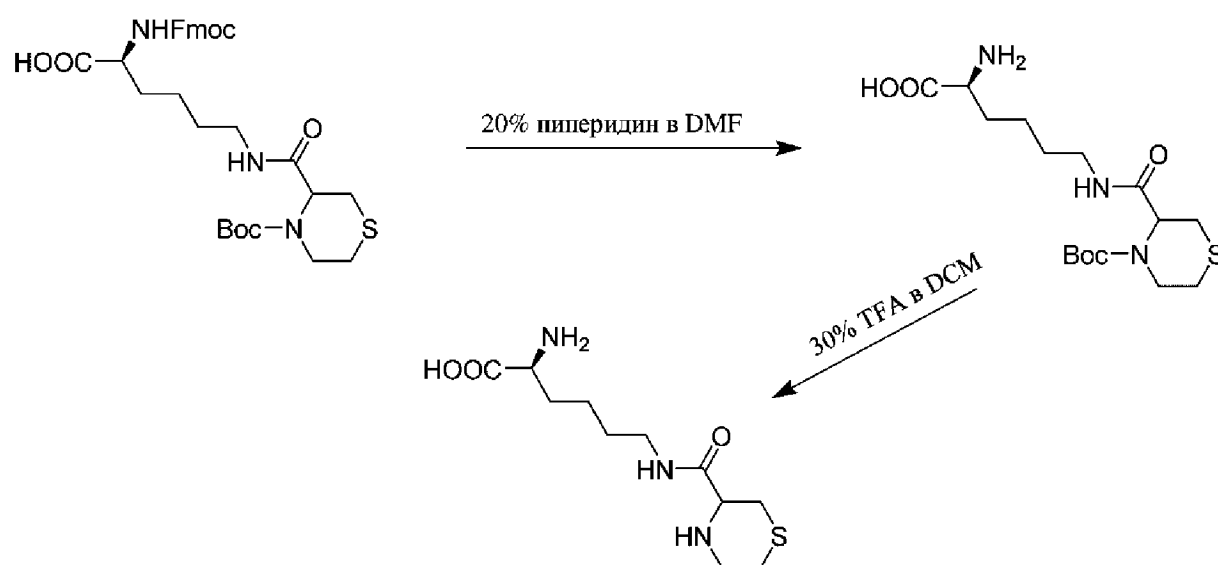
Fmoc-L-Lys-OH (8,94 г, 24,26 ммоль, 1,2 экв.) растворяли в смеси THF-вода (1:1, 800 мл) при механическом перемешивании и при комнатной температуре. Добавляли одной порцией раствор ранее полученного активированного сложного эфира (способ 3) в DCM с последующим добавлением DIPEA (6,27 г, 48,53 ммоль, 2,4 экв.). Реакционную смесь дополнительно перемешивали при комнатной температуре до поглощения исходного материала (TLC, 2 ч), затем добавляли EtOAc (250 мл). Смесь подкисляли с помощью HCl (1 М, 200 мл), выливали в делительную воронку, и слои разделяли. Водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (2 x 250 мл). Органические слои объединяли, промывали солевым раствором (200 мл), высушивали над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт получали в виде маслянистого остатка светло-желтого цвета, который растворяли в DCM, адсорбировали на силикагеле и очищали посредством флэш-хроматографии на колонке (7" x 3") с силикагелем. Колонку промывали с помощью 50%-70% этилацетата в гексанах с элюированием продукта под вакуумной вытяжкой. Фракции, содержащие необходимый продукт, объединяли и концентрировали в вакууме с получением N2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-N6-(4-(трет-бутоксикарбонил)тиоморфолин-3-карбонил)-L-лизина (9,1 г, 75%) в виде твердого вещества грязно-белого цвета. ¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ 7,75 (d, J = 7,5 Гц, 2H), 7,63-7,51 (m, 2H), 7,38 (t, J = 7,5 Гц, 2H), 7,29 (t, J = 7,5 Гц, 2H), 5,71 (dd, J = 7,5, 23 Гц, 1H), 4,97 (br s, 1H), 4,57-4,23 (m, 4H), 4,20 (t, J = 7 Гц, 1H), 3,51-3,18 (m, 3H), 3,17-2,96 (br s, 1H), 2,77 (d, J = 12,5 Гц, 1H), 2,70-2,58 (m, 1H), 2,38 (d, J = 12,5 Гц, 1H),

1,98-1,86 (m, 1H), 1,85-1,73 (m, 1H), 1,66-1,53 (m, 2H), 1,46 (br s, 12H) ppm; ^{13}C ЯМР (125 МГц, CDCl_3) δ 175,0, 156,4, 155,8, 143,9, 141,4, 127,9, 127,3, 125,3, 120,1, 67,3, 60,6, 53,8, 47,3, 39,2, 31,5, 29,1, 28,5, 26,7, 22,3 ppm; MS (ESI) точная расч. масса для $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 620,24; измеренное значение: 620,35.

Пример 2

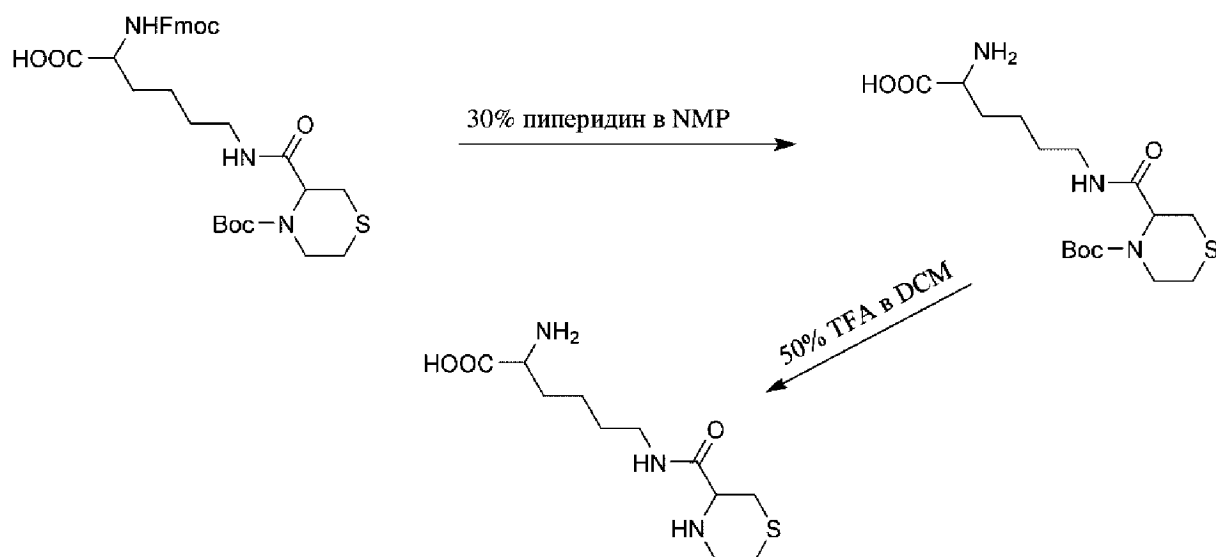
Синтез (2S)-2-амино-6-[(тиоморфолин-3-карбонил)амино]гексановой кислоты (N6-(тиоморфолин-3-карбонил)-L-лизина)

Способ 1



Защитную группу Fmoc в N2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-N6-(4-(трет-бутоксикарбонил)тиоморфолин-3-карбонил)-L-лизине (способ 5) можно удалить с помощью стандартных процедур, известных в уровне техники, например с применением 20% пиперидина в DMF. Подобным образом защитную группу Boc можно удалить с помощью стандартных процедур, известных в уровне техники, например с применением 30% TFA в DCM.

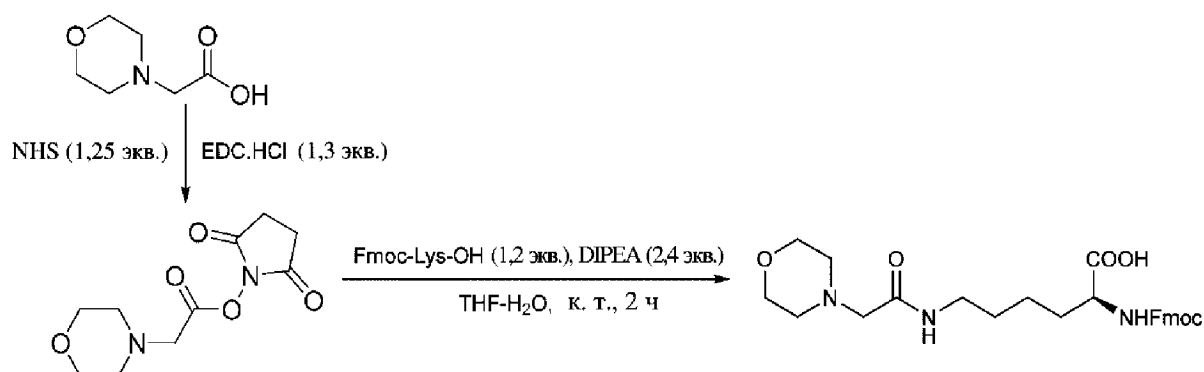
Способ 2



Модифицированный лизин растворяли в 700 мкл NMP (15 мг, 25,12 мкмоль). Затем к раствору (пиперидин:NMP = 7:3; 1 мл) добавляли 300 мкл пиперидина при перемешивании. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут с удалением защитной группы Fmoc. Затем обеспечивали осаждение модифицированного лизина и промывали его 3 раза в холодном диэтиловом эфире (10 мл) с применением центрифугирования (4000 g, 10 минут, 4°C). После высушивания на воздухе в течение ночи продукт растворяли в 50% растворе TFA:DCM (1 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут. Удаляли раствор TFA:DCM с применением роторного испарителя, обеспечивали осаждение материала и промывали его 2 раза в холодном этиловом эфире. Подтверждали удаление Fmoc с применением ^1H ЯМР: δ 11,56-12,04 (1H, br), 7,34 (s, 1H), 3,65-3,76 (dd, 2H), 3,42 (t, $J = 7,3$ Гц, 1H), 3,01-3,15 (m, 2H), 2,70-2,89 (m, 2H), 2,55-2,61 (t, $J = 5,6$ Гц, 2H), 2,06-2,18 (m, 2H), 1,74-1,85 (m, 2H), 1,58-1,64 (q, 2H) 1,05 (1H, s) ppm и MS (ESI) точная расч. масса $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}]^+$: 279,22; измеренное значение: 279,62.

Способ 6

Синтез N2(1-{[(морфолин-4-ил)ацетил]окси}пирролидин-2,5-дион)-L-лизина

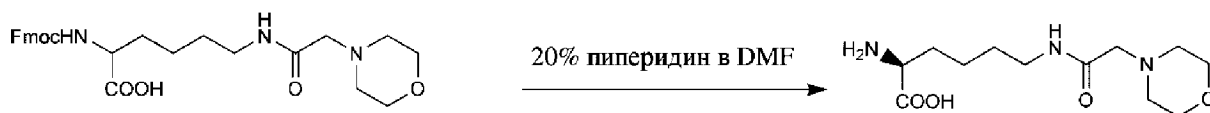


Следующую процедуру можно применять для получения N2-(1-{[(морфолин-4-ил)ацетил]окси}пирролидин-2,5-дион)-L-лизина. Fmoc-L-Lys-OH (1,2 экв.) можно растворить в смеси THF-вода (1:1, 800 мл) при механическом перемешивании и при комнатной температуре. Раствор ранее полученного активированного сложного эфира в DCM можно добавить одной порцией с последующим добавлением DIPEA (2,4 экв.). Реакционную смесь можно дополнительно перемешивать при комнатной температуре до поглощения исходного материала (TLC, 2 ч), затем можно добавить EtOAc (250 мл). Смесь можно подкислить с помощью HCl (1 М, 200 мл), вылить в делительную воронку, и слои разделить. Водный слой можно экстрагировать с помощью EtOAc (2 x 250 мл). Органические слои можно объединить, промыть солевым раствором (200 мл), высушить над безводным Na2SO4, профильтровать и концентрировать в вакууме. Неочищенный продукт можно растворить в DCM, адсорбировать на силикагеле и очистить посредством флэш-хроматографии на колонке (7" x 3") с силикагелем. Колонку можно промыть с помощью 50%-70% этилацетата в гексанах с элюированием продукта под вакуумной вытяжкой. Фракции, содержащие необходимый продукт, можно объединить и концентрировать в вакууме с получением N2-(N2(1-{[(морфолин-4-ил)ацетил]окси}пирролидин-2,5-дион)-L-лизина.

Пример 3

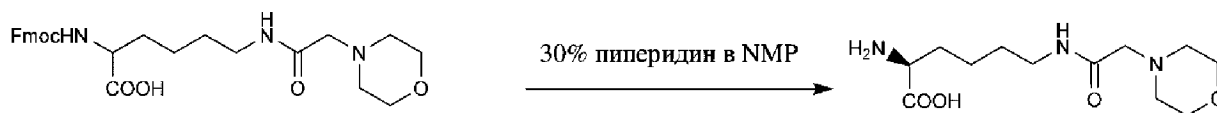
Синтез (2S)-2-амино-6-[2-(морфолин-4-ил)ацетида]гексановой кислоты (N6-(2-морфолиноацетил)-L-лизина)

Способ 1



Защитную группу Fmoc в N2-(1-{[(морфолин-4-ил)ацетил]окси}пирролидин-2,5-дион)-L-лизине (способ 6) можно удалить с помощью стандартных процедур, известных в уровне техники, например с применением 20% пиперидина в DMF.

Способ 2

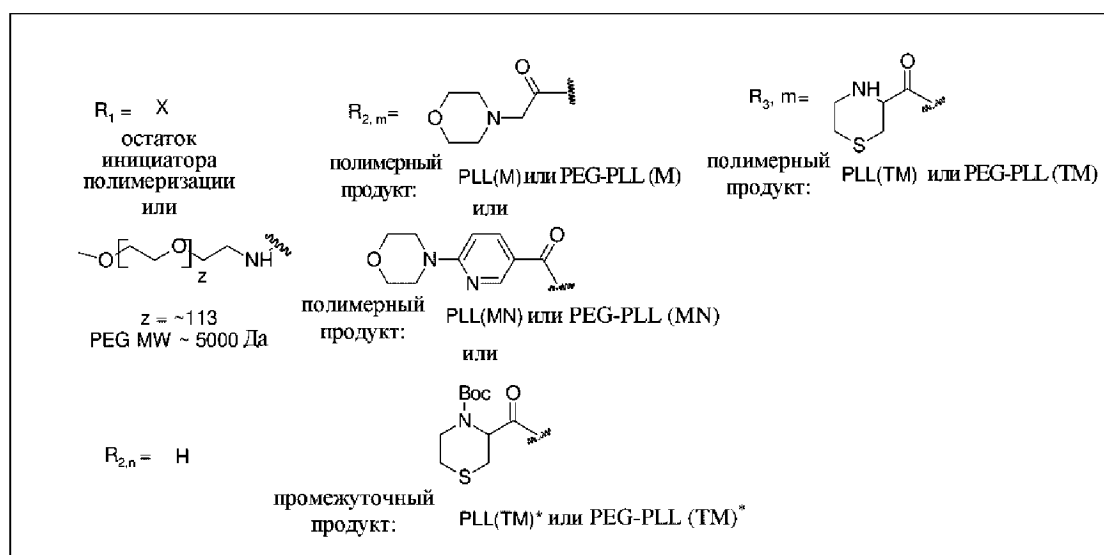
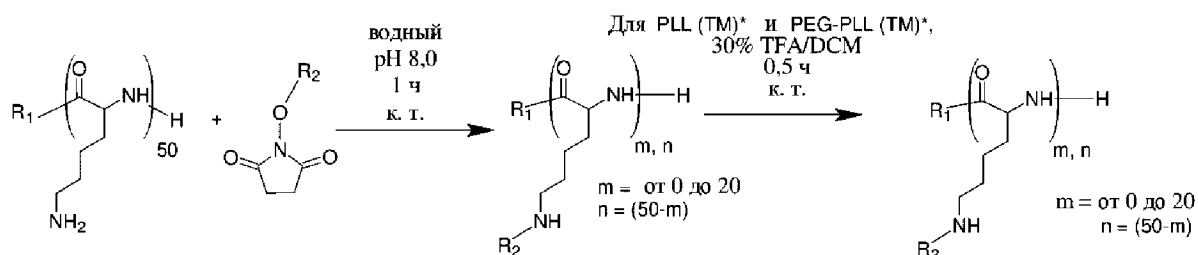


Модифицированный лизин растворяли в 700 мкл NMP (15 мг, 25,02 мкмоль). Затем к раствору (пиперидин:NMP = 7:3; 1 мл) добавляли 300 мкл пиперидина при перемешивании. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем обеспечивали осаждение модифицированного лизина и промывали его 3

раза в холодном диэтиловом эфире (10 мл) с применением центрифугирования (4000 g, 10 минут, 4°C). Удаление Fmoc подтверждали с применением Н-ЯМР: ¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ 12,01 (br s, 1H), 3,62-3,74 (m, 4H), 3,40 (t, 1H), 3,29 (s, 2H), 3,10 (t, 1H), 2,59-2,70 (m, 4H), 1,88-2,01 (m, 2H), 1,58-1,65 (m, 2H) и 1,46-1,56 (q, 2H), и MS (ESI) точная расч. масса [M+H₂O]⁺: 273,17; измеренное значение: 273,33.

Пример 4

Полипептиды поли(L-лизин) и PEG-поли(L-лизин)



Модифицированные PEG-PLL и PLL получали путем осуществления реакции NHS-сложных эфиров, полученных в способах 1-3, с соответствующими PLL (MW 5000, Alamanda Polymers Inc., Хантсвилл, Алабама) или PEG-PLL (MW 13000, Alamanda Polymers Inc., Хантсвилл, Алабама). Все полимеры снабжали остатком инициатора полимеризации (обозначено в данном документе просто как PLL) или группой MeO-PEG-(CH₂)₂-NH- (обозначено в данном документе как PEG-PLL) на концевом карбоксильном участке PLL. PLL (20 мг, 2,5 мкмоль) или PEG-PLL (20 мг, 1,5 мкмоль) растворяли в свежеприготовленном 0,1 М бикарбонате натрия, pH 8,0 (4 мл). 40 мМ соединений согласно способам 1, 2 или 3 готовили в диметилацетамиде (DMAC) (1,5 молярный избыток) и добавляли по каплям к раствору полимера при перемешивании. Готовили серии PLL с различными степенями модификации, контролируя молярное соотношение подаваемых NHS-сложных эфиров. Реакции модификации проводили при наличии 12,5-50

молярных эквивалентов смеси NHS-сложный эфир : полимер. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа, и затем не прореагировавшие группы удаляли посредством диализа в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS) с pH 7,4, а затем в воде с применением кассеты для диализа с отсечением по молекулярной массе (MWCO) 3,5 кДа. В случае PLL(TM) и PEG-PLL(TM) защитную группу Вос в промежуточных продуктах (*) удаляли с применением стандартного протокола, применяемого в предшествующем уровне техники, посредством инкубирования лиофилизированного продукта в 30% трифторуксусной кислоте/DCM в течение 30 минут. Степень модификации лизина определяли на основании спектров Н-ЯМР, записанных в D₂O, по соотношению интенсивностей пиков β, γ и δ-метиленовых протонов Lys ((CH₂)₃, δ = 1,3–1,9 ppm) и суммы интенсивностей пиков метиленовых протонов из морфолиновых колец морфолина (M) (исходный материал, способ 1) и морфолино-ниациновых групп (исходный материал, способ 2) (MN) (CH₂)₂, δ = 3,86 и 2,58 ppm, для морфолина и морфолино-ниацина, и (CH₂)₂, δ = 3,11 и 3,56 ppm для тиоморфолина (TM) (исходный материал, способ 3), и результаты представлены в таблице ниже.

| Поли
мер № | Аббревиа
тура
полимера | Соотнош
ение
подачи
(моли
NHS : мо
ли
амина) | Модифициров
анные лизины
(%) | Модифициров
анные лизины | Немодифициров
анные лизины |
|---------------|------------------------------|--|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 1 | P: PLL (M)
24 | 0,25 | 24 | 12 | 38 |
| 2 | P: PLL (M)
37 | 0,50 | 37 | 18,5 | 31,5 |
| 3 | P: PLL (M)
53 | 1 | 53 | 26,5 | 23,5 |
| 4 | P: PLL
(MN) 24 | 0,25 | 24 | 12 | 38 |
| 5 | P: PLL
(MN) 32 | 0,50 | 32 | 16 | 34 |

| Поли
мер № | Аббревиа
тура
полимера | Соотнош
ение
подачи
(моли
NHS : мо
ли
амина) | Модифициров
анные лизины
(%) | Модифициров
анные лизины | Немодифициров
анные лизины |
|---------------|------------------------------|--|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 6 | P: PLL
(MN) 51 | 1 | 51 | 25,5 | 24,5 |
| 7 | P: PLL
(TM) 21 | 0,25 | 21 | 10,5 | 39,5 |
| 8 | P: PLL
(TM) 39 | 0,50 | 39 | 16,5 | 33,5 |
| 9 | P: PLL
(TM) 50 | 1 | 50 | 25 | 25 |
| 10 | P: PEG-
PLL (M)
24 | 0,25 | 24 | 12 | 38 |
| 12 | P: PEG-
PLL (M)
35 | 0,50 | 35 | 17,5 | 32,5 |
| 13 | P: PEG-
PLL (M)
63 | 1 | 63 | 31,5 | 18,5 |
| 14 | P: PEG-
PLL (MN)
24 | 0,25 | 24 | 12 | 38 |
| 15 | P: PEG-
PLL (MN)
39 | 0,50 | 39 | 19,5 | 30,5 |
| 16 | P: PEG-
PLL (MN)
65 | 1 | 65 | 32,5 | 17,5 |

| Полимер № | Аббревиатура полимера | Соотношение подачи (моли NHS : моли амина) | Модифицированные лизины (%) | Модифицированные лизины | Немодифицированные лизины |
|-----------|-----------------------|--|-----------------------------|-------------------------|---------------------------|
| 17 | P: PEG-PLL (TM) 24 | 0,25 | 24 | 12 | 38 |
| 18 | P: PEG-PLL (TM) 33 | 0,50 | 33 | 16,5 | 33,5 |
| 19 | P: PEG-PLL (TM) 61 | 1 | 61 | 30,5 | 19,5 |

Таблица 1. Модифицированные PLL и PEG-PLL

Пример 5

Получение наночастиц с генетическим материалом и определение их характеристик

Наночастицы получали путем смешивания растворов полипептида и нуклеиновой кислоты в нейтральном буфере. Наночастицы оценивали с применением стандартных методик, включая динамическое рассеяние света (DLS), трансмиссионную электронную микроскопию (TEM) и анализы на исключение бромистого этидия, чтобы подтвердить образование наночастиц.

а) Получение наночастиц

ДНК (Gwiz Luciferase; Genlantis, Сан-Диего, Калифорния) (66,6 мкг/мл) и растворы полимеров готовили в 20 mM буфера, представляющего собой 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту (HEPES), pH 7,0. Растворы полимера готовили с использованием PLL (50 единиц, Alamanda Polymers, Inc., Хантсвилл, Алабама), PEG (5K)-PLL (50 единиц) (Alamanda Polymers, Inc., Хантсвилл, Алабама) и «P: PLL(M) 29», «P: PLL(MN) 31», «P: PLL(TM) 28», «P: PEG-PLL(M) 33», «P: PEG-PLL(MN) 31» и «P: PEG-PLL(TM) 30» (все получены согласно процедуре, аналогичной из примера 4). Растворы полимеров также готовили в HEPES, поэтому соотношение аминов (N) в полимере и фосфатов (P) в основной цепи ДНК (соотношение N:P) должно составлять от

0,5 до 10. Затем растворы ДНК добавляли по каплям к растворам полимеров при осторожном встряхивании для обеспечения однородности частиц. Обеспечивали образование наночастиц ДНК/полимер при комнатной температуре в течение 30 минут. Конечная концентрация ДНК в растворе наночастиц составляла 33,3 мкг/мл. Изначально получали комплексы с разными соотношениями N:P (0,5-10) и применяли гель-электрофорез ДНК для определения соотношения, необходимого для конденсации нуклеиновых кислот.

b) Динамическое рассеяние света (DLS)

Данные DLS собирали с применением прибора ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Вустер, Великобритания) с зеленым лазером ($\lambda = 532$ нм) в качестве падающего луча. Все измерения проводили при 25°C и при угле обнаружения 173°. Образцы наночастиц, полученные, как описано выше, в 20 mM буфера HEPES (pH 7,4) с концентрацией комплексов pDNA/мл 33,3 мкг загружали в кварцевую кювету ZEN2112 малого объема (12,5 мкл). Гидродинамический диаметр и коэффициент полидисперсности (PDI) определяли с применением кумулятивного анализа методом аппроксимации. Все измерения проводили с автоматической регулировкой аттенюатора и несколькими сканированиями (от 15 до 20) для точности. Все точки данных представляют собой среднее значение трех или более отдельно полученных образцов.

| N
P
№ | Матер
иал | Модифициров
анные амины
(%) ^a | N/
P ^f | Гидродинамич
еский диаметр
(нм) ^b | Дзета-
потенц
иал
(мВ) ^c | Коэффициент
полидисперсн
ости ^b | морфоло
гия ^d |
|-------------|----------------------|--|----------------------|--|--|--|-----------------------------|
| 1 | N: PLL
0 | 0 | 3 | 90 ± 8 | 221 | 0,34 ± 0,12 | сфера |
| 2 | N:
PLL(M
) 29 | 29 | 5 | 95 ± 10 | 193 | 0,36 ± 0,11 | сфера |
| 3 | N:
PLL(M
N) 31 | 31 | 5 | 98 ± 8 | 202 | 0,29 ± 0,08 | сфера |
| 4 | N:
PLL(T
M) 28 | 28 | 5 | 91 ± 6 | 16 ± 3 | 0,29 ± 0,08 | сфера |

| N
P
№ | Матер
иал | Модифициров
анные амины
(%) ^a | N/
P ^f | Гидродинамич
еский диаметр
(нм) ^b | Дзета-
потенц
иал
(мВ) ^c | Коэффициент
полидисперсн
ости ^b | морфоло
гия ^d |
|-------------|------------------------------|--|----------------------|--|--|--|-----------------------------|
| 5 | N:
PEG-
PLL 0 | 0 | 3 | 99 ± 8 | 1,7 ±
0,5 | 0,32 ± 0,09 | смешанн
ая ^e |
| 6 | N:
PEG-
PLL(M
) 33 | 33 | 5 | 100 ± 8 | 2,9 ±
0,4 | 0,29 ± 0,09 | смешанн
ая ^e |
| 7 | N:
PEG-
PLL(M
N) 31 | 31 | 5 | 106 ± 9 | 1,6 ±
0,7 | 0,34 ± 0,07 | смешанн
ая ^e |
| 8 | N:
PEG-
PLL(T
M) 30 | 30 | 5 | 103 ± 8 | 2,2 ±
0,4 | 0,31 ± 0,07 | смешанн
ая ^e |

Таблица 2. Краткое изложение свойств наночастиц, содержащих ДНК

- Определяли с помощью ¹H ЯМР
- Определяли с помощью динамического рассеяния света
- Определяли с помощью электрофоретического рассеяния света/лазерного доплеровского электрофореза
- Определяли с помощью просвечивающей электронной микроскопии
- Ториоды и стержни
- N/P = молярное соотношение амина и фосфата

Результаты

Эксперимент 1

а) Буферизация

Проводили кислотно-щелочные титрования растворов полимеров для оценки их буферной емкости/способности поддерживать рН при добавлении кислотного раствора, а также проводили исследования внутриклеточной буферизации лизосом для дополнительной оценки буферной способности материалов.

а) Кислотно-основное титрование

Готовили растворы (3 мл) полимеров PEG (5K)-PLL (50 единиц) (Alamada Polymers), PEI (25K, Polysciences Inc), «P: PEG-PLL (M) 35» (полимер 12), «P: PEG-PLL (MN) 39» (полимер 15) и «P: PEG-PLL (TM) 33» (полимер 18) с концентрацией 1 мг/мл в 150 мМ NaCl и титровали до достижения pH 11 путем добавления 1 М NaOH. Растворы полимеров при перемешивании титровали до pH 4,5 с использованием 0,1 М HCl с шагом 5 мкл. Буферная емкость была представлена как средний объем (мкл), необходимый для изменения pH раствора полимера на 0,5. Изменение степени протонирования между внеклеточным нейтральным pH 7,4 и кислотным pH эндосом 4,5 ($\Delta\alpha_{7,4-4,5}$) рассчитывали как количество молей HCl, добавленное для изменения pH с 7,4 до 4,5, деленное на общее количество молей амина в растворе. Все эксперименты по титрованию проводили в трех повторностях. Результаты показаны на фигуре 1А.

б) Буферизация лизосом

Gwiz Luciferase (Genlantis, Сан-Диего, Калифорния) метили двумя флуорофорами, нечувствительным к pH зеленым красителем и чувствительным к pH красным красителем, что позволяло провести оценку pH путем измерения соотношения значений зеленой и красной флуоресценции, совмещенных в одних и тех же пикселях. Сначала метили ДНК с использованием набора MFP488 LabelIT® Nucelic Acid (Mirus Bio LLC, Мэдисон, Висконсин), а затем функционализировали амином с помощью набора Amin LabelIT® Nucelic Acid (Mirus Bio LLC, Мэдисон, Висконсин) с применением протокола, предложенного производителем. Для удаления непрореагировавшего красителя применяли осаждение этанолом. Затем ДНК метили NHS-сложным эфиром pHRODO red (Thermo Fischer, **Уолтем, Массачусетс**) и **очищали посредством** осаждения этанолом. Для подтверждения и количественной оценки модификации ДНК с использованием разных флуорофоров применяли спектрофотометрию (примерно 40 красителей на плазмиду). Затем для получения наночастиц применяли MFP-488 и ДНК с двойной меткой pHRODO red, как описано ниже. Для исследования клеток в 96-луночные планшеты высевали клетки H1299 в количестве 10000 клеток на лунку и обеспечивали их закрепление в течение 24 ч в среде Roswell Park Memorial Institute (RPMI), дополненной 10% FBS (фетальная бычья сыворотка) и 1% P/S. Затем клетки дважды промывали с помощью 100 мкл PBS и один раз с помощью 100 мкл OPTI-MEM. Наночастицы, содержащие ДНК, получали с использованием PEI, PEG-PLL, «P: PEG-PLL (M) 35» (полимер 12), «P: PEG-PLL (MN) 39» (полимер 15) и «P: PEG-PLL (TM) 33» (полимер 18)) путем смешивания ДНК (66,6 мкг/мл) и растворов полимера в 20 мМ HEPES при соотношении амина и фосфата, равном 5 (конечная концентрация ДНК составляет

33,3 мкг/мл), как описано выше. Затем к клеткам добавляли NP в количестве 0,1 мкг ДНК на лунку в OPTI-MEM (разбавление 1:10). Через 4 часа клетки обрабатывали красителем Hoechst (исходный раствор 5 мкг/мл в PBS в течение 5 минут) и визуализировали с применением флуоресцентной микроскопии с системой визуализации клеток EVOS (Thermo Fischer, **Уолтем, Массачусетс**). Шкалу делений, аппроксимирующую внутриклеточный pH, получали путем визуализации фиксированных пермеабилizированных клеток после обработки наночастицами в буферах, таких как кислые, нейтральные и основные буферы. В данном анализе сигнал pHRODO red существенно усиливается по мере снижения pH, в то время как MFP488 является нечувствительным к pH, следовательно кислые везикулы выглядят красными или оранжевыми, а нейтральные везикулы выглядят зелеными. Результаты показаны на фигуре 1B.

Эксперимент 2

Стабильность наночастиц

Стабильность наночастиц оценивали на основании анионной диссоциации и в интравитальных фармакокинетических (PK) исследованиях.

а) Анионная диссоциация

Наночастицы получали, как описано выше в примере 5, с PEG-PLL и полимерами 12, 15 и 19 при соотношении N:P, равном 5, и 2 мкг ДНК Gwiz Luciferase (Genlantis, Сан-Диего, Калифорния). К каждому образцу наночастиц добавляли 20 mM буфера HEPES и раствор декстрансульфата (DS) (Sigma-Aldrich, 5 г/мл в 20 mM буфера HEPES), так что конечная концентрация pDNA оставалась постоянной, а концентрация DS варьировала от 0 до 200 мг/мл. После 30-минутного периода обработки при 37°C добавляли 15 мкл каждого состава к 2% гелю для электрофореза (Thermo Fischer Scientific) с бромидом этидия и запускали на 10 минут с применением стандартного протокола E-gel. Результаты показаны на фигуре 2A.

б) Стабильность наночастиц в кровотоке

Стабильность наночастиц в кровотоке определяли с помощью многофотонной конфокальной флуоресцентной микроскопии с визуализацией кровеносных сосудов в мочках ушей мышей. Растворы наночастиц получали, как описано в примере 5, с PEG-PLL и полимерами 12, 15 и 19, применяя pDNA, меченную Cy5 (20 красителей/плазида), при концентрации 100 мкг ДНК/мл в 5% растворе трегалозы (N : P = 5). Затем мышей Balb/c анестезировали изофлураном в индукционной камере, после чего переносили их к носовому конусу, расположенному на предметном столике микроскопа. Затем ухо мыши размещали и уплощали с применением специального держателя предметных стекол и

предметного стекла для обеспечения визуализации с помощью многофотонного микроскопа Leica SP8 DIVE. Для визуализации наночастиц применяли водно-иммерсионный объектив 25 x 1,0 NA с задней апертурой M32. Краситель Cy5 переводили в возбужденное состояние с применением 1220 нМ линии лазера Spectra-Physics X3. Для визуализации применяли два нерассканированных детектора системы DIVE. Один детектор DIVE HyD настраивали на 605-615 нМ для визуализации второй гармоники. Второй детектор настраивали на 635-775 нМ для выявления излучения Cy5. Применяли вторую гармонику, чтобы в поле зрения были расположены вена и артерия, после чего мышам вводили I.V. составы, содержащие наночастицы, путем инъекции в хвостовую вену 200 мкл (20 мкг pDNA). Мышей визуализировали до тех пор, пока сигнал от сосудов не равнялся сигналу в окружающей ткани, или же в течение 2-часового периода. Для создания проекций максимальной интенсивности изображений, собранных за период длительностью 1 с для каждого установленного момента времени, применяли ImageJ. Каждый состав тестировали как минимум на 3 мышах. Результаты показаны на фигуре 2В.

Эксперимент 3

Трансфекции наночастиц

Стабильность наночастиц оценивали на основе анионной диссоциации и в кровотоке.

Клетки H1299 и C2C12 высевали в 96-луночные планшеты по 10000 клеток/лунка в среде RPMI или по 20000 клеток на лунку в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM), дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 1% пенициллина/стрептомицина (P/S). Перед трансфекцией обеспечивали период восстановления клеток H1299 длительностью 24 часа, тогда как миобласты C2C12 дифференцировали в миотрубки путем инкубирования в среде DMEM, дополненной 2% сыворотки крови лошади, в течение минимум 7 дней. Затем клетки дважды промывали с помощью 100 мкл PBS и один раз с помощью культуральной среды или модифицированной минимальной среды Игла (OPTI-MEM). Наночастицы получали, как описано в примере 5, с PEI, PLL, «PLL (M) 37» (полимер 2), «PLL (MN) 33» (полимер 5), «PLL (TM) 39» (полимер 8), PEG-PLL, «PEG-PLL (M) 35» (полимер 12), «PEG-PLL (MN) 39» (полимер 15), «PEG-PLL (TM) 33» (полимер 18). Немодифицированные наночастицы на основе PEI, PLL и PEG-PLL, получали с использованием 1 мкг ДНК при соотношении N:P, равном 3, а модифицированные наночастицы на основе PLL – при соотношении N:P, равном 5. После комплексообразования к клеткам добавляли NP, по 0,1 мкг ДНК на лунку, либо в OPTI-MEM (разбавление 1:10), либо в культуральной среде. После 16-часового периода времени среду с добавленными наночастицами удаляли, и добавляли свежую культуральную среду. Экспрессию зеленого флуоресцентного белка (GFP)

визуализировали с применением системы Incucyte (Essen BioScience, Анн-Арбор, Мичиган), и давали количественную оценку люциферазы/жизнеспособности с применением стандартного протокола для набора ONE-Glo™ + Tox Luciferase Reporter (Promega, Мэдисон, Висконсин) и инструмента PHERAstarFSX (BMG Lab Tech, Кэри, Северная Каролина). Результаты показаны на фигурах 3 и 4.

4) Токсичность

Токсичность материала оценивали с применением анализов «живой/мертвый».

Клетки H1299 высевали в 96-луночные планшеты (10000/лунка). После 24-часового периода восстановления клетки обрабатывали с помощью 0,1-2 мкг PEI (25K, Polyscience, Inc., Филадельфия, Пенсильвания), PLL (Alamanda Polymers, Inc., Хантсвилл, Алабама, 5 кДа) и P: PLL(M) 33, P: PLL(MN) 33, и P: PLL(TM) 33", приготовленных в OPTI-MEM. После подвергания воздействию в течение 16 часов клетки анализировали с применением окрашивания «живой/мертвый» или метаболического анализа. Для анализа «живой/мертвый» исходные растворы, содержащие 10 мкл Кальцеина AM (2 mM в DMSO) и 5 мкл йодида пропидия (2 mM DMSO) растворяли в 5 мл PBS. Затем клетки дважды промывали с помощью PBS и добавляли окрашивающий раствор (100 мкл/лунка). После 30-минутного периода инкубирования при 37°C клетки визуализировали с применением планшет-ридера IncuCyte (Sartorius). Альтернативно метаболические анализы проводили с помощью люминесцентного анализа CellTiter-Glo® с применением стандартного протокола производителя. Собирали данные измерений люминесценции с применением планшет-ридера PHERAStar (BMG LabTech), и получали дозы IC₅₀ путем аппроксимации данных в Microsoft Excel.

| материал | H1299 ^a | C2C12 ^a |
|---------------|--------------------|--------------------|
| P: PEI | 0,43 | 0,82 |
| P: PLL | 0,21 | 0,33 |
| P: PLL(M) 33 | 0,40 | 0,41 |
| P: PLL(MN) 33 | 0,45 | 0,90 |
| P: PLL(TM) 33 | 1,78 | 1,89 |

Таблица 3. Токсичность/IC₅₀ (мкг/лунка) полимерных материалов *in vitro*

в отношении тестируемой клеточной линии

5) Внутримышечная трансфекция

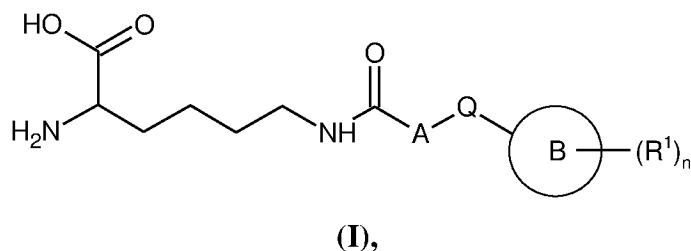
Эффективность трансфекции наночастиц оценивали *in vivo* посредством контроля экспрессии репортерного белка люциферазы после внутримышечной инъекции.

Голым (nu/nu) мышам вводили внутримышечно по 5 мкг ДНК в комплексе с PEI, PEG-PLL или P: PEG-PLL (MN) 39 (полимер (15)) в 50 мкл 5% раствора трегалозы из расчета на каждую заднюю конечность ($n = 2$ на мышь). Экспрессию оценивали ежедневно/еженедельно с применением IVIS (Perkin Elmer), после чего мышам вводили 150 мкл RediJect (30 мг/мл Luciferin-D) путем IP инъекции. Данные люминесценции собирали в четырех повторностях и представляли как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Результаты показаны на фигуре 5.

Формула изобретения

Заявляется:

1. Модифицированный лизин формулы (I),



где

A представляет собой связь, C₁₋₆-алкилен, карбоциклил или гетероциклил, при этом указанный карбоциклил или гетероциклил может быть необязательно замещен при атоме углерода одним или несколькими R², и при этом, если указанный гетероциклил содержит фрагмент -NH-, то атом азота может быть необязательно замещен группой, выбранной из R^A;

Q представляет собой связь, карбоциклил или гетероциклил, при этом указанный карбоциклил или гетероциклил может быть необязательно замещен при атоме углерода одним или несколькими R³, и при этом, если указанный гетероциклил содержит фрагмент -NH-, то атом азота может быть необязательно замещен группой, выбранной из R^B;

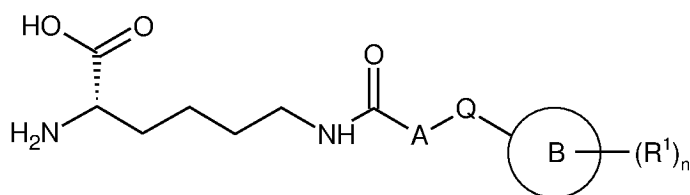
кольцо B представляет собой морфолинил или тиоморфолинил, при этом, если указанный морфолинил или тиоморфолинил содержит фрагмент -NH-, то атом азота может быть необязательно замещен группой, выбранной из R^C;

каждый из R¹, R² и R³ независимо выбран из галогена, нитро, циано, гидроксид, трифторметокси, трифторметила, амино, карбокси, карбамоила, меркапто, сульфамоида, метила, этила, метокси, этокси, ацетила, ацетокси, метиламино, этиламино, диметиламино, диэтиламино, N-метил-N-этиламино, ацетиламино, N-метилкарбамоила, N-этилкарбамоила, N,N-диметилкарбамоила, N,N-диэтилкарбамоила, N-метил-N-этилкарбамоила, метилтио, этилтио, метилсульфинила, этилсульфинила, мезила, этилсульфонил, метоксикарбонил, этоксикарбонил, N-метилсульфамоида, N-этилсульфамоида, N,N-диметилсульфамоида, N,N-диэтилсульфамоида и N-метил-N-этилсульфамоида;

n равняется 0-4;

R^A, R^B и R^C независимо выбраны из метила, этила, пропила, изопропила, ацетила, мезила, этилсульфонил, метоксикарбонил, этоксикарбонил, пропоксикарбонил, бутоксикарбонил, карбамоил, N-метилкарбамоил, N-этилкарбамоил, N,N-диметилкарбамоил, N,N-диэтилкарбамоил и N-метил-N-этилкарбамоил.

2. Модифицированный лизин по п. 1, где **A** представляет собой связь, C₁₋₆алкилен или гетероцикл.
3. Модифицированный лизин по п. 1 или п. 2, где **Q** представляет собой связь.
4. Модифицированный лизин по любому из пп. 1-3, где **n** равняется 0.
5. Модифицированный лизин по любому из пп. 1-4, где **кольцо В** представляет собой морфолин.
6. Модифицированный лизин по любому из пп. 1-4, где **кольцо В** представляет собой тиоморфол.
7. Модифицированный лизин по любому из пп. 1-4, где
A представляет собой связь, метилен или пиридил;
Q представляет собой связь;
кольцо В представляет собой морфолин или тиоморфол; и
n равняется 0.
8. Модифицированный лизин по любому из пп. 1-7, который представляет собой модифицированный лизин формулы **(IV)**,

**(IV).**

9. Модифицированный лизин по любому из пп. 1-4, п. 7 или п. 8, выбранный из 2-амино-6-{[6-(морфолин-4-ил)пиридин-3-карбонил]амино}гексановой кислоты, 2-амино-6-[(тиоморфол-3-карбонил)амино]гексановой кислоты и 2-амино-6-[2-(морфолин-4-ил)ацетида]гексановой кислоты.
10. Полипептид, содержащий один или несколько остатков модифицированного лизина по любому из пп. 1-9.
11. Полипептид по п. 10, содержащий 20-50 аминокислотных остатков.
12. Полипептид по п. 10 или п. 11, где менее чем 50% аминокислотных остатков являются остатками модифицированного лизина.
13. Полипептид по любому из пп. 10-12, где менее чем 50% аминокислотных остатков являются остатками модифицированного лизина, а остальные являются остатками немодифицированного лизина.
14. Полипептид по любому из пп. 10-13, дополнительно содержащий полимер полиэтиленгликоль.

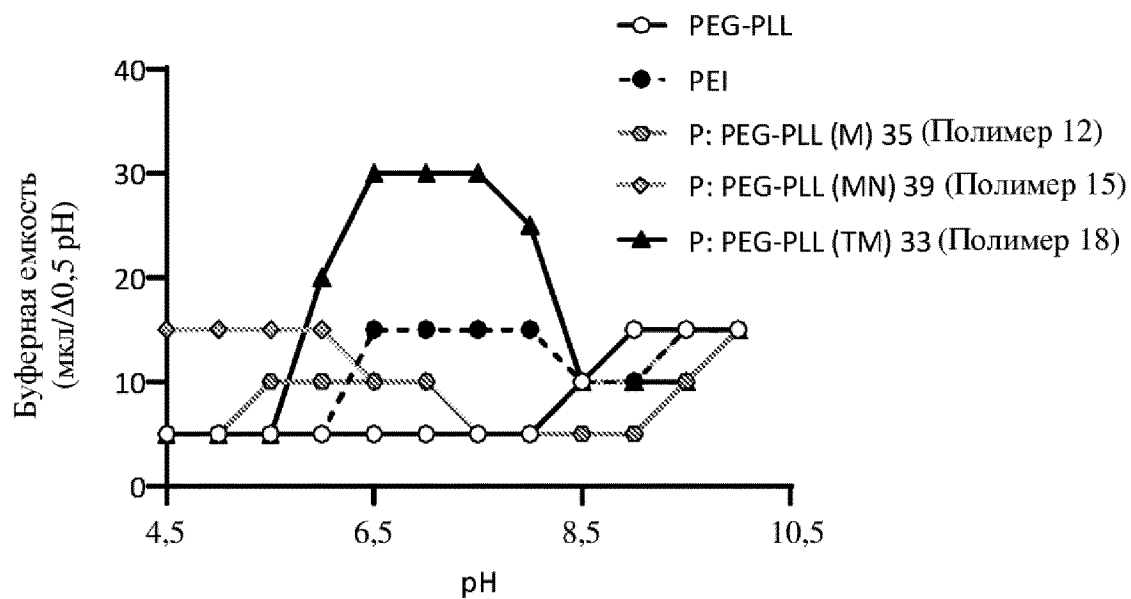
15. Полипептид по любому из пп. 10-14 для применения в качестве фармацевтической системы доставки.

16. Фармацевтическая композиция, которая содержит полипептид по любому из пп. 10-14 и фармацевтически активное средство.

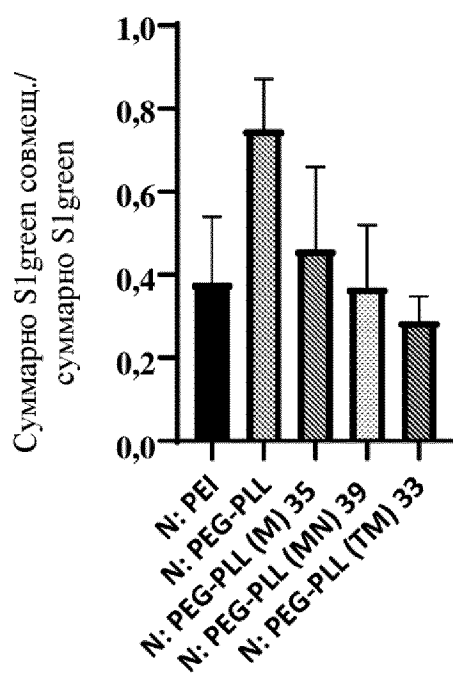
17. Фармацевтическая композиция по п. 16, где фармацевтически активное средство представляет собой генетический материал.

18. Фармацевтическая композиция по п. 17, где генетический материал представляет собой ДНК.

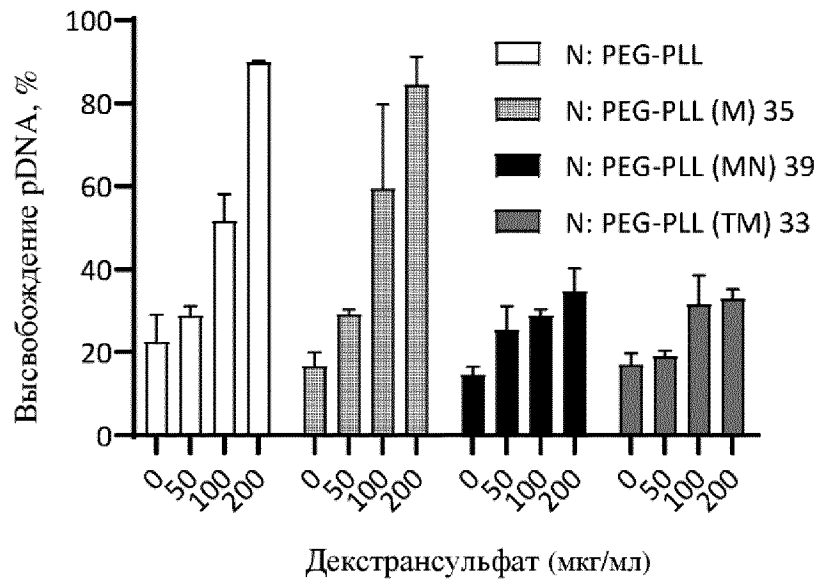
19. Способ генной терапии у теплокровного животного, такого как человек, который включает введение указанному животному эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 16-18.



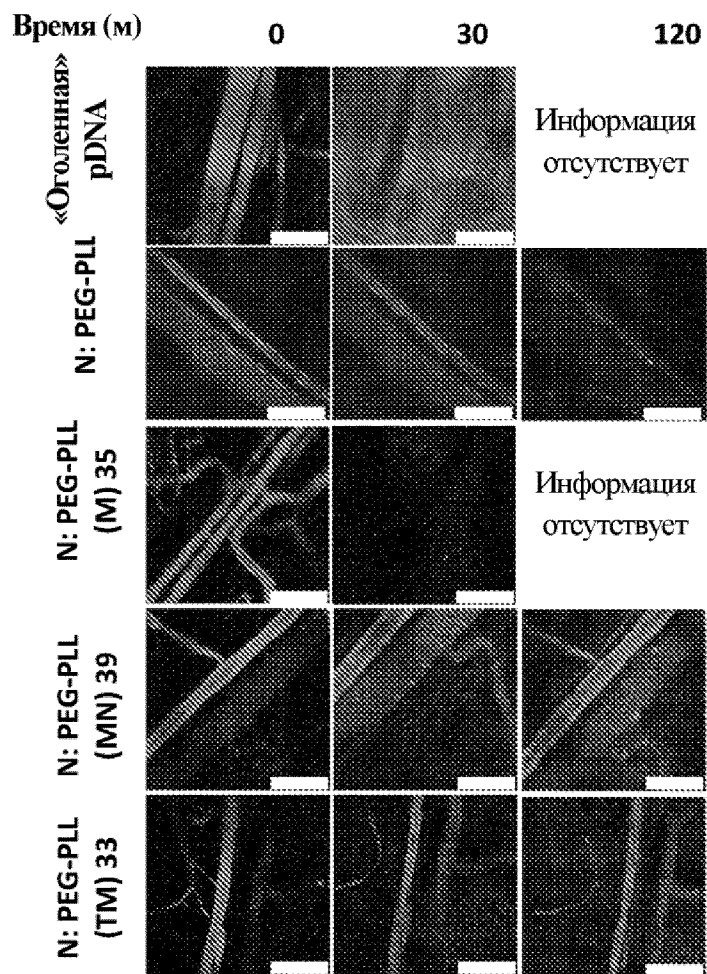
Фигура 1А



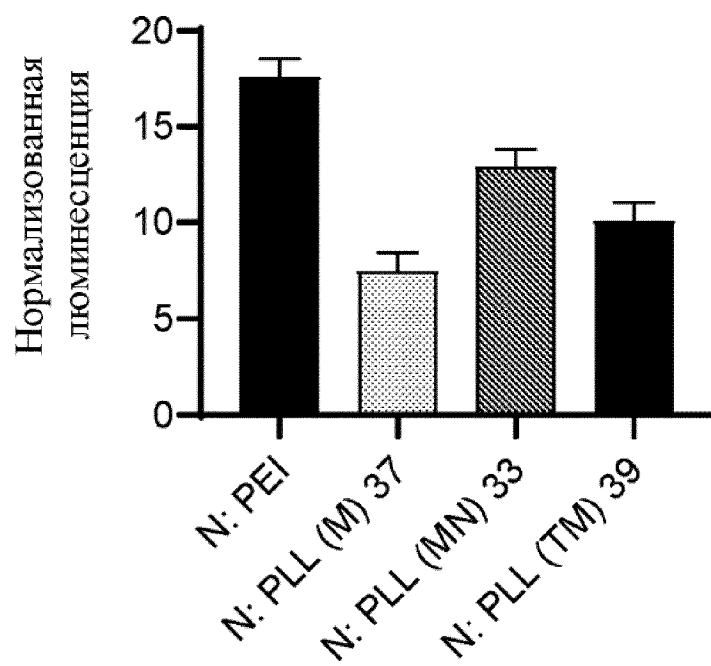
Фигура 1В



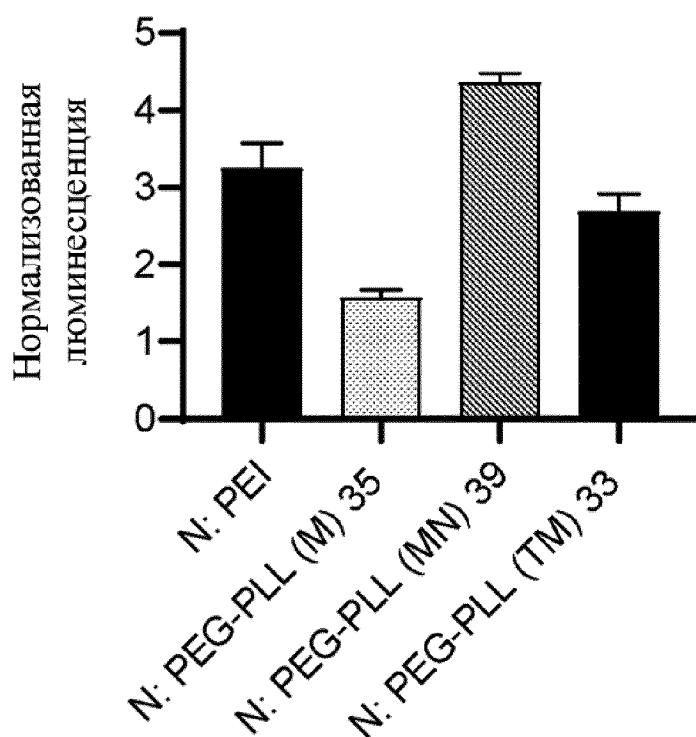
Фигура 2А



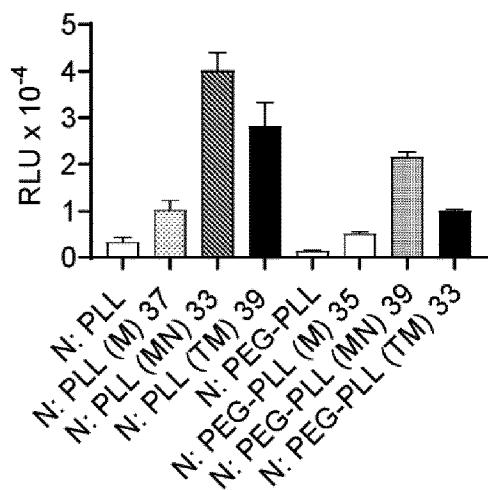
Фигура 2В



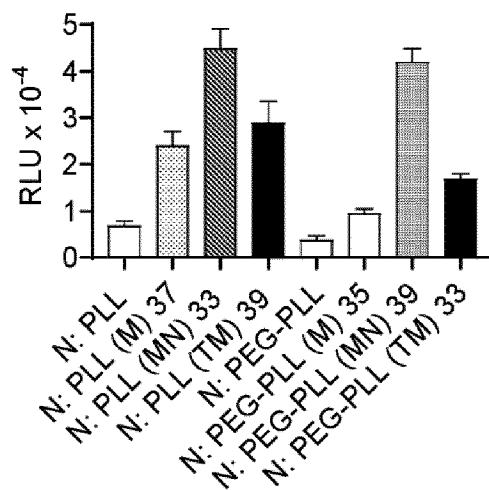
Фигура 3А



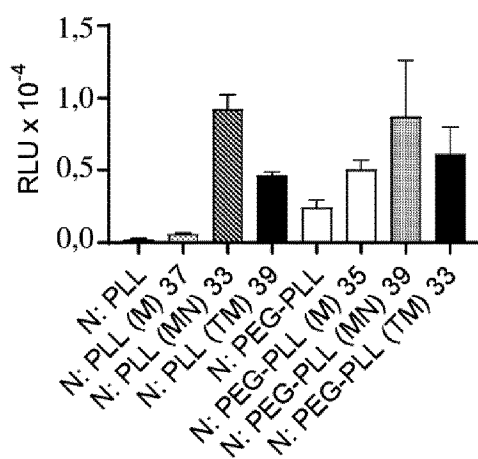
Фигура 3В



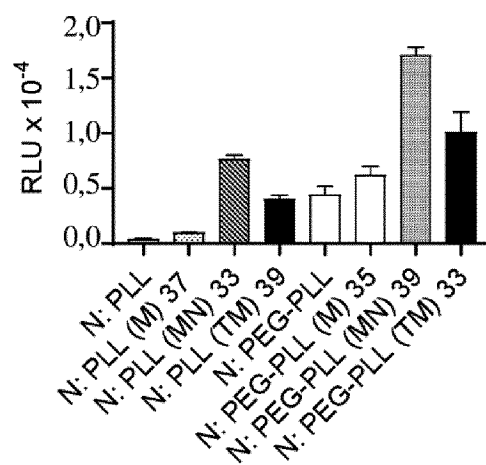
Фигура 4А



Фигура 4В

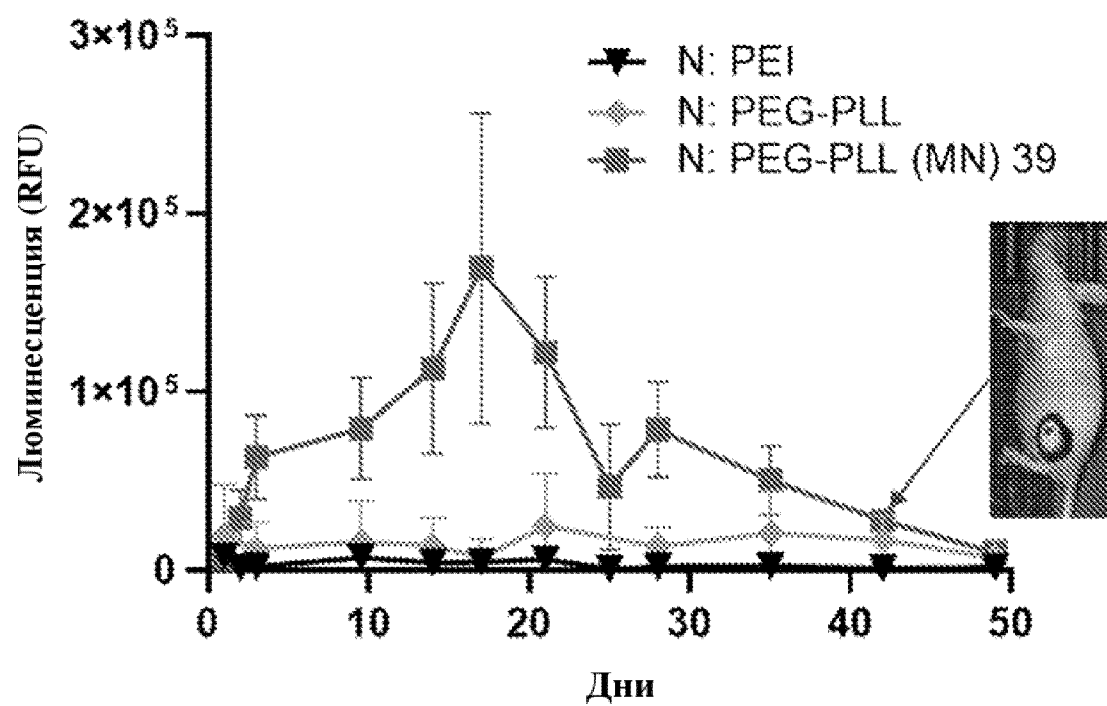


Фигура 4С



Фигура 4Д

Фигура 4



Фигура 5