

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293373 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.24

(22) Дата подачи заявки
2021.05.27

(51) Int. Cl. C08G 69/44 (2006.01)
C08G 63/60 (2006.01)
C08G 63/685 (2006.01)
C08G 63/91 (2006.01)
C08G 69/48 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)

(54) СОПОЛИМЕРЫ ПОЛИАМИНА И СЛОЖНОГО ПОЛИЭФИРА С
МОДИФИЦИРОВАННЫМИ КОНЦЕВЫМИ ГРУППАМИ И УЛУЧШЕННОЙ
ПУЛЬМОНАЛЬНОЙ ДОСТАВКОЙ

(31) 63/041,739

(32) 2020.06.19

(33) US

(86) PCT/US2021/034462

(87) WO 2021/257262 2021.12.23

(71) Заявитель:
ЙЕЙЛ ЮНИВЕРСИТИ (US)

(72) Изобретатель:

Зальцман У. Марк, Цзиан Юйхан,
Грун Молли, Субери Александра (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Были разработаны сополимеры полиамина и сложного полиэфира, способы получения полиплексов с нагрузкой активным агентом и частиц из них, и способы их применения для доставки агентов на основе нуклеиновых кислот с оптимальным поглощением. Примеры демонстрируют критические молекулярные массы в комбинации с экспонированными карбоксильными и/или гидроксильными группами и способы получения. Как правило, композиции являются менее токсичными, более эффективными для доставки лекарственного средства или комбинации этого по сравнению с контрольными другими реагентами для трансфекции. В некоторых вариантах осуществления композиции подходят для доставки *in vivo* и могут вводиться системно субъекту для лечения заболевания или патологического состояния.

A1

202293373

202293373

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576925EA/085

СОПОЛИМЕРЫ ПОЛИАМИНА И СЛОЖНОГО ПОЛИЭФИРА С МОДИФИЦИРОВАННЫМИ КОНЦЕВЫМИ ГРУППАМИ И УЛУЧШЕННОЙ ПУЛЬМОНАЛЬНОЙ ДОСТАВКОЙ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка заявляет преимущество и приоритет заявки на патент США № 63/041739, поданной 19 июня 2020 г., которая в полном объеме включена в настоящий документ посредством ссылки.

Заявление относительно разработок или исследований, которые спонсируются государством

Настоящее изобретение было сделано при поддержке правительства в рамках гранта EB000487, присужденного Национальным институтом здравоохранения. Правительство имеет определенные права на изобретение.

Область изобретения

Область изобретения, в основном, относится к полимерным композициям и способам улучшенной доставки диагностических, профилактических и/или терапевтических средств, в частности средств на основе нуклеиновых кислот, в частности, в легкие.

Уровень техники

Невирусные векторы для доставки генов привлекли большое внимание в последние несколько десятилетий за счет их потенциала ограниченной иммуногенности, способности размещать и доставлять генетические материалы большого размера и возможности модификации их поверхностных структур. Основные группы невирусных векторов включают катионные липиды и катионные полимеры. Векторы на основе катионных липидов, впервые разработанные Felgner и его коллегами, представляют собой одни из наиболее широко исследованных систем для невирусной доставки генов (Felgner et al., Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, PNAS, 84, 7413-7417 (1987); Templeton, et al. Improved DNA: liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. Nat. Biotechnol. 15, 647-652 (1997)); Chen, et al. Targeted nanoparticles deliver siRNA to melanoma. J. Invest. Dermatol. 130, 2790-2798 (2010)).

Катионные полимерные невирусные векторы привлекали все большее внимание за счет гибкости их синтеза и возможности структурных модификаций для конкретных биомедицинских применений. Как катионные липидные, так и катионные полимерные системы доставляют гены, образуя конденсированные комплексы с отрицательно заряженной ДНК посредством электростатических взаимодействий: образование комплексов защищает ДНК от деградации и облегчает ее поглощение клетками и внутриклеточный транспорт в ядро.

Полиплексы, образованные катионными полимерами и ДНК, как правило, более стабильны, чем липоплексы, образованные катионными липидами и ДНК, но оба типа часто

нестабильны в физиологических жидкостях, содержащих компоненты сыворотки и соли, и склонны вызывать разрушение или агрегацию комплексов (Al-Dosari et al., *Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress*, *AAPS J.* 11, 671-681 (2009); Tros de Ilarduya et al., *Gene delivery by lipoplexes and polyplexes*, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 40, 159-170 (2010)). Кроме того, хотя в некоторых работах указывается, что анионные полимеры или даже «голая» ДНК могут обеспечивать некоторый уровень трансфекции при определенных условиях, для трансфекции как липидами, так и полимерами обычно требуются материалы с избыточным зарядом, что приводит к полиплексам или липоплексам с суммарными положительными зарядами на поверхности (Nicol et al. *Gene Ther.*, 9, 1351-1358 (2002); Schlegel et al., *J. Contr. Rel.*, 152, 393-401 (2011); (Liu et al., *AAPS J.*, 9, E92-E104 (2007); Liu et al., *Gene Ther.*, 6, 1258-1266 (1999)). При введении в кровеносную систему *in vivo* положительный поверхностный заряд инициирует быстрое образование сложных агрегатов с отрицательно заряженными молекулами сыворотки или мембранами клеточных компонентов, которые затем подвергаются клиренсу ретикулоэндотелиальной системой (RES).

Еще более важно, что многие катионные векторы, разработанные к настоящему времени, проявляют значительную токсичность, что ограничивает их клиническое применение (Tros de Ilarduya et al., *Eur. J. Pharm. Sci.*, 40, 159-170 (2010); Gao, et al., *Biomaterials*, 32, 8613-8625 (2011); Felgner et al., *J. Biol. Chem.*, 269, 2550-2561 (1994); Kafil, et al. *BioImpacts*, 1, 23-30 (2011); Lv et al., *J. Contr. Rel.*, 114, 100-109 (2006)). По-видимому, это также зависит от заряда: избыточные положительные заряды на поверхности комплексов могут взаимодействовать с клеточными компонентами, такими как клеточные мембраны, и ингибировать нормальные клеточные процессы, такие как клатрин-опосредованный эндоцитоз, активность ионных каналов, мембранные рецепторы и ферменты, или сигналы выживания клеток (Gao et al., *Biomaterials*, 32, 8613-8625 (2011)) (Felgner et al., *J. Biol. Chem.*, 269, 2550-2561 (1994); Kafil et al., *BioImpacts*, 1, 23-30 (2011)).

В результате катионные липиды часто вызывают острые воспалительные реакции у животных и людей, тогда как катионные полимеры, такие как PEI, дестабилизируют плазматическую мембрану эритроцитов и вызывают некроз клеток, апоптоз и аутофагию (Tros de Ilarduya et al., *Eur. J. Pharm. Sci.*, 40, 159-170 (2010); Gao et al., *Biomaterials*, 32, 8613-8625 (2011); Lv et al., *J. Contr. Rel.*, 114, 100-109 (2006)). В результате этих нежелательных эффектов существует потребность в разработке высокоэффективных невирусных векторов с более низкой плотностью заряда.

Синтез семейства биodeградируемых сополимеров полиамина и сложных полиэфигов, полученных ферментативной сополимеризацией сложных диэфиров с аминокзамещенными диолами, обсуждается в публикациях Liu et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, A 96A, 456-465 (2011) и Jiang Z., *Biomacromolecules* 11, 1089-1093 (2010). Сложные диэфиры с различной длиной цепи (например, от сукцината до додекандиоата) сополимеризовали с диэтанолaminaми либо с алкильным (метил, этил, н-бутил, трет-бутил), либо с арильным (фенил) заместителем по атому азота. Высокая устойчивость к липазному катализатору позволила провести реакции сополимеризации в одну стадию без

защиты и снятия защиты функциональных аминогрупп. При протонировании в слегка кислых условиях эти сополимеры полиамина и сложного полиэфира легко конденсируют ДНК и образуют наноразмерные полиплексы. Результаты скрининговых исследований показали, что один из этих материалов, поли(N-метилдиэтиленамин себацинат) (PMSC), трансфектировал различные клетки, включая HEK293, U87-MG и 9L, с эффективностью, сравнимой с эффективностью ведущих коммерческих продуктов, таких как Lipofectamine 2000 и PEI14. PMSC ранее использовался для доставки генов, но эффективность доставки ферментативно синтезированных материалов была примерно на пять порядков выше, чем у любых, о которых сообщалось ранее (Wang et al., *Biomacromolecules*, 8, 1028-1037 (2007); Wang et al., *Biomaterials*, 28, 5358-5368 (2007)). Однако эти сополимеры полиамина и сложного полиэфира были неэффективными для системной доставки нуклеиновых кислот *in vivo*. Это может быть связано с тем, что полиплексы, образованные данными полимерами и генетическими материалами (1), не обладают достаточной эффективностью для применения *in vivo* и/или (2) являются недостаточно стабильными в крови и распадаются или агрегируют в процессе циркуляции.

Следовательно, остается потребность в невирусных векторах, подходящих для эффективной системной доставки нуклеиновых кислот *in vivo* или *in vitro* с высокой эффективностью трансфекции и низкой токсичностью.

Также существует потребность в полимерных наноносителях, молекулярную массу, состав полимера и/или концевые группы которых можно легко контролировать и модифицировать.

Следовательно, целью изобретения является создание улучшенных полимеров, которые могут эффективно доставлять терапевтические, диагностические и/или профилактические средства, в частности, нуклеиновые кислоты, *in vivo* или *in vitro*, и способов их получения и применения.

Целью изобретения является создание улучшенных полимеров, которые могут эффективно доставлять генетические материалы в клетки с высокой эффективностью *in vitro* и пригодных для доставки нуклеиновых кислот *in vivo*, и способов их получения.

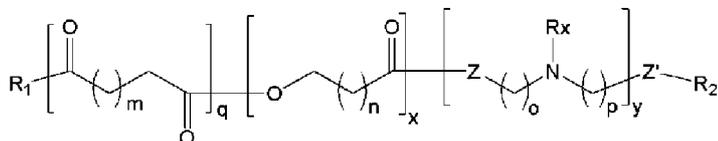
Также целью изобретения является обеспечение способов применения улучшенных полимеров для пульмональной доставки нуклеиновых кислот *in vivo*.

Сущность изобретения

Сополимеры полиамина и сложного полиэфира с модифицированными концевыми группами используются для доставки терапевтических, диагностических и/или профилактических средств, в частности, средств на основе нуклеиновых кислот, сформированных в виде полиплексов и частиц, образованных из них. Они показывают улучшенную загрузку, улучшенную трансфекцию клеток, улучшенное внутриклеточное эндосомальное высвобождение или их комбинацию, груза нуклеиновой кислоты, такой как РНК, более конкретно мРНК. Примеры демонстрируют критические молекулярные массы в комбинации с экспонированными карбоксильными и/или гидроксильными группами и способы получения. Модифицированные полимеры также демонстрируют

предпочтительное поглощение в определенных тканях при введении путем инъекции и высокие уровни поглощения при введении в дыхательную систему. Как правило, композиции менее токсичны, более эффективны для доставки лекарственного средства или комбинации этого по сравнению с контрольными другими реагентами для трансфекции.

Раскрыты полимеры, имеющие структуру формулы I:



формула I

где n представляет собой целое число 1-30,

m, o и p независимо представляют собой целые числа 1-20,

x, y и q независимо представляют собой целые числа 1-1000,

R_x представляет собой атом водорода, замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный алкокси,

Z и Z' независимо представляют собой O или NR', где R' представляет собой атом водорода, замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный арил,

R_1 и R_2 представляют собой химические группы, содержащие гидроксильную группу, первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу, третичную аминогруппу или их комбинации.

В некоторых формах Z имеет такое же значение как Z'.

В некоторых формах Z представляет собой O, и Z' представляет собой O. В некоторых формах Z представляет собой NR', и Z' представляет собой NR'. В некоторых формах Z представляет собой O, и Z' представляет собой NR'. В некоторых формах Z представляет собой NR', и Z' представляет собой O.

В некоторых формах Z' представляет собой O, и n равно целому числу 1-24, например 4, 10, 13 или 14. В некоторых формах Z также представляет собой O.

В некоторых формах Z' представляет собой O, n представляет собой целое число 1-24, например 4, 10, 13 или 14, и m представляет собой целое число 1-10, например 4, 5, 6, 7 или 8. В некоторых формах Z также представляет собой O.

В некоторых формах Z' представляет собой O, n представляет собой целое число 1-24, например 4, 10, 13 или 14, m представляет собой целое число 1-10, например 4, 5, 6, 7 или 8, и o и p представляют собой одно и то же целое число 1-6, например 2, 3 или 4. В некоторых формах Z также представляет собой O.

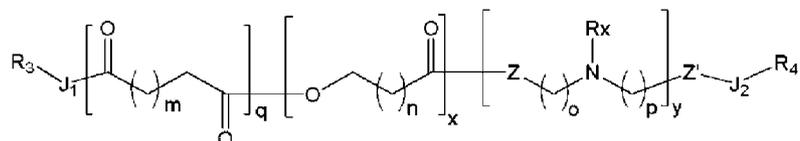
В некоторых вариантах осуществления Z' представляет собой O, n представляет собой целое число 1-24, такое как 4, 10, 13 или 14, m представляет собой целое число 1-10, такое как 4, 5, 6, 7 или 8, и R представляет собой алкил, такой как метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, изобутил, втор-бутил, циклогексил, (циклогексил)метил, циклопропилметил, и гомологи и изомеры, например, н-пентил, н-гексил, н-гептил и н-

октил или арил, такой как фенил, нафталил, антраценил, фенантрил, хризенил, пиренил, толил или ксиллил. В некоторых формах Z также представляет собой O .

В некоторых формах n равно 14 (например, пентадекалактон, PDL), m равно 7 (например, себациновая кислота), o и p равно 2 (например, N -метилдиэтаноламин, MDEA).

В некоторых вариантах осуществления полиплексы или частицы образованы из полимера, где R_1 и/или R_2 не состоят из или не включают

В некоторых формах полимер имеет структуру формулы II:



формула II

где J_1 и J_2 независимо представляют собой связывающие группы или отсутствуют, R_3 и R_4 представляют собой замещенный алкил, содержащий гидроксильную группу, первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу, третичную аминогруппу или их комбинации.

В некоторых формах J_1 представляет собой $-O-$ или $-NH-$.

В некоторых формах J_2 представляет собой $-C(O)NH-$ или $-C(O)O-$.

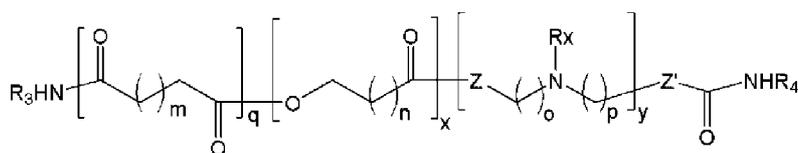
В некоторых формах R_3 идентичен R_4 .

Предпочтительно R_3 и/или R_4 являются линейными.

В некоторых формах R_3 , R_4 или оба содержат гидроксильную группу. В некоторых формах R_3 , R_4 или оба содержат гидроксильную группу и одну или несколько аминогрупп, предпочтительно вторичных или третичных аминогрупп. В некоторых формах R_3 , R_4 или оба содержат гидроксильную группу и не содержат аминогруппы.

В некоторых формах, по меньшей мере, один из R_3 и R_4 не содержит гидроксильной группы.

В некоторых формах полимер имеет структуру формулы III:



формула III

В конкретных вариантах осуществления значения x , y и/или q являются такими, что средневесовая молекулярная масса полимера составляет более 20000 дальтон, более 15000 дальтон, более 10000 дальтон, более 5000 дальтон, более 2000 дальтон. В некоторых формах средневесовая молекулярная масса полимера составляет примерно от 2000 дальтон до примерно 20000 дальтон, более предпочтительно примерно от 5000 до примерно 10000 дальтон.

Полимер может быть получен из одного или более лактонов, одного или более аминдиолов (Z и $Z'=O$) или триаминов (Z и $Z'=NR'$) и одной или более двухосновных

кислот или сложных диэфиров. В тех вариантах осуществления, где используются два или более различных мономера лактона, двухосновной кислоты или сложного диэфира и/или триамина или аминдиола, то значения n , o , p и/или m могут быть одинаковыми или разными.

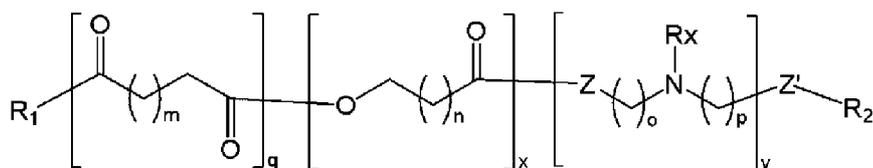
В некоторых вариантах осуществления полимеры имеют массу примерно от 2 кДа до 20 кДа, или примерно от 2 кДа до примерно 10 кДа, или примерно от 2 кДа до примерно 5 кДа.

Полимеры могут быть использованы для образования микро- и/или наночастиц с инкапсулированным в них одним или более терапевтическими, диагностическими и/или профилактическими средствами. Средство, которое необходимо инкапсулировать и доставить, может быть низкомолекулярным агентом (например, неполимерным агентом с молекулярной массой ниже 2000, 1500, 1000, 750 или 500 дальтон) или макромолекулой (например, олигомером или полимером), таким как белки, ферменты, пептиды, нуклеиновые кислоты и т.д. Частицы можно использовать для доставки агента *in vivo* и/или *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления полимеры можно использовать для образования полимерных носителей полинуклеотидов в виде наночастиц, называемых здесь полиплексами, которые эффективны для доставки полинуклеотидов в клетки *in vitro* и *in vivo*.

Были разработаны сополимер полиамина и сложного полиэфира или сополимер полиамина и полиамида с улучшенными свойствами для доставки, включая доставку в легкие.

Сополимер полиамина и сложного полиэфира или сополимер полиамина и полиамида содержат структуру:



формула I

где n представляет собой целое число 1-30,

m , o и p независимо представляют собой целые числа 1-20,

x , y и q независимо представляют собой целые числа 1-1000,

R_x представляет собой атом водорода, замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный алкокси,

Z и Z' независимо представляют собой O или NR' , где R' представляет собой атом водорода, замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный арил,

R_1 и R_2 представляют собой химические группы, содержащие гидроксильную группу, первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу, третичную аминогруппу или их комбинации.

В некоторых формах Z имеет такое же значение как Z' .

В некоторых формах Z представляет собой O , и Z' представляет собой O . В некоторых формах Z представляет собой NR' , и Z' представляет собой NR' . В некоторых формах Z представляет собой O , и Z' представляет собой NR' . В некоторых формах Z представляет собой NR' , и Z' представляет собой O .

В некоторых формах Z' представляет собой O , и n равно целому числу 1-24, например 4, 10, 13 или 14. В некоторых формах Z также представляет собой O .

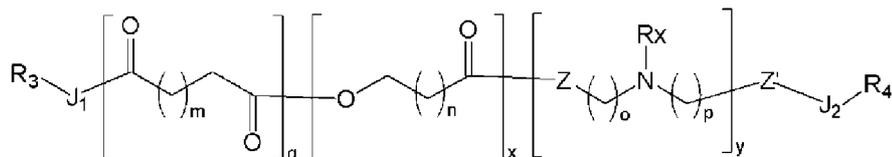
В некоторых формах Z' представляет собой O , n представляет собой целое число 1-24, например 4, 10, 13 или 14, и m представляет собой целое число 1-10, например 4, 5, 6, 7 или 8. В некоторых формах Z также представляет собой O .

В некоторых формах Z' представляет собой O , n представляет собой целое число 1-24, например 4, 10, 13 или 14, m представляет собой целое число 1-10, например 4, 5, 6, 7 или 8, и o и p представляют собой одно и то же целое число 1-6, например 2, 3 или 4. В некоторых формах Z также представляет собой O .

В некоторых вариантах осуществления Z' представляет собой O , n представляет собой целое число 1-24, такое как 4, 10, 13 или 14, m представляет собой целое число 1-10, такое как 4, 5, 6, 7 или 8, и R представляет собой алкил, такой как метил, этил, *n*-пропил, изопропил, *n*-бутил, трет-бутил, изобутил, втор-бутил, циклогексил, (циклогексил)метил, циклопропилметил, и гомологи и изомеры, например, *n*-пентил, *n*-гексил, *n*-гептил и *n*-октил или арил, такой как фенил, нафталил, антраценил, фенантрил, хризенил, пиренил, толил или ксиллил. В некоторых формах Z также является O .

В некоторых формах n равно 14 (например, пентадекалактон, PDL), m равно 7 (например, себациновая кислота), o и p равно 2 (например, *N*-метилдиэтаноламин, MDEA).

В некоторых формах полимер содержит структуру формулы II:



формула II

где R_x , Z , Z' , m , n , o , p , q , x и y имеют значения, определенные выше для формулы I, J_1 и J_2 независимо отсутствуют или представляют собой связывающие группы, такие как $-C(O)-$, $-C(O)NH-$, $-C(O)O-$, $-O-$ и $-NH-$,

R_3 и R_4 в формуле II независимо представляют собой замещенный алкил, содержащий гидроксильную группу, первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу, третичную аминогруппу или их комбинации.

В некоторых формах J_1 представляет собой $-O-$ или $-NH-$.

В некоторых формах J_2 представляет собой $-C(O)-$, $-C(O)NH-$ или $-C(O)O-$.

В некоторых формах R_3 идентичен R_4 .

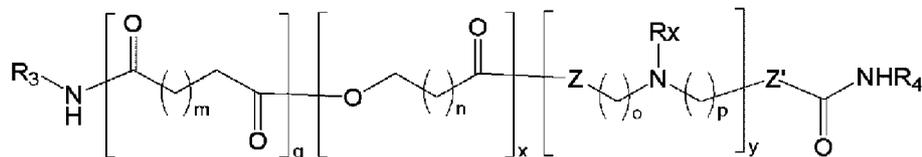
Предпочтительно R_3 и/или R_4 являются линейными.

В некоторых формах R_3 , R_4 или оба содержат гидроксильную группу. В некоторых

формах R_3 , R_4 или оба содержат гидроксильную группу и одну или более аминогрупп, предпочтительно вторичных или третичных аминогрупп. В некоторых формах R_3 , R_4 или оба содержат гидроксильную группу и не содержат аминогруппы.

В некоторых формах, по меньшей мере, один из R_3 и R_4 не содержит гидроксильной группы.

В некоторых формах полимер содержит структуру формулы III:



формула III

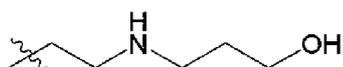
где R_3 , R_4 , R_x , Z , Z' , m , n , o , p , q , x и y имеют значения, определенные выше для формулы II.

В конкретных вариантах осуществления значения x , y и/или q являются такими, что средневесовая молекулярная масса полимера составляет более 20000 дальтон, более 15000 дальтон, более 10000 дальтон, более 5000 дальтон, более 2000 дальтон. В некоторых формах средневесовая молекулярная масса полимера составляет примерно от 2000 дальтон до примерно 20000 дальтон, более предпочтительно примерно от 5000 до примерно 10000 дальтон.

Полимер может быть получен из одного или более лактонов, одного или более аминдиолов (Z и $Z'=O$) или триаминов (Z и $Z'=NR'$) и одной или более двухосновных кислот или сложных диэфиров. В тех вариантах осуществления, где используются два или более различных мономера лактона, двухосновной кислоты или сложного диэфира и/или триамина или аминдиола, то значения n , o , p и/или m могут быть одинаковыми или разными.

В некоторых вариантах осуществления полимеры имеют массу примерно от 2 кДа до 20 кДа, или примерно от 2 кДа до примерно 10 кДа, или примерно от 2 кДа до примерно 5 кДа.

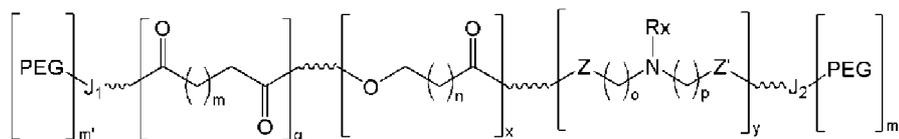
Сополимер полиамина и сложного полиэфира или сополимер полиамина и полиамида могут быть использованы для образования полиплексов, микрочастиц и/или наночастиц, имеющих инкапсулированную в них одну или более матричных рибонуклеиновых кислот. В некоторых формах полиплексы или частицы образованы из полимера, где R_1 и/или R_2 не состоят из или не включают:



В некоторых формах сополимеры полиамина и сложного полиэфира или сополимеры полиамина и полиамида находятся в смеси, содержащей сополимеры полиамина и сложного полиэфира или сополимеры полиамина и полиамида, конъюгированные с полиэтиленгликолем (PEG), т.е. ПЭГ-конъюгированные сополимеры

полиамин и сложного полиэфира или сополимеры полиамин и полиамида.

В некоторых формах ПЭГ-конъюгированные сополимеры полиамин и сложного полиэфира или сополимеры полиамин и полиамида содержат структуру:



формула XI

где m' и m'' независимо равны 0 или 1, при условии, что $m' + m''$ равно 1 или 2,

J_1 и J_2 в формулах XI независимо отсутствуют или представляют собой связывающие группы, такие как $-C(O)-$, $-C(O)NH-$, $-C(O)O-$, $-O-$ и $-NH-$.

В некоторых формах формулы XI, J_1 представляет собой $-O-$ или $-NH-$. В некоторых формах формулы XI, J_2 представляет собой $-C(O)-$, $-C(O)NH-$ или $-C(O)O-$.

Доставка может быть оптимизирована за счет выбора полимера, смешивания или конъюгирования полимера с гидрофильным полимером, таким как полиалкиленгликоль, контролирования концевых групп и их смесей, а также молекулярной массы.

Примеры демонстрируют усиление доставки, а также высокие уровни трансфекции после введения непосредственно в клетки, после системного введения, такого как инъекция, или в легкие (пульмональная доставка). PACE, смешанный или конъюгированный с ПЭГ, с определенной молекулярной массой, обеспечивал полиплексы, содержащие мРНК, с высоким уровнем трансфекции в клетках легких и небольшим в других тканях после пульмонального введения.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показаны группы R_3 и R_4 , которые могут быть включены в формулу I.

На фиг. 2 представлена столбчатая диаграмма, показывающая эффективность трансфекции PACE-COOH и PACE-MAE с молекулярной массой 5 кДа или 10 кДа, синтезированных способами, описанными в примере 2. Статистическую значимость определяли с использованием t-критерия Стьюдента (обозначается следующим образом: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

На фиг. 3А представлена столбчатая диаграмма, показывающая влияние (среднее значение LUC/мг белка) молекулярной массы при использовании классического PACE с 10% содержанием PDL, с молекулярной массой 2 кДа, 5 кДа, 10 кДа и 20 кДа. На фиг. 3В представлена столбчатая диаграмма, показывающая влияние (среднее значение LUC/мг белка) содержания PDL при использовании классического полимера PACE 10 кДа. На фиг. 3С представлена столбчатая диаграмма, показывающая эффективность трансфекции (среднее значение LUC/мг белка) кислого PACE и классического PACE с молекулярной массой 5 кДа при 10% содержании PDL. Результаты представлены как среднее \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов, проведенных в двух повторностях.

На фиг. 4 представлен линейный график, показывающий изменение средневесовой

молекулярной массы (кДа) полимеров аРАСЕ (5 кДа - нижняя линия; 10 кДа - средняя линия; 20 кДа - верхняя линия) в процессе актуации (время актуации в сутках).

На фиг. 5А представлен линейный график, показывающий эффективность трансфекции мРНК люциферазы (среднее значение LUC/мг белка) в зависимости от времени актуации (сутки), демонстрирующий предпочтительное время актуации для каждой молекулярной массы (линии, обозначенные как 20 кДа - нижняя точка данных на сутки 0; 10 кДа - средняя точка данных на сутки 0; 5 кДа - верхняя точка данных на сутки 0). На фиг. 5В представлена столбчатая диаграмма, показывающая эффективность трансфекции (среднее значение LUC/мг белка) с использованием РАСЕ без актуации и РАСЕ с актуацией с различной начальной молекулярной массой при их предпочтительном времени актуации (5 суток для полимера 5 кДа, 10 суток для полимера 10 кДа, и 30 суток для полимера 20 кДа, $**p < 0,005$). На фиг. 5С представлен линейный график, показывающий профили цитотоксичности (жизнеспособности клеток (%)) полиплексов мРНК:аРАСЕ (5 кДа 5 суток, 10 кДа 10 суток, 20 кДа 30 суток (кластер верхних линий)) по сравнению с комплексами мРНК:TransIT (нижняя линия). На фиг. 5D представлена столбчатая диаграмма, показывающая эффективность трансфекции (среднее значение LUC/мг белка) аРАСЕ с использованием различной температуры актуации ($**p < 0,005$). Все результаты представлены как среднее \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов, проведенных в двух повторностях.

На фиг. 6А представлена столбчатая диаграмма, показывающая концентрацию ЕРО в крови через 6 ч после внутривенного введения мРНК (всего 20 мг) с использованием TransIT, РАСЕ 5 кДа без актуации, аРАСЕ 5 кДа с актуацией в течение 5 суток, РАСЕ 10 кДа без актуации или аРАСЕ 10 кДа с актуацией в течение 10 суток. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение для N=3 животных ($****p < 0,0001$). На фиг. 6В представлен линейный график, показывающий временную динамику продукции ЕРО после внутривенного введения мРНК (всего 20 мг) с использованием растворителя (нижняя линия), TransIT (средняя линия), аРАСЕ 10 кДа с актуацией в течение 10 суток (верхняя линия). Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение для N=3 животных ($***p < 0,001$ и $*p < 0,05$). На фиг. 6С-6F представлены столбчатые диаграммы, показывающие биохимический анализ крови (АСТ (фиг. 6С), АЛТ (фиг. 6D), мочевины (фиг. 6E), креатинина (фиг. 6F)) через 24 ч и 7 суток после внутривенного введения ацетатного буфера, свободной мРНК или полиплексов мРНК:аРАСЕ. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для N=3 животных.

На фиг. 7 представлена столбчатая диаграмма, показывающая влияние концевой группы РАСЕ (# соответствует концевым группам, идентифицированным в примере 5), на загрузку мРНК в полиплексы.

На фиг. 8А представлена схема механизмов, обеспечивающих результаты, показанные на фигурах 8В-8D. На фиг. 8В представлена столбчатая диаграмма, показывающая влияние концевой группы РАСЕ (# соответствует концевым группам,

указанным в таблице 1) на поглощение полиплексов клетками. На фиг. 8С представлена столбчатая диаграмма, показывающая влияние концевой группы РАСЕ (# соответствует концевым группам, указанным в таблице 1) на эндосомальное высвобождение. На фиг. 8D представлена столбчатая диаграмма, показывающая влияние концевой группы РАСЕ (# соответствует концевым группам, указанным в таблице 1) на эффективность трансфекции.

На фиг. 9А-9С представлены графики, демонстрирующие линейную корреляцию эффективности трансфекции (представленной как активность *fluc*) и различных стадий трансфекции, включая загрузку мРНК (фиг. 9А), поглощение (фиг. 9В) и высвобождение из эндосом (фиг. 9С).

На фиг. 10А-10В представлены графики, демонстрирующие, что уровень трансляции мРНК в полиплексах *in vitro* не коррелирует с эффективностью трансфекции. Полиплекс, содержащий мРНК, ddRLuc-Fc и РАСЕ, эндоцитируется клеткой, затем мРНК, кодирующая ген люциферазы, высвобождается и транслируется. На фиг. 10А представлен график генерации сигнала люциферазы (в логарифмической форме) в зависимости от уровня трансляции (AU). На фиг. 10В представлен график зависимости уровня трансляции (AU) от эффективности инкапсуляции.

На фиг. 11 представлен график эффективности трансфекции (в процентах) при рН 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8 и 6,0 для полимеров 2, 4, 14, 15, 16, 17, 20, 25, 27 и 31 из таблицы 1. Результаты демонстрируют оптимальный рН натрий-ацетатного буфера для РАСЕ полиплексов с различными концевыми группами.

На фиг. 12А представлен график влияния ПЭГ на размер полиплекса в сравнении с отсутствием ПЭГ (показывающий агрегацию во времени (мин) по сравнению с отсутствием изменения размера во времени при использовании либо 0,25% РАСЕ-ПЭГ, либо 1% РАСЕ-ПЭГ. На фиг. 12В представлен график эффективности трансфекции (%) для полимеров 14, 15, 16, 17, 25, 27 и 31 из таблицы 1 в зависимости от содержания РАСЕ-ПЭГ (%), 0, 0,05, 0,1, 0,25, 0,50 и 1. На фиг. 12С представлен график экспрессии EGFP в тех же смесях РАСЕ-ПЭГ, показывающий увеличение экспрессии EGFP при использовании ПЭГ.

На фиг. 13А представлен график зависимости эффективности 0%, 0,01%, 0,1%, 1% или 10% DSPE-ПЭГ от размера (нм) и полидисперсности. На фиг. 13В представлен график влияния содержания DSPE-ПЭГ на эффективность трансфекции (%) для полимеров 14, 15, 16, 17, 25, 27 и 31 в таблице 1. На фиг. 13С представлен график влияния концентрации DSPE-ПЭГ (0, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,5 и 5%) на экспрессию EGFP.

На фиг. 14А и 14В представлены графики данных изображений IVIS, показывающие биораспределение полиплексов, определенное по распределению биоллюминесценции через 6 ч после внутрибрюшинной инъекции (фиг. 14А) и после внутривенной инъекции (фиг. 14В) в сердце, легком, печени, почке, селезенке, кишечнике.

На фиг. 15 представлен график биораспределения полиплексов, определенное по распределению биоллюминесценции после пульмонального введения.

Подробное описание изобретения

I. Определения

В рамках настоящего изобретения, термин «полиплекс» относится к полимерным микро- и/или наночастицам или мицеллам, обычно имеющим инкапсулированный в них, диспергированный внутри и/или связанный с поверхностью один или более полинуклеотидов.

Термин частицы включает микросферы, микрокапсулы, микрочастицы, наносферы, нанокапсулы и наночастицы. Термин «микрочастицы» включает микросферы и микрокапсулы, все с размерами в среднем примерно менее 1000 микрон. Микрочастица может быть сферической или несферической и может иметь любую правильную или неправильную форму. Если структуры имеют диаметр менее одного микрона (1000 нм), то можно использовать соответствующие общепризнанные термины «наносфера», «нанокапсула» и «наночастица». В некоторых вариантах осуществления популяции наносфер, нанокапсул и наночастиц имеют средний диаметр примерно 500 нм, 200 нм, 100 нм, 50 нм, 10 нм или 1 нм. В некоторых вариантах осуществления средний диаметр частиц составляет примерно от 200 нм до примерно 600 нм, предпочтительно примерно от 200 до примерно 500 нм. Термин «диаметр» используется здесь для обозначения либо физического диаметра, либо гидродинамического диаметра. Диаметр по существу сферической частицы может относиться к физическому или гидродинамическому диаметру. Диаметр несферической частицы предпочтительно может относиться к гидродинамическому диаметру. В рамках настоящего изобретения, диаметр несферической частицы может относиться к наибольшему линейному расстоянию между двумя точками на поверхности частицы. Когда речь идет о множестве частиц, то диаметр частиц обычно относится к среднему диаметру частиц. Диаметр частиц можно измерить с использованием различных методов, известных в данной области техники, включая, не ограничиваясь этим, динамическое светорассеяние.

В рамках настоящего изобретения, термин «фармацевтически приемлемый» относится к таким соединениям, веществам, композициям и/или лекарственным формам, которые, по результатам тщательной медицинской оценки, подходят для использования в контакте с тканями, органами и/или биологическими жидкостями людей и животных без проявления чрезмерной токсичности, раздражающего действия, аллергических реакций или других проблем или осложнений, соответствуя разумному соотношению польза/риск.

В рамках настоящего изобретения, термин «биосовместимый» относится к одному или более веществам, которые сами по себе не являются токсичными для хозяина (например, животного или человека) и не деградируют (если вещество подвергается деградации) со скоростью, при которой образуются мономерные или олигомерные субъединицы или другие побочные продукты в токсических концентрациях для хозяина.

Термин «биодegradуемый», используемый в данном документе, означает, что вещества деградируют или распадаются на составляющие его субъединицы или расщепляются, например, посредством биохимического процесса, материала на более мелкие (например, неполимерные) субъединицы.

«Пролонгированное высвобождение», как это выражение используется в данном

документе, относится к высвобождению вещества в течение длительного периода времени, в отличие от болюсного введения, при котором все количество вещества становится биологически доступным за один раз.

Выражения «парентеральное введение» и «введенный парентерально» являются терминами, признанными в данной области, и включают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, такие как инъекции, и включают, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутривенную, внутрисосудистую, интраперикардальную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, интракардиальную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, подкапсульную, субарахноидальную, интраспинальную и интрастромальную инъекцию и инфузию.

В рамках настоящего изобретения, термин «сурфактант» относится к агенту, который снижает поверхностное натяжение жидкости.

В рамках настоящего изобретения, термин «транзиентная» относится к экспрессии неинтегрированного трансгена в течение нескольких часов, суток или недель, где период времени экспрессии меньше, чем период времени экспрессии гена, если он интегрирован в геном или находится в стабильном плазмидном репликоне в клетке-хозяине.

В рамках настоящего изобретения, термин «промоторный сайт» представляет собой последовательность нуклеотидов, к которой присоединяется РНК-полимераза, такая как ДНК-зависимая РНК-полимераза, первоначально выделенная из бактериофага, описанная Davanloo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:2035-39 (1984), или из другого источника, связывается с высокой специфичностью, как описано в публикации Chamberlin, et al., Nature, 228:227-231 (1970).

В рамках настоящего изобретения, термин «поли(А)» представляет собой ряд аденозинов, присоединенных посредством полиаденилирования к мРНК. В предпочтительном варианте конструкции для транзиентной экспрессии полиА составляет от 50 до 5000, предпочтительно больше 64, более предпочтительно больше 100, наиболее предпочтительно больше 300 или 400 последовательностей поли(А) можно модифицировать химически или ферментативно для модуляции функции мРНК, такой как локализация, стабильность или эффективность трансляции.

В рамках настоящего изобретения, термин «открытая рамка считывания» или «ORF» представляет собой ряд нуклеотидов, содержащих последовательность оснований, которая потенциально может кодировать полипептид или белок. Открытая рамка считывания расположена между последовательностью старт-кодона (инициаторный кодон или стартовый кодон) и последовательностью стоп-кодона (терминирующий кодон).

Термин «конструкция» относится к рекомбинантной генетической молекуле, имеющей одну или более выделенных полинуклеотидных последовательностей.

Термин «последовательность контроля экспрессии» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая контролирует и регулирует транскрипцию и/или трансляцию другой последовательности нуклеиновой кислоты.

Контрольные последовательности, подходящие для прокариот, включают, например, промотор, необязательно последовательность оператора, сайт связывания рибосомы и т.п. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

Термин «ген» относится к последовательности ДНК, которая кодирует через свою матрицу или матричную РНК последовательность аминокислот, характерную для конкретного пептида, полипептида или белка. Термин «ген» также относится к последовательности ДНК, которая кодирует продукт РНК. Термин «ген», используемый в данном документе в отношении геномной ДНК, включает промежуточные некодирующие области, а также регуляторные области и может включать 5' - и 3' -концы.

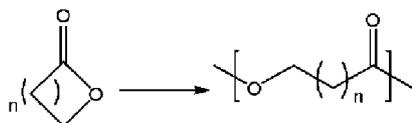
Термин полипептид включает белки и их фрагменты. Полипептиды могут быть «экзогенными», что означает, что они являются «гетерологичными», т.е. чужеродными для используемой клетки-хозяина, например полипептид человека, продуцированный бактериальной клеткой. Полипептиды содержат аминокислоты. Аминокислотные последовательности пишутся слева направо в направлении от аминоконца к карбоксиконцу и обозначаются либо трехбуквенным, либо однобуквенным кодом, как указано ниже: аланин (Ala, A), аргинин (Arg, R), Аспарагин (Asn, N), аспарагиновая кислота (Asp, D), цистеин (Cys, C), глутамин (Gln, Q), глутаминовая кислота (Glu, E), глицин (Gly, G), гистидин (His, H), изолейцин (Ile, I), лейцин (Leu, L), лизин (Lys, K), метионин (Met, M), фенилаланин (Phe, F), пролин (Pro, P), серин (Ser, S), Треонин (Thr, T), триптофан (Trp, W), тирозин (Tyr, Y) и валин (Val, V).

«Вариант» относится к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от референтного полипептида или полинуклеотида, но сохраняет основные свойства. Типичный вариант полипептида отличается по аминокислотной последовательности от другого референтного полипептида. Как правило, различия ограничиваются таким образом, что последовательности референтного полипептида и варианта в целом являются очень сходными и во многих областях идентичными. Вариантный и референтный полипептид могут отличаться по аминокислотной последовательности одной или несколькими модификациями (например, заменами, добавлениями и/или делециями). Замещенный или вставленный аминокислотный остаток может кодироваться или не кодироваться генетическим кодом. Вариант полипептида может встречаться в природе, например, аллельный вариант, или это может быть вариант, который, как известно, не встречается в природе.

В структуру полипептидов могут быть внесены модификации и изменения, которые существенно не изменяют характеристики полипептида (например, консервативная аминокислотная замена). Например, некоторые аминокислоты могут быть заменены другими аминокислотами в последовательности без заметной потери активности. Поскольку способность к взаимодействию и природа полипептида определяют биологическую функциональную активность этого полипептида, то в последовательности полипептида могут быть сделаны определенные замены аминокислотной

последовательности и, тем не менее, получен полипептид с аналогичными свойствами. При внесении таких изменений можно учитывать гидропатический индекс аминокислот. Важность гидропатического индекса аминокислоты для придания интерактивной биологической функции полипептиду, как правило, понимается в данной области. Известно, что некоторые аминокислоты могут быть заменены другими аминокислотами, имеющими аналогичный гидропатический индекс или показатель, и все же давать полипептид с аналогичной биологической активностью. Замена подобных аминокислот также может быть произведена на основе гидрофильности, в частности, когда биологически функциональный эквивалентный полипептид или пептид, созданный таким образом, предназначен для использования в иммунологических вариантах осуществления. Аминокислотные замены обычно основаны на относительном сходстве заместителей боковой цепи аминокислоты, например, на их гидрофобности, гидрофильности, заряде и размере.

Термины «лактон» и «лактоновая единица» используются для описания химического соединения, которое включает циклический сложный эфир, или химической структуры с открытой цепью, которая появляется в результате расщепления сложноэфирной связи в циклическом сложном эфире. Например, термин «лактон» используется для описания циклического сложного эфира, показанного ниже, и соответствующей структуры открытой цепи, полученной из лактона:



n представляет собой целое число. Структуру с открытой цепью получают способами, известными в данной области, включая, не ограничиваясь этим, сольволиз, такой как гидролиз, и ферментативное расщепление.

Термин «алкил» относится к радикалу из насыщенных алифатических групп, включая алкильные группы с прямой цепью, алкильные группы с разветвленной цепью, циклоалкильные (алициклические) группы, алкилзамещенные циклоалкильные группы и циклоалкилзамещенные алкильные группы.

В предпочтительных вариантах осуществления алкил с прямой или разветвленной цепью содержит 30 или меньше атомов углерода в своем остове (например, C_1 - C_{30} для прямых цепей, C_3 - C_{30} для разветвленных цепей), предпочтительно 20 или меньше, более предпочтительно 15 или меньше, наиболее предпочтительно 10 или меньше. Все целые значения числа атомов углеродного остова от одного до 30 рассматриваются и раскрываются для алкилов с прямой или разветвленной цепью. Аналогично, предпочтительные циклоалкилы имеют от 3 до 10 атомов углерода в своей кольцевой структуре и более предпочтительно имеют 5, 6 или 7 атомов углерода в кольцевой структуре. Все целые значения количества атомов углерода в кольце от трех до 10 рассматриваются и раскрываются для циклоалкилов.

Термин «алкил» (или «низший алкил»), используемый в настоящем описании, примерах

и формуле изобретения, включает как «незамещенные алкилы», так и «замещенные алкилы», последние из которых относятся к алкильным группам, имеющим один или более заместителей, замещающих атом водорода на один или более атомов углерода углеводородного остова. Такие заместители включают, не ограничиваясь этим, атом галогена, гидроксил, карбонил (такой как карбоксил, алкоксикарбонил, формил или ацил), тиокарбонил (такой как тиоэфир, тиоацетат или тиоформиат), алкоксил, фосфорил, фосфат, фосфонат, фосфинат, amino, амидо, амидин, имин, циано, нитро, азидо, сульфгидрил, алкилтио, сульфат, сульфонат, сульфоамид, сульфоамидо, сульфонил, гетероциклический, аралкил или ароматическую или гетероароматическую группу.

Если число атомов углерода не указано иным образом, то термин «низший алкил», используемый здесь, означает алкильную группу, имеющей значения, определенные выше, но содержащую от одного до десяти атомов углерода, более предпочтительно, от одного до шести атомов углерода в структуре основной цепи. Аналогично «низший алкенил» и «низший алкинил» имеют одинаковую длину цепи. В настоящей заявке предпочтительными алкильными группами являются низшие алкилы. В предпочтительных вариантах осуществления заместитель, обозначенный здесь как алкил, представляет собой низший алкил.

Специалистам в данной области будет понятно, что группы, замещенные в углеводородной цепи, сами могут быть замещены, если это является подходящим. Например, заместители замещенного алкила могут включать атом галогена, гидроксил, нитро, тиолы, amino, азидо, имино, амидо, фосфорил (включая фосфонат и фосфинат), сульфонил (включая сульфат, сульфоамидо, сульфоамид и сульфонат) и силильные группы, а также простые эфиры, алкилтиогруппы, карбонилы (включая кетоны, альдегиды, карбоксилаты и сложные эфиры), $-CF_3$, $-CN$ и т.п. Циклоалкилы могут быть замещены аналогичным образом.

Термин «арил», используемый здесь, относится к C_5 - C_{10} -членным ароматическим, гетероциклическим, конденсированным ароматическим, конденсированным гетероциклическим, биароматическим или бигетероциклическим кольцевым системам. В некоторых формах кольцевые системы содержат от 3 до 50 атомов углерода. В широком смысле термин «арил», используемый в данном документе, включает 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10- и 24-членные ароматические группы с одним кольцом, которые могут включать от нуля до четырех гетероатомов, например, бензол, нафталин, антрацен, фенантрен, хризен, пирен, кораннулен, коронен, пиррол, фуран, тиофен, имидазол, оксазол, тиазол, триазол, пиразол, пиридин, пиразин, пиридазин и пиримидин и т.п. Эти арильные группы, имеющие гетероатомы в кольцевой структуре, также могут называться «арильными гетероциклами» или «гетероароматическими соединениями». Ароматическое кольцо может быть замещено в одном или нескольких положениях кольца одним или несколькими заместителями, включая, не ограничиваясь этим, атом галогена, азид, алкил, аралкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, гидроксил, алкоксил, amino (или кватернизованный amino), нитро, сульфгидрильная, имино, амидо, фосфонатная, фосфинатная, карбонильная,

карбоксовая, силильная, эфирная, алкилтио, сульфонильная, сульфонида, кетонная, альдегидная, сложноэфирная, гетероциклическая, ароматическая или гетероароматическая группы, $-CF_3$, $-CN$; и их комбинации.

Термин «арил» также включает полициклические кольцевые системы, имеющие два или более циклических кольца, в которых два или более атомов углерода являются общими для двух соседних колец (т. е. «конденсированные кольца»), где, по меньшей мере, одно из колец является ароматическим, например, другое циклическое кольцо или кольца могут представлять собой циклоалкилы, циклоалкенилы, циклоалкинилы, арилы и/или гетероциклы. Примеры гетероциклических колец включают, не ограничиваясь этим, бензимидазолил, бензофуранил, бензотиофуранил, бензотиофенил, бензоксазолил, бензоксазолинил, бензтиазолил, бензтриазолил, бензтетразолил, бензизоксазолил, бензизотиазолил, бензимидазолил, карбазолил, 4aH карбазолил, карболинил, хроманил, хроменил, циннолинил, декагидрохинолинил, 2H,6H-1,5,2-дитиазинил, дигидрофуоро[2,3-b]тетрагидрофуран, фуранил, фуразанил, имидазолидинил, имидазолинил, имидазолил, 1H-индазолил, индоленил, индолинил, индолизинил, индолил, 3H-индолил, изатиноил, изобензофуранил, изохроманил, изоиндазолил, изоиндолинил, изоиндолил, изохинолинил, изотиазолил, изоксазолил, метилендиоксифенил, морфолинил, нафтиридинил, октагидроизохинолинил, оксадиазолил, 1,2,3-оксадиазолил, 1,2,4-оксадиазолил, 1,2,5-оксадиазолил, 1,3,4-оксадиазолил, оксазолидинил, оксазолил, оксиндолил, пиримидинил, фенантридинил, фенантролинил, феназинил, фенотиазинил, феноксатинил, феноксазинил, фталазинил, пиперазинил, пиперидинил, пиперидонил, 4-пиперидонил, пиперонил, птеридинил, пуринил, пиранил, пиразинил, пиразолидинил, пиразолинил, пиразолил, пиридазинил, пиридоксазол, пиридоимидазол, пиридоиазол, пиридинил, пиридил, пиримидинил, пирролидинил, пирролинил, 2H-пирролил, пирролил, хинолинил, хинолинил, 4H-хинолизинил, хиноксалинил, хинуклидинил, тетрагидрофуранил, тетрагидроизохинолинил, тетрагидрохинолинил, тетразолил, 6H-1,2,5-тиадиазинил, 1,2,3-тиадиазолил, 1,2,4-тиадиазолил, 1,2,5-тиадиазолил, 1,3,4-тиадиазолил, тиантренил, тиазолил, тиенил, тиенотиазолил, тиенооксазолил, тиеноимидазолил, тиофенил и ксантенил. Одно или более колец могут быть заменены, как определено выше, на «арил».

«Алкокси» относится к алкильной группе, имеющей значения, определенные выше, с указанным числом атомов углерода, присоединенных через кислородный мостик. Примеры алкокси включают, не ограничиваясь этим, метокси, этокси, n-пропокси, изопропокси, n-бутокси, втор-бутокси, n-пентокси, втор-пентокси и их производные.

Первичные амины образуются, когда один из трех атомов водорода в аммонии замещается замещенной или незамещенной алкильной или замещенной или незамещенной арильной группой. Вторичные амины имеют два органических заместителя (замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный арил или их комбинации), связанные с азотом вместе с одним водородом. В третичных аминах азот имеет три органических заместителя.

«Замещенный», используемый в данном документе, означает, что один или более

атомов или групп атомов в мономере были замещены одним или несколькими атомами или группами атомов, которые отличаются от замещаемого атома или группы атомов. В некоторых вариантах осуществления один или более атомов водорода в мономере замещены одним или несколькими атомами или группами атомов. Примеры функциональных групп, которые могут замещать атом водорода, перечислены выше в определении. В некоторых вариантах осуществления могут быть добавлены одна или более функциональных групп, которые изменяют химические и/или физические свойства получаемого мономера/полимера, такие как заряд или гидрофильность/гидрофобность и т. д. Примеры заместителей включают, не ограничиваясь этим, атом галогена, гидроксил, карбонил (такой как карбоксил, алкоксикарбонил, формил или ацил), тиокарбонил (такой как тиоэфир, тиоацетат или тиоформиат), алкоксил, фосфорил, фосфат, фосфонат, фосфинат, амино, амидо, амидин, имин, циано, нитро, азидо, сульфгидрил, алкилтио, сульфат, сульфонат, сульфоамид, сульфонамидо, сульфонил, нитро, гетероциклил, аралкил или ароматический или гетероароматический фрагмент.

II. Полимеры

Полимеры включают сополимер полиамина и сложного полиэфира, сополимер полиамина и полиамида или их комбинацию, и полиплексы и частицы с твердым ядром, образованные из них. Сополимеры полиамина и сложного полиэфира обсуждаются в WO 2013/082529, WO 2017/151623, WO 2017/197128, опубликованной заявке на патент США № 2016/0251477, опубликованной заявке на патент США № 2015/0073041 и патенте США № 9272043.

При использовании для доставки генных материалов эффективность трансфекции полимеров сильно зависит от концевых групп полимеров. При замещении диэфирного мономера в полимерах двухосновной кислотой, такой как себациновая кислота, можно получить полимеры со смесью гидроксильных и карбоксильных концевых групп. Обе эти две концевые группы могут быть активированы 1,1'-карбодиимидазолом. Активированный продукт может реагировать с молекулами, содержащими амины, с образованием полимеров с новыми концевыми группами.

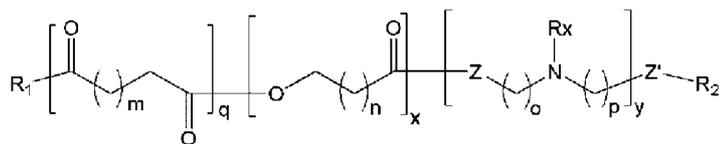
Полимеры могут быть подвергнуты дополнительному гидролизу для высвобождения более активных концевых групп, таких как -ОН и -СООН, которые обе могут образовываться в результате гидролиза сложноэфирных связей в полимерах (также называемому здесь «актуацией»), как правило, путем инкубации полимеров, например, при контролируемой температуре (например, 37°C или 100°C) в течение нескольких суток или недель. В некоторых вариантах осуществления полимеры не гидролизуются, и поэтому их можно назвать «без актуации».

В некоторых вариантах осуществления содержание гидрофобного мономера в полимере увеличивается по сравнению с содержанием того же гидрофобного мономера при использовании для образования полиплексов. Увеличение содержания гидрофобного мономера в полимере приводит к образованию полимера, способного образовывать наночастицы с твердым ядром в присутствии нуклеиновых кислот, в том числе РНК.

В отличие от полиплексов, эти частицы стабильны в течение длительного времени при инкубации в забуференной воде или сыворотке или при введении (например, инъекции) животным. Они также обеспечивают пролонгированное высвобождение нуклеиновых кислот (например, миРНК), что приводит к долговременной активности (например, опосредованному нокдауну миРНК).

А. Структура полимера

Сополимер полиамина и сложного полиэфира или сополимер полиамина и полиамида имеют структуру, показанную в формуле I:



формула I

где n представляет собой целое число 1-30,

m, o и p независимо представляют собой целые числа 1-20,

x, y и q независимо представляют собой целые числа 1-1000,

R_x представляет собой атом водорода, замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный алкокси,

Z и Z' независимо представляют собой O или NR' , где R' представляет собой атом водорода, замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный арил,

R_1 и R_2 представляют собой химические группы, содержащие гидроксильную группу, первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу, третичную аминогруппу или их комбинации.

Примеры групп R_x и R' включают, не ограничиваясь этим, атом водорода, метил, этил, n-пропил, изопропил, n-бутил, трет-бутил, изобутил, втор-бутил, циклогексил, (циклогексил)метил, циклопропилметил, и гомологи и изомеры, например, n-пентил, n-гексил, n-гептил, n-октил, фенил, нафталил, антраценил, фенантрил, хризенил, пиренил, толил, ксиллил и т.д.

В конкретных вариантах осуществления значения x, y и/или q являются такими, что средневесовая молекулярная масса полимера составляет более 20000 дальтон, более 15000 дальтон, более 10000 дальтон, более 5000 дальтон, более 2000 дальтон. В некоторых формах средневесовая молекулярная масса полимера составляет примерно от 2000 дальтон до примерно 20000 дальтон, более предпочтительно примерно от 5000 до примерно 10000 дальтон.

Полимер может быть получен из одного или более лактонов, одного или более аминдиолов (Z и Z'=O), триаминов (Z и Z'=NR') или гидросидиаминов (Z=O и Z'=NR' или Z=NR' и Z'=O) и одной или более двухосновных кислот или сложных диэфиров. В тех вариантах осуществления, где используются два или более различных мономера лактона, двухосновной кислоты или сложного диэфира и/или триамина, аминдиола или

гидроксидиамина, то значения n , o , p и/или m могут быть одинаковыми или разными.

В некоторых формах процентное содержание лактонового звена составляет примерно от 10% до примерно 100%, рассчитанная как лактоновое звено против (лактоновое звено+сложный диэфир/двухосновная кислота). Выраженное в виде молярного соотношения, соотношение лактонового звена к содержанию (лактоновое звено+сложный диэфир/двухосновная кислота) составляет примерно от 0,1 до примерно 1, т. е. $x/(x+q)$ составляет примерно от 0,1 до примерно 1. Предпочтительно, количество атомов углерода в лактоновом звене составляет примерно от 10 до примерно 24, более предпочтительно количество атомов углерода в лактоновом звене составляет примерно от 12 до примерно 16. Наиболее предпочтительно количество атомов углерода в лактоновом звене составляет 12 (додекалактон), 15 (пентадекалактон) или 16 (гексадекалактон). В некоторых формах Z является таким же как Z' .

В некоторых формах Z представляет собой O , и Z' представляет собой O . В некоторых формах Z представляет собой NR' , и Z' представляет собой NR' . В некоторых формах Z представляет собой O , и Z' представляет собой NR' . В некоторых формах Z представляет собой NR' , и Z' представляет собой O .

В некоторых формах Z' представляет собой O , и n равно целому числу от 1 до 24, например 4, 10, 13 или 14. В некоторых формах Z также представляет собой O .

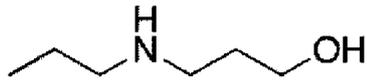
В некоторых формах Z' представляет собой O , n представляет собой целое число 1-24, например 4, 10, 13 или 14, и m представляет собой целое число от 1 до 10, например 4, 5, 6, 7 или 8. В некоторых формах Z также представляет собой O .

В некоторых формах Z' представляет собой O , n представляет собой целое число 1-24, например 4, 10, 13 или 14, m представляет собой целое число 1-10, например 4, 5, 6, 7 или 8, и o и p представляют собой одно и то же целое число 1-6, например 2, 3 или 4. В некоторых формах Z также представляет собой O .

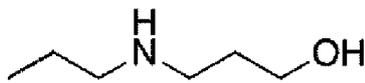
В некоторых вариантах осуществления Z' представляет собой O , n представляет собой целое число 1-24, такое как 4, 10, 13 или 14, m представляет собой целое число 1-10, такое как 4, 5, 6, 7 или 8, и R представляет собой алкил, такой как метил, этил, *n*-пропил, изопропил, *n*-бутил, трет-бутил, изобутил, втор-бутил, циклогексил, (циклогексил)метил, циклопропилметил, и гомологи и изомеры, например, *n*-пентил, *n*-гексил, *n*-гептил и *n*-октил или арил, такой как фенил, нафталил, антраценил, фенантрил, хризенил, пиренил, толил или ксиллил. В некоторых формах Z также представляет собой O .

В некоторых формах n равно 14 (например, пентадекалактон, PDL), m равно 7 (например, себациновая кислота), o и p равно 2 (например, *N*-метилдиэтаноламин, MDEA).

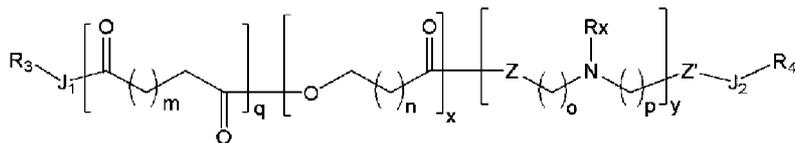
В некоторых вариантах осуществления полиплексы или частицы образованы из полимера, где R_1 и/или R_2 не относятся к соответствующим полиплексам, где R_1 и/или R_2 состоят из или включают:



В некоторых вариантах осуществления полиплексы или частицы, образованные из полимера, демонстрируют улучшенную загрузку, улучшенную трансфекцию клеток, улучшенное внутриклеточное эндосомальное высвобождение или комбинацию этих свойств, груза нуклеиновой кислоты, такого как РНК, более конкретно мРНК, по сравнению с соответствующими полиплексами, где R_1 и/или R_2 состоят из или включают:



В некоторых формах полимер имеет структуру формулы II:



формула II

где J_1 и J_2 независимо представляют собой связывающие группы или отсутствуют, R_3 и R_4 независимо представляют собой замещенный алкил, содержащий гидроксильную группу, первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу, третичную аминогруппу или их комбинации. В некоторых формах молекулярная масса R_3 , R_4 или обоих составляет 500 дальтон или меньше, 200 дальтон или 200 дальтон или 100 дальтон или меньше.

В некоторых формах J_1 представляет собой -O- или -NH-.

В некоторых формах J_2 представляет собой -C(O)NH- или -C(O)O-.

В некоторых формах R_3 идентичен R_4 .

Предпочтительно R_3 и/или R_4 являются линейными.

В некоторых формах R_3 , R_4 или оба содержат первичную аминогруппу. В некоторых формах R_3 , R_4 или оба содержат первичную аминогруппу и одну или более вторичных или третичных аминогрупп.

В некоторых формах R_3 , R_4 или оба содержат гидроксильную группу. В некоторых формах R_3 , R_4 или оба содержат гидроксильную группу и одну или более аминогрупп, предпочтительно вторичных или третичных аминогрупп. В некоторых формах R_3 , R_4 или оба содержат гидроксильную группу и не содержат аминогруппы.

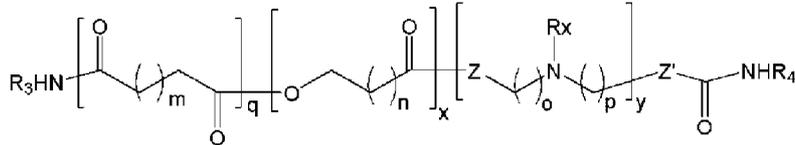
В некоторых формах по меньшей мере один из R_3 и R_4 не содержит гидроксильной группы.

В некоторых формах R_3 , R_4 или оба представляют собой -незамещенный C_1 - C_{10} алкилен-Aq-незамещенный C_1 - C_{10} алкилен-Bq, -незамещенный C_1 - C_{10} алкилен-Aq-

замещенный C₁-C₁₀ алкилен-Bq, -замещенный C₁-C₁₀ алкилен -Aq-незамещенный C₁-C₁₀ алкилен-Bq или -замещенный C₁-C₁₀ алкилен-Aq-замещенный C₁-C₁₀ алкилен-Bq, где Aq отсутствует или представляет собой -NR₅-, и Bq представляет собой гидроксил, первичный амин, вторичный амин или третичный амин, где R₅ представляет собой атом водорода, замещенный или незамещенный алкил или замещенный или незамещенный арил.

В некоторых формах R₃, R₄ или оба выбраны из групп, показанных на фиг. 1.

В некоторых формах полимер имеет структуру формулы III:



формула III

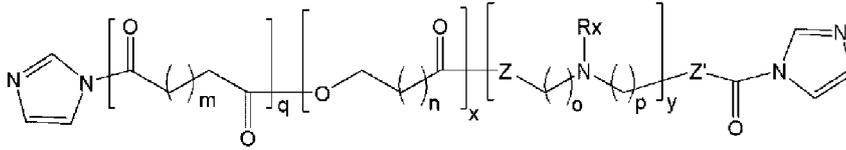
Мономерные звенья могут быть замещены в одном или более положениях одним или более заместителями. Примеры заместителей включают, не ограничиваясь этим, алкильные группы, циклические алкильные группы, алкеновые группы, циклические алкеновые группы, алкины, атом галогена, гидроксил, карбонил (такой как карбоксил, алкоксикарбонил, формил или ацил), тиокарбонил (такой как сложный тиоэфир, тиоацетат или тиоформат), алкокси, фосфорил, фосфат, фосфонат, фосфинат, амино, амидо, амидин, имин, циано, нитро, азидо, сульфгидрил, алкилтио, сульфат, сульфонат, сульфоамид, сульфоамидо, сульфонил, нитро, гетероцикл, аралкил, или ароматическую или гетероароматическую группу.

Полимер является биосовместимым. Известно, что легкодоступные лактоны с кольцами различного размера обладают низкой токсичностью: например, сложные полиэфиры, полученные из небольших лактонов, таких как поли(капролактон) и поли(п-диоксанон), являются коммерчески доступными биоматериалами, которые использовались в клинических применениях. Крупные (например, C₁₆-C₂₄) лактоны и их полиэфирные производные являются природными продуктами, которые были обнаружены в живых организмах, таких как пчелы. Лактоны, содержащие атомы углерода в кольце между 16 и 24, особо рассматриваются и раскрываются.

В некоторых формах полимеры можно дополнительно активировать посредством гидролиза с контролируемой температурой, тем самым экспонируя одну или более активированных концевых групп. Одна или более активированных концевых групп могут представлять собой, например, гидроксильные или карбоксильные концевые группы, обе из которых могут быть получены путем гидролиза сложноэфирных связей в полимерах. Активированные полимеры могут иметь средневесовую молекулярную массу примерно от 5 до 25 кДа, предпочтительно примерно от 5 до 10 кДа. В рамках настоящего изобретения, термин «примерно» означает незначительные вариации в пределах приемлемых параметров. Для ясности «примерно» относится к $\pm 10\%$ от заданного значения. В некоторых формах активированные полимеры содержат R₁ или R₂ на одном конце и гидроксильную или карбоксильную концевую группу на другом конце, образующуюся в

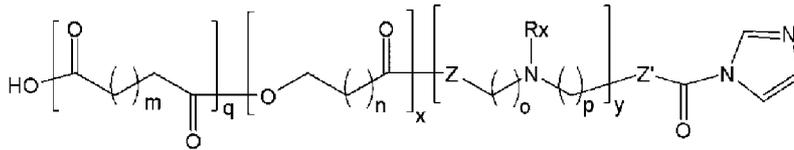
результате гидролиза.

В некоторых формах полимер имеет структуру формулы IV:



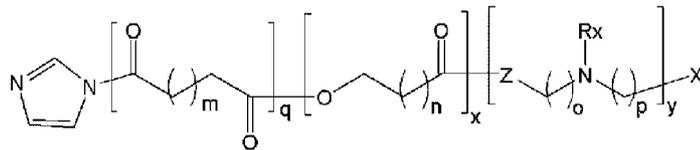
формула IV

В некоторых формах полимер имеет структуру формулы V:



формула V

В некоторых формах полимер имеет структуру формулы VI:



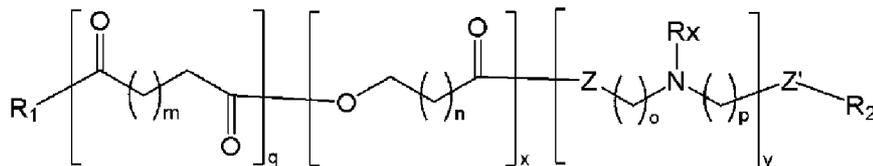
формула VI

где X' представляет собой -ОН или -NHR'.

Формулы V, VI и VI представляют собой структуры промежуточных продуктов. Их можно использовать для синтеза широкого ряда полимеров со структурой формулы I, II или III.

Были разработаны сополимер полиамина и сложного полиэфира или сополимер полиамина и полиамида с улучшенными свойствами для доставки, включая доставку в легкие.

Сополимер полиамина и сложного полиэфира или сополимер полиамина и полиамида содержат структуру:



формула I

где n представляет собой целое число 1-30,

m, o и p независимо представляют собой целые числа 1-20,

x, y и q независимо представляют собой целые числа 1-1000,

R_x представляет собой атом водорода, замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный алкокси,

Z и Z' независимо представляют собой O или NR', где R' представляет собой атом водорода, замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный

арил,

R_1 и R_2 представляют собой химические группы, содержащие гидроксильную группу, первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу, третичную аминогруппу или их комбинации.

В некоторых формах Z является таким же как Z' .

В некоторых формах Z представляет собой O , и Z' представляет собой O . В некоторых формах Z представляет собой NR' , и Z' представляет собой NR' . В некоторых формах Z представляет собой O , и Z' представляет собой NR' . В некоторых формах Z представляет собой NR' , и Z' представляет собой O .

В некоторых формах Z' представляет собой O , и n равно целому числу 1-24, например 4, 10, 13 или 14. В некоторых формах Z также представляет собой O .

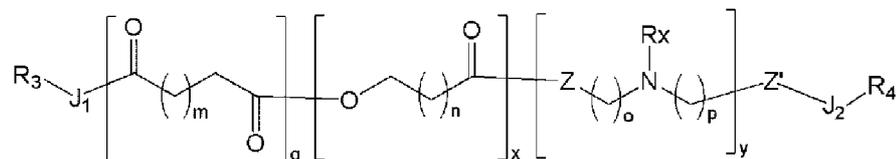
В некоторых формах Z' представляет собой O , n представляет собой целое число 1-24, например 4, 10, 13 или 14, и m представляет собой целое число 1-10, например 4, 5, 6, 7 или 8. В некоторых формах Z также представляет собой O .

В некоторых формах Z' представляет собой O , n представляет собой целое число 1-24, например 4, 10, 13 или 14, m представляет собой целое число 1-10, например 4, 5, 6, 7 или 8, и o и p представляют собой одно и то же целое число 1-6, например 2, 3 или 4. В некоторых формах Z также представляет собой O .

В некоторых вариантах осуществления Z' представляет собой O , n представляет собой целое число 1-24, такое как 4, 10, 13 или 14, m представляет собой целое число 1-10, такое как 4, 5, 6, 7 или 8, и R представляет собой алкил, такой как метил, этил, *n*-пропил, изопропил, *n*-бутил, трет-бутил, изобутил, втор-бутил, циклогексил, (циклогексил)метил, циклопропилметил, и гомологи и изомеры, например, *n*-пентил, *n*-гексил, *n*-гептил и *n*-октил или арил, такой как фенил, нафталил, антраценил, фенантрил, хризенил, пиренил, толил или ксиллил. В некоторых формах Z также представляет собой O .

В некоторых формах n равно 14 (например, пентадекалактон, PDL), m равно 7 (например, себациновая кислота), o и p равно 2 (например, *N*-метилдиэтаноламин, MDEA).

В некоторых формах полимер содержит структуру формулы II:



формула II

где R_x , Z , Z' , m , n , o , p , q , x и y имеют значения, определенные выше для формулы I, J_1 и J_2 независимо отсутствуют или представляют собой связывающие группы, такие как $-C(O)-$, $-C(O)NH-$, $-C(O)O-$, $-O-$ и $-NH-$,

R_3 и R_4 в формуле II независимо представляют собой замещенный алкил, содержащий гидроксильную группу, первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу, третичную аминогруппу или их комбинации.

В некоторых формах J_1 представляет собой $-O-$ или $-NH-$.

В некоторых формах J_2 представляет собой $-C(O)-$, $-C(O)NH-$ или $-C(O)O-$.

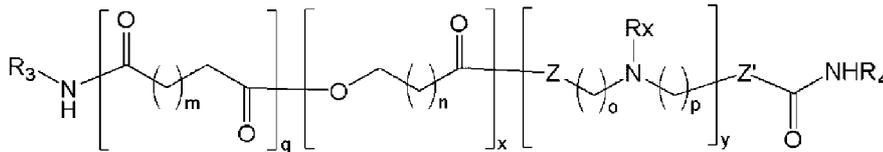
В некоторых формах R_3 идентичен R_4 .

Предпочтительно R_3 и/или R_4 являются линейными.

В некоторых формах R_3 , R_4 или оба содержат гидроксильную группу. В некоторых формах R_3 , R_4 или оба содержат гидроксильную группу и одну или более аминогрупп, предпочтительно вторичных или третичных аминогрупп. В некоторых формах R_3 , R_4 или оба содержат гидроксильную группу и не содержат аминогруппы.

В некоторых формах по меньшей мере один из R_3 и R_4 не содержит гидроксильной группы.

В некоторых формах полимер содержит структуру формулы III:



формула III

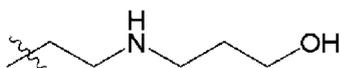
где R_3 , R_4 , R_x , Z , Z' , m , n , o , p , q , x и y имеют значения, определенные выше для формулы II.

В конкретных вариантах осуществления значения x , y и/или q являются такими, что средневесовая молекулярная масса полимера составляет более 20000 дальтон, более 15000 дальтон, более 10000 дальтон, более 5000 дальтон, более 2000 дальтон. дальтоны. В некоторых формах средневесовая молекулярная масса полимера составляет примерно от 2000 дальтон до примерно 20000 дальтон, более предпочтительно примерно от 5000 до примерно 10000 дальтон.

Полимер может быть получен из одного или более лактонов, одного или более аминдиолов (Z и $Z'=O$) или триаминов (Z и $Z'=NR'$) и одной или более двухосновных кислот или сложных диэфиров. В тех вариантах осуществления, где используются два или более различных мономера лактона, двухосновной кислоты или сложного диэфира и/или триамина или аминдиола, то значения n , o , p и/или m могут быть одинаковыми или разными.

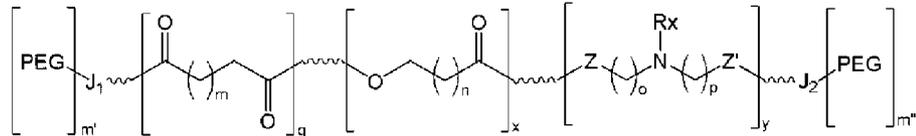
В некоторых вариантах осуществления полимеры имеют массу примерно от 2 кДа до 20 кДа, или примерно от 2 кДа до примерно 10 кДа, или примерно от 2 кДа до примерно 5 кДа.

Сополимер полиамина и сложного полиэфира или сополимер полиамина и полиамида могут быть использованы для образования полиплексов, микрочастиц и/или наночастиц, имеющих инкапсулированную в них одну или более матричных рибонуклеиновых кислот. В некоторых формах полиплексы или частицы образованы из полимера, где R_1 и/или R_2 не состоят из или не включают:



В некоторых формах сополимеры полиамина и сложного полиэфира или сополимеры полиамина и полиамида находятся в смеси, содержащей сополимеры полиамина и сложного полиэфира или сополимеры полиамина и полиамида, конъюгированные с полиэтиленгликолем (ПЭГ), т.е. ПЭГ-конъюгированные сополимеры полиамина и сложного полиэфира или сополимеры полиамина и полиамида.

В некоторых формах ПЭГ-конъюгированные сополимеры полиамина и сложного полиэфира или сополимеры полиамина и полиамида содержат структуру:



формула XI

где m' и m'' независимо равны 0 или 1, при условии, что $m' + m''$ равно 1 или 2,

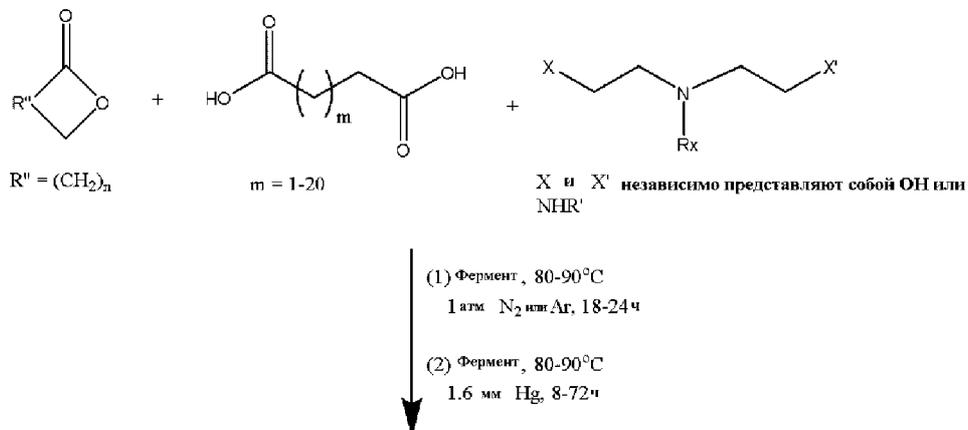
J_1 и J_2 в формуле XI независимо отсутствуют или представляют собой связывающие группы, такие как $-C(O)-$, $-C(O)NH-$, $-C(O)O-$, $-O-$ и $-NH-$.

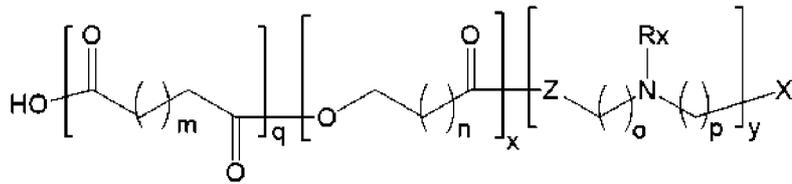
В некоторых формах формулы XI J_1 представляет собой $-O-$ или $-NH-$. В некоторых формах формулы XI J_2 представляет собой $-C(O)-$, $-C(O)NH-$ или $-C(O)O-$.

В. Способы получения полимеров

Полимеры обычно получают модификацией синтетических полимеров. Примеры синтетических полимеров включают сополимер полиамина и сложного полиэфира, образованный лактоном, диалкиловой кислотой и диалкиламином. Также обеспечиваются способы синтеза сополимера полиамина и сложного полиэфира из лактона, диалкиловой кислоты и диалкиламина с использованием ферментного катализатора, такого как липаза. Примеры лактонов раскрыты в публикации заявки на патент США № US20170121454. В некоторых формах сополимер полиамина и сложного полиэфира получают, как показано на схеме 1:

Схема реакций 1: получение немодифицированного сополимера полиамина и сложного полиэфира





формула VII

Молярное соотношение мономеров (например, лактона:аминдиола:двухосновной кислоты) может варьироваться, например, примерно от 10:90:90 до примерно 90:10:10. В некоторых вариантах осуществления соотношение составляет 10:90:90, 20:80:80, 40:60:60, 60:40:40 или 80:20:20. Средневесовая молекулярная масса, определенная методом GPC, с использованием стандартов полистирола с узкой полидисперсностью, может варьироваться, например, примерно от 2000 дальтон до примерно 50000 дальтон, предпочтительно примерно от 2000 дальтон до примерно 20000 дальтон, более предпочтительно примерно от 5000 дальтон до примерно 20000 дальтон, наиболее предпочтительно примерно от 5000 дальтон до примерно 10000 дальтон.

Гидрофобность полимеров можно регулировать, варьируя процентное содержание лактона, например, примерно от 10% до примерно 100% (рассчитанное лактонное звено против (лактоновое звено+сложный диэфир/двухосновная кислота)). Молекулярную массу полимеров можно регулировать, регулируя время реакции на второй стадии, например, примерно от 8 до примерно 72 ч.

Ферментативный метод позволяет синтезировать полимеры с различной структурой цепи и регулируемой гидрофобностью. В некоторых вариантах осуществления гидрофобность варьируется посредством изменения размера кольца и/или молярного количества мономера лактона. В качестве сомономеров можно использовать лактоны с широким диапазоном размеров колец (например, C₄-C₂₄, предпочтительно C₆-C₂₄, более предпочтительно C₆-C₁₆). Реакцию можно проводить в одну стадию без защиты и снятия защиты аминогрупп(ов). Такие аминоксодержащие сополиэфиры чрезвычайно трудно получить с использованием обычных металлоорганических катализаторов, поскольку такие катализаторы часто чувствительны к органическим аминам или дезактивируются ими. Также известно, что такие катализаторы неэффективны для полимеризации больших мономеров лактонового кольца. Ферментативные катализаторы имеют явные преимущества для получения биомедицинских полимеров благодаря высокой активности и селективности фермента и, как следствие, высокой чистоте продуктов, не содержащих металлов.

Полимеры со структурой формулы IV, V или VI можно синтезировать взаимодействием немодифицированного полимера формулы VII с 1,1'-карбонилдиимидазолом (CDI) в молярном соотношении примерно от 1:10 до примерно 1:60, предпочтительно примерно 1:40.

Полимеры со структурой формулы I или II могут быть получены модификацией концевых групп немодифицированного полимера формулы VII с использованием известных в данной области реакций сочетания. Например, полимеры со структурой

формулы III могут быть синтезированы (1) взаимодействием немодифицированного полимера формулы VII с CDI с получением полимера формулы IV и (2) взаимодействием полимера формулы IV с R_3-NH_2 и R_4-NH_2 . В некоторых формах R_3 , R_4 или оба выбраны из показанных на фиг.1. Предпочтительно R_3 и R_4 являются одинаковыми.

Альтернативно, полимеры со структурой формулы III можно синтезировать (1) взаимодействием немодифицированного полимера формулы VII с CDI с получением полимера формулы V или VI, (2) защитой группы $-COOH$ или группы $-X'$ в полимере со стадии (1), (3) взаимодействием защищенного полимера со стадии (2) с R_4-NH_2 или R_3-NH_2 , (4) снятием защиты с группы $-COOH$ или группы $-X'$ в полимере со стадии (3) и (5) взаимодействием полимера со снятой защитой со стадии (4) с R_3-NH_2 или R_4-NH_2 .

Опосредованную гидролизом активацию полимеров формул I, II или III можно проводить при контролируемой температуре в течение до 30 суток или более. Продолжительность гидролиза может варьироваться в зависимости от молекулярной массы активируемых полимеров. Полимеры с высокой молекулярной массой (например, примерно 20-25 кДа) оптимально гидролизуются в течение более длительных периодов времени, например, в течение примерно от 30 до 40 суток. Полимеры с меньшей молекулярной массой (например, примерно 5-7 кДа) оптимально гидролизуются в течение более коротких периодов времени, например, в течение примерно от 4 до 10 суток.

В некоторых формах полимеры гидролизуются при температуре примерно от $30^\circ C$ до $42^\circ C$ или при любой температуре в диапазоне примерно до $100^\circ C$. РАСЕ полимеры можно гидролизовать при температуре примерно от $35^\circ C$ до $40^\circ C$, например, примерно $37^\circ C$.

В некоторых формах полимеры гидролизуют, например, при давлении примерно 1 атм. Более высокие значения давления ускоряют процесс (например, давление примерно от 1 до примерно 100 атм). Скорость процесса будет определяться специалистом в данной области техники для конкретных получаемых составов.

Средневесовая молекулярная масса полученного продукта гидролиза может варьироваться примерно от 5 кДа до примерно 25 кДа, предпочтительно примерно от 5 до примерно 10 кДа.

Предпочтительно гидролизу подвергается одна или более сложноэфирных связей в полимерах. Продукт гидролиза может иметь R_1 или R_2 на одном конце и карбоксильную или гидроксильную группу на другом конце, образующиеся в результате гидролиза.

Сополимер полиамина и сложного полиэфира или сополимер полиамина и полиамида, конъюгированный с ПЭГ, можно синтезировать в условиях, сходных с условиями, приведенными на схеме реакций 1, за исключением того, что в дополнение к (i) лактону, (ii) двухосновной кислоте/диэфире и (iii) аминдиолу и/или триамину, к реагентам может быть добавлен ПЭГ, содержащий концевую карбоксильную, гидроксильную или аминогруппу.

III. Микрочастицы, образованные из полимеров

Полимеры можно использовать для получения микро- и/или наночастиц с

инкапсулированным в них одним или более терапевтическими, диагностическими или профилактическими средствами. Агент может быть инкапсулирован внутри частицы, диспергирован в полимерной матрице, образующей частицу, ковалентно или нековалентно связан с поверхностью частицы или их комбинациями.

В еще одних вариантах осуществления полимер является биосовместимым и биodeградируемым. Нуклеиновая кислота(ы), инкапсулированная в частицах и/или связанная с ними, может высвободиться посредством различных механизмов, включая диффузию и деградацию полимерной матрицы. Скорость высвобождения можно регулировать, изменяя мономерный состав полимера и, таким образом, скорость деградации. Например, если основным механизмом деградации является простой гидролиз, то увеличение гидрофобности полимера может замедлить скорость деградации и, следовательно, увеличить период высвобождения. Во всех случаях полимерную композицию выбирают таким образом, чтобы высвобождалось эффективное количество нуклеиновой кислоты (нуклеиновых кислот) для достижения желаемой цели/результата.

Полимеры можно использовать для инкапсулирования, смешивания или ионного или ковалентного связывания с любым из множества терапевтических, профилактических или диагностических средств. Широкий ряд биологически активных веществ может быть инкапсулирован или включен либо для доставки к месту проявления действия с использованием полимера, либо для придания полимеру свойств, таких как биоадгезия, присоединение к клеткам, усиление роста клеток, ингибирование роста бактерий и предупреждение образования тромба.

В некоторых формах средство, которое необходимо инкапсулировать и доставить, может представлять собой низкомолекулярный агент (т. е. неполимерный агент с молекулярной массой ниже 2000, 1500, 1000, 750 или 500 дальтон) или макромолекулу (например, олигомер или полимер), такую как белки, пептиды, нуклеиновые кислоты и т.д. Подходящие низкомолекулярные активные агенты включают органические, неорганические и/или металлоорганические соединения. Частицы можно использовать для доставки агента *in vivo* и/или *in vitro*.

Примеры подходящих терапевтических и профилактических средств включают синтетические неорганические и органические соединения, белки и пептиды, полисахариды и другие сахара, липиды и нуклеиновокислотные последовательности ДНК и РНК, обладающие терапевтической, профилактической или диагностической активностью. Последовательности нуклеиновой кислоты включают гены, антисмысловые молекулы, которые связываются с комплементарной ДНК для ингибирования транскрипции, и рибозимы. Соединения с широким диапазоном молекулярной массы могут быть инкапсулированы, например, от 100 до 500000 г или более на моль. Примеры подходящих веществ включают белки, такие как антитела, лиганды рецепторов и ферменты, пептиды, такие как пептиды адгезии, сахараиды и полисахариды, синтетические органические или неорганические лекарственные средства и нуклеиновые кислоты. Примеры веществ, которые могут быть инкапсулированы, включают ферменты, факторы

свертывания крови, ингибиторы или агенты, растворяющие тромб, такие как стрептокиназа и тканевой активатор плазминогена; антигены для иммунизации; гормоны и факторы роста; полисахариды, такие как гепарин; олигонуклеотиды, такие как антисмысловые олигонуклеотиды и рибозимы, и ретровирусные векторы для применения в генной терапии. Полимер также можно использовать для инкапсуляции клеток и тканей.

Примеры терапевтических средств, которые могут быть включены в частицы, включают, не ограничиваясь этим, опухолевые антигены, CD4+ Т-клеточные эпитопы, цитокины, химиотерапевтические препараты, радионуклиды, низкомолекулярные ингибиторы передачи сигналов, фототермальные агенты, моноклональные антитела, иммунные молекулы, сигнализирующие об опасности, другие иммунотерапевтические средства, ферменты, антибиотики, противовирусные препараты (в частности, ингибиторы протеазы самостоятельно или в комбинации с нуклеозидами для лечения ВИЧ или гепатита В или С), противопаразитарные средства (против гельминтов, простейших), факторы роста, ингибиторы роста, гормоны, антагонисты гормонов, антитела и их биоактивные фрагменты (включая гуманизированные, одноцепочечные и химерные антитела), антиген и вакцинные составы (включающие адъюванты), пептидные препараты, противовоспалительные средства, иммуномодуляторы (включая лиганды, которые связываются с Toll-подобными рецепторами для активации врожденной иммунной системы, молекулы, которые мобилизуют и оптимизируют адаптивную иммунную систему, молекулы, которые активируют или положительно регулируют действие цитотоксических Т-лимфоцитов, естественных киллеров и Т-хелперов, и молекулы, которые дезактивируют или отрицательно регулируют супрессорные или регуляторные Т-клетки), агенты, которые способствуют поглощению частиц клетками (включая дендритные клетки и другие антигенпрезентирующие клетки), нутрицевтики, такие как витамины, и олигонуклеотидные препараты (включая ДНК, РНК, антисмысловые, аптамеры, малые интерферирующие РНК, рибозимы, внешние направляющие последовательности для рибонуклеазы Р и триплекс-образующие агенты).

Репрезентативные противоопухолевые препараты включают, не ограничиваясь этим, алкилирующие агенты (такие как цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, мехлорэтамин, циклофосфамид, хлорамбуцил, дакарбазин, ломустин, кармустин, прокарбазин, хлорамбуцил и ифосфамид), антиметаболиты (такие как фторурацил (5-FU), гемцитабин, метотрексат, цитозин арабинозид, флударабин и флоксуридин), антимитотические агенты (включая таксаны, такие как паклитаксел и доцетаксел, и алкалоиды барвинка, такие как винкристин, винбластин, винорелбин и виндезин), антрациклины (включая доксорубин, даунорубин, валрубин, идарубин и эпирубин, а также актиномицины, такие как актиноцин D), цитотоксические антибиотики (включая митомицин, пликамицин и блеомицин), ингибиторы топоизомеразы (включая камптотецины, такие как камптотecin, иринотекан и топотекан, а также производные эпиподофиллотоксинов, такие как амсакрин, этопозид, этопозид фосфат и тенипозид), антитела к фактору роста эндотелия сосудов (VEGF), такие как бевацизумаб

(AVASTIN®), другие анти-VEGF соединения; талидомид (THALOMID®) и его производные, такие как леналидомид (REVLIMID®); эндостатин; ангиостатин; ингибиторы рецепторной тирозинкиназы (RTK), такие как сунитиниб (SUTENT®); ингибиторы тирозинкиназы, такие как сорафениб (Nexavar®), эрлотиниб (Tarceva®), пазопаниб, акситиниб и лапатиниб; трансформирующий фактор роста- α или ингибиторы трансформирующего фактора роста- β и антитела к рецептору эпидермального фактора роста, такие как панитумумаб (VECTIBIX®) и цетуксимаб (ERBITUX®).

Примеры иммуномодулирующих агентов включают цитокины, ксантины, интерлейкины, интерфероны, олигодезоксинуклеотиды, глюкозы, факторы роста (например, TNF, CSF, GM-CSF и G-CSF), гормоны, такие как эстрогены (диэтилстилбестрол, эстрадиол), андрогены (тестостерон, HALOTESTIN®) (флюоксиместерон), прогестины (MEGACE® (мегестрола ацетат), PROVERA® (медроксипрогестерона ацетат)) и кортикостероиды (преднизон, дексаметазон, гидрокортизон).

Примеры иммунологических адъювантов, которые могут быть связаны с частицами, включают, не ограничиваясь этим, лиганды TLR, лиганды лектиновых рецепторов С-типа, лиганды NOD-подобных рецепторов, лиганды RLR и лиганды RAGE. Лиганды TLR могут включать липополисахарид (LPS) и его производные, а также липид А и его производные, включая, не ограничиваясь этим, монофосфориллипид А (MPL), гликопиранозиллипид А, РЕТ-липид А и 3-О-дезацил-4'-монофосфориллипид А.

Частицы также могут включать антигены и/или адъюванты (т.е. молекулы, усиливающие иммунный ответ). Вакцины на основе пептидов, белков и ДНК могут использоваться для индукции иммунитета к различным заболеваниям или патологическим состояниям. Клеточный иммунитет необходим для обнаружения и элиминации зараженных вирусом клеток. Большинство традиционных вакцин (например, вакцины на белковой основе) могут индуцировать только гуморальный иммунитет. Вакцина на основе ДНК представляет собой уникальное средство для вакцинации против вируса или паразита, поскольку вакцина на основе ДНК может индуцировать как гуморальный, так и клеточно-опосредованный иммунитет. Кроме того, вакцины на основе ДНК потенциально более безопасны, чем традиционные вакцины. ДНК-вакцины относительно более стабильны и более экономичны в производстве и хранении. ДНК-вакцины состоят из двух основных компонентов: носителей ДНК (или средств для доставки) и ДНК, кодирующих антигены. Носители ДНК защищают ДНК от деградации и могут способствовать проникновению ДНК в определенные ткани или клетки и экспрессии на эффективном уровне.

Репрезентативными диагностическими агентами являются агенты, обнаруживаемые с помощью рентгеновских лучей, флуоресценции, магнитно-резонансной томографии, радиоактивности, ультразвука, компьютерной томографии (КТ) и позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ). Ультразвуковые контрастные агенты обычно представляют собой газ, такой как воздух, кислород или перфторуглероды. Типичные диагностические агенты включают парамагнитные молекулы, флуоресцентные соединения, магнитные молекулы и

радионуклиды, а также агенты для рентгеновской визуализации.

В некоторых вариантах осуществления частицы, полученные с использованием способов, описанных здесь, содержат менее 80 мас.%, менее 75 мас.%, менее 70 мас.%, менее 60 мас.%, менее 50 мас.%, менее 40 мас.%, менее 30 мас.%, менее 20 мас.%, менее 15 мас.%, менее 10 мас.%, менее 5 мас.%, менее 1 мас.%, менее 0,5 мас.% или менее 0,1 мас.% агента. В некоторых вариантах осуществления агент может представлять собой смесь фармацевтически активных агентов. Процент загрузки зависит от множества факторов, в том числе от инкапсулируемого агента, полимера, используемого для приготовления частиц, и способа, используемого для приготовления частиц.

Частицы могут обеспечивать контролируемое высвобождение лекарственного средства. Например, неизменные частицы могут обеспечивать высвобождение эффективного количества лекарственного средства во времени в зависимости от скорости диффузии лекарственного средства из частицы и/или скорости деградации полимера. Состав полимера можно варьировать, чтобы регулировать поведение полимера при деградации и, таким образом, скорость/время высвобождения доставляемого агента. Альтернативно, частицу можно покрыть одним или более материалами для обеспечения контролируемого высвобождения, такого как замедленного высвобождения или отсроченного высвобождения доставляемого агента или агентов.

Вещества для замедленного высвобождения и отсроченного высвобождения хорошо известны в данной области техники. Твердые сложные эфиры жирных кислот, которые гидролизуются липазами, могут быть нанесены распылением на микрочастицы или частицы лекарственного средства. Зеин является примером природного нерастворимого в воде белка. Он может быть нанесен на лекарственное средство, содержащее микрочастицы или частицы лекарственного средства, путем распыления или методом влажной грануляции. В дополнение к природным нерастворимым в воде веществам некоторые субстраты пищеварительных ферментов можно обрабатывать с помощью процедур сшивания, что приводит к образованию нерастворимых сетей. Сообщалось о многих методах сшивания белков, инициируемых как химическими, так и физическими средствами. Одним из наиболее распространенных способов проведения сшивания является использование химических сшивающих агентов. Примеры химических сшивающих агентов включают альдегиды (глутеральдегид и формальдегид), эпоксидные соединения, карбодиимиды и генипин. В дополнение к этим сшивающим агентам для сшивания желатина использовались окисленные и нативные сахара. Сшивание также может быть осуществлено с использованием ферментативных средств; например, трансклотаминаза была одобрена в качестве вещества GRAS для сшивания морепродуктов. Наконец, сшивание можно инициировать физическими средствами, такими как термическая обработка, УФ-облучение и гамма-облучение.

Для получения слоя покрытия из сшитого белка, окружающего лекарственное средство, содержащее микрочастицы или частицы лекарственного средства, водорастворимый белок может быть нанесен распылением на микрочастицы и затем сшит

одним из способов, описанных выше. Альтернативно микрочастицы, содержащие лекарство, могут быть микроинкапсулированы в белок путем разделения фаз коацервации (например, путем добавления солей) и впоследствии сшиты. Некоторые подходящие белки для этой цели включают желатин, альбумин, казеин и глютен.

Полисахариды также могут быть сшиты с образованием водонерастворимой сети. Для многих полисахаридов это может быть достигнуто реакцией с солями кальция или поливалентными катионами, которые сшивают основные полимерные цепи. Пектин, альгинат, декстран, амилоза и гуаровая камедь подвергаются сшиванию в присутствии поливалентных катионов. Также могут образовываться комплексы между противоположно заряженными полисахаридами; пектин и хитозан, например, могут образовывать комплексы посредством электростатических взаимодействий.

Полимеры для контролируемого высвобождения, известные в данной области техники, включают сополимеры акриловой кислоты и метакриловой кислоты, метилметакрилат, сополимеры метилметакрилата, этоксиэтилметакрилаты, цианоэтилметакрилат, сополимер аминоалкилметакрилата, поли(акриловую кислоту), поли(метакриловую кислоту), сополимер метакриловой кислоты и алкиламина, поли(метилметакрилат), поли(метакриловую кислоту)(ангидрид), полиметакрилат, полиакриламид, поли(метакриловый ангидрид) и сополимеры глицидилметакрилата.

В некоторых предпочтительных вариантах акриловый полимер состоит из одного или более сополимеров метакрилата аммония. Сополимеры метакрилата аммония хорошо известны в данной области и описаны в NF XVII как полностью полимеризованные сополимеры сложных эфиров акриловой и метакриловой кислот с низким содержанием групп четвертичного аммония.

В одном предпочтительном варианте осуществления акриловый полимер представляет собой лак на основе акриловой смолы, такой как коммерчески доступный от Rohm Pharma под торговой маркой EUDRAGIT®. В дополнительных предпочтительных вариантах акриловый полимер включает смесь двух лаков на основе акриловой смолы, коммерчески доступных от Rohm Pharma под торговыми названиями EUDRAGIT®RL30D и EUDRAGIT® RS30D соответственно. EUDRAGIT® RL30D и EUDRAGIT® RS30D представляют собой сополимеры акриловых и метакриловых эфиров с низким содержанием четвертичных аммониевых групп, молярное соотношение аммониевых групп к остальным нейтральным (мет)акриловым эфирам составляет 1:20 в EUDRAGIT® RL30D и 1:40 в EUDRAGIT® RS30D. Средняя молекулярная масса составляет примерно 150000. EUDRAGIT® S-100 и EUDRAGIT® L-100 также являются предпочтительными. Кодовые обозначения RL (высокая проницаемость) и RS (низкая проницаемость) относятся к свойствам проницаемости этих агентов. Смеси EUDRAGIT® RL/RS нерастворимы в воде и жидкостях пищеварительного тракта. Однако системы, состоящие из множества частиц, образованные с их включением, способны набухать и проницаемы в водных растворах и жидкостях пищеварительного тракта.

Полимеры, такие как EUDRAGIT® RL/RS, можно смешивать друг с другом в любом

желаемом соотношении, чтобы в конечном итоге получить состав с замедленным высвобождением, имеющий желаемый профиль растворения. Желательные системы из множества частиц с замедленным высвобождением могут быть получены, например, из 100% EUDRAGIT®RL, 50% EUDRAGIT®RL и 50% EUDRAGIT®RS, и 10% EUDRAGIT®RL и 90% EUDRAGIT®RS. Специалисту в данной области будет понятно, что можно использовать и другие акриловые полимеры, такие как, например, EUDRAGIT®L.

Другие вещества для контролируемого высвобождения включают метилакрилат-метилметакрилат, поливинилхлорид и полиэтилен. Гидрофильные полимеры включают, не ограничиваясь этим, целлюлозные полимеры, такие как метил- и этилцеллюлоза, гидроксилалкилцеллюлозы, такие как гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, натрий-карбоксиметилцеллюлоза и Carbopol® 934, оксиды полиэтилена и их смеси. Жировые соединения включают, не ограничиваясь этим, различные воска, такие как карнаубский воск и глицерилтристеарат, и вещества типа воска, включая гидрогенизированное касторовое масло или гидрогенизированное растительное масло или их смеси.

Подходящие вещества для покрытия для осуществления отсроченного высвобождения включают, не ограничиваясь этим, целлюлозные полимеры, такие как гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксиметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, ацетатсукцинат гидроксипропилметилцеллюлозы, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, ацетат целлюлозы, фталат ацетата целлюлозы, тримеллитат ацетата целлюлозы и натрий-карбоксиметилцеллюлоза; полимеры и сополимеры акриловой кислоты, предпочтительно образованные из акриловой кислоты, метакриловой кислоты, метилакрилата, этилакрилата, метилметакрилата и/или этилметакрилата и других метакриловых смол, которые имеются в продаже под торговой маркой EUDRAGIT® (Rohm Pharma; Westerstadt, Германия), в том числе EUDRAGIT® L30D-55 и L100-55 (растворимы при pH 5,5 и выше), EUDRAGIT® L-100 (растворимы при pH 6,0 и выше), EUDRAGIT® S (растворимы при pH 7,0 и выше, в результате более высокая степень этерификации), и EUDRAGITS® NE, RL и RS (нерастворимые в воде полимеры, имеющие разную степень проницаемости и расширяемости); виниловые полимеры и сополимеры, такие как поливинилпирролидон, винилацетат, винилацетатфталат, сополимер винилацетата кротоновой кислоты и сополимер этилена и винилацетата; ферментативно разлагаемые полимеры, такие как азополимеры, пектин, хитозан, амилоза и гуаровая камедь; зеин и шеллак.

А. Композиции для трансфекции полинуклеотидов

Было обнаружено, что способность поликатионных полимеров доставлять гены обусловлена множеством факторов, включая молекулярную массу полимера, гидрофобность и плотность заряда. Многие синтетические поликатионные материалы были исследованы в качестве векторов для невирусной доставки генов, но почти все они неэффективны за счет их низкой эффективности или высокой токсичности. Большинство поликатионных векторов, описанных ранее, обладают высокой плотностью заряда, что

считается основным требованием для эффективной конденсации ДНК. В результате они способны доставлять гены с высокой эффективностью *in vitro*, но ограничены для применения *in vivo* за счет токсичности, связанной с чрезмерной плотностью заряда.

Описаны высокомолекулярные полимеры, в частности, терполимеры, и способы их получения с использованием катализируемой ферментами сополимеризации лактона с диалкиловым диэфиром и аминдиолом. Эти тройные сополимеры полиамина и сложного эфира имеют низкую плотность заряда. Кроме того, их гидрофобность можно варьировать, выбирая лактоновый сомономер с определенным размером кольца и регулируя содержание лактона в полимерах. Высокая молекулярная масса и повышенная гидрофобность терполимеров лактон-диэфир-аминодиол компенсируют низкую плотность заряда, обеспечивая эффективную доставку генов с минимальной токсичностью.

В предпочтительных вариантах осуществления терполимеры демонстрируют эффективную доставку генов с пониженной токсичностью. Терполимеры могут быть значительно эффективнее коммерчески доступных невирусных векторов. Например, терполимеры могут быть более чем в 100 раз эффективнее коммерчески доступных невирусных векторов, таких как PEI и LIPOFECTAMINE® 2000, по данным анализа экспрессии люциферазы, проявляя при этом минимальную токсичность в дозах до 0,5 мг/мл по сравнению с этими коммерчески доступными невирусными векторами. Предпочтительно терполимер нетоксичен в концентрациях, подходящих для трансфекции нуклеиновых кислот как *in vitro*, так и *in vivo*. Например, в некоторых вариантах осуществления терполимеры вызывают меньшую неспецифическую гибель клеток по сравнению с другими подходами трансфекции клеток.

Как более подробно описано ниже, в некоторых вариантах осуществления терполимер представляет собой терполимер ω -пентадекалактон-диэтилсебацинат-N-метилдиэтанолламин, содержащий 20% PDL (также называемый терполимером III-20% PDL).

IV. Мицеллы, образованные из полимеров

A. Свойства мицелл

1. Размер мицелл

Полимеры, такие как ПЭГ-содержащие блок-сополимеры, можно использовать для получения мицелл. Средний размер мицелл обычно находится в диапазоне примерно от 100 до примерно 500 нм, предпочтительно примерно от 100 до примерно 400 нм, более предпочтительно примерно от 100 до примерно 300 нм, более предпочтительно примерно от 150 до примерно 200 нм, наиболее предпочтительно примерно от 150 до примерно 200 нм, примерно от 160 до примерно 190 нм, которые были стабильны при физиологическом значении pH 7,4 в присутствии белков сыворотки. Сополимеры обладают высокой совместимостью с кровью и проявляют минимальную активность в индукции гемолиза и агглютинации.

2. Поверхностный заряд

Было обнаружено, что размер и дзета-потенциал мицелл значительно изменяются

при изменении pH водной среды, содержащей мицеллы. Например, тренды кривых зависимости размер-pH и дзета-pH удивительно схожи для мицелл трех сополимеров PEG2K-PPMS с разным содержанием PDL (11%, 30% и 51%). Очевидно, что средний размер образцов мицелл постепенно увеличивается при снижении pH среды от 7,4 до 5,0, и затем остается практически постоянным при значении pH ниже 5,0. Такое поведение мицелл в зависимости от pH ожидается при снижении pH с 7,4 до 5,0, ядра мицелл из PPMS становятся протонированными и более гидрофильными, при этом поглощая больше молекул воды из водной среды, вызывая набухание мицелл. Ядра мицелл полностью протонированы уже при pH 5,0, в результате чего размеры мицелл остаются достаточно постоянными при дальнейшем снижении pH от 5,0. Влияние содержания PDL в сополимерах PEG2K-PPMS на величину изменения размера мицелл между значениями pH 7,4 и 5,0 также является существенным. Ожидается, что с уменьшением содержания PDL и увеличением содержания третичных аминогрупп в сополимере будет увеличиваться способность ядер мицелл поглощать протоны и молекулы воды. Так, при снижении pH с 7,4 до 5,0 изменение среднего размера мицелл было более значительным для PEG2K-PPMS-11%PDL (от 200 нм до 234 нм) по сравнению с PEG2K-PPMS-30%PDL (от 184 нм до 214 нм) и PEG2K-PPMS-51%PDL (от 163 до 182 нм) (фиг. 5А).

Дзета-потенциал мицелл в водной среде также существенно зависит от pH. При физиологическом и щелочном pH (от 7,4 до 8,5) поверхностный заряд пустых мицелл сополимера PEG2K-PPMS был отрицательным, который менялся на положительный при снижении pH среды до кислой области (4,0-6,0). Например, мицеллы PEG2K-PPMS-11%PDL, PEG2K-PPMS-30%PDL и PEG2K-PPMS-51%PDL имели значения дзета-потенциала -5,8, -7,1, -5,1 мВ соответственно при pH 7,4, которые превращались в +7,6, +5,8, +4,0 мВ соответственно при более низком pH 5,0. На основе вышеприведенных рассуждений эта зависимость поверхностного заряда от pH может быть связана с протонированием или депротонированием PPMS ядер мицелл при различных pH среды. При щелочном pH (7,4-8,5) большая часть аминогрупп в мицеллах, по-видимому, не протонирована, и частицы мицелл остаются отрицательно заряженными за счет поглощения мицеллами анионов HPO_4^{2-} и/или H_2PO_4^- в PBS. В частности, при pH 8,5 значения дзета-потенциала составляли -8,1 мВ, -7,9 мВ, -9,0 мВ для PEG2K-PPMS-11%PDL, PEG2K-PPMS-30%PDL и PEG2K-PPMS-51%PDL, соответственно. При снижении pH с 7,4 до 5,0 третичные аминогруппы в PPMS ядрах мицелл становятся в основном протонированными, превращая мицеллы в положительно заряженные частицы. Следовательно, среди трех образцов мицелл мицеллы PEG2K-PPMS-11%PDL с наиболее высокой способностью поглощать протоны демонстрировали самые высокие значения дзета-потенциала при pH 4,0-5,0, тогда как мицеллы PEG2K-PPMS-51%PDL с наименьшей способностью к протонированию показали самые низкие значения дзета-потенциалы. Наблюдаемые ответные реакции поверхностного заряда мицелл на pH среды весьма желательны, поскольку отрицательный поверхностный заряд мицелл при физиологическом pH может облегчить взаимодействие мицелл с сывороточным белком в крови и увеличить

время их циркуляции *in vivo*. С другой стороны, изменение положительного поверхностного заряда при внеклеточном pH опухоли, равном примерно 6,5, может усилить поглощение этих мицелл опухолевыми клетками-мишенями.

Поверхностный заряд частиц/мицелл был слегка отрицательным в растворе PBS (0,01 M, pH=7,4), что выгодно для применения мицелл для доставки лекарственных средств *in vivo*. Известно, что наночастицы с почти нейтральным поверхностным зарядом (дзета-потенциал от -10 до +10 мВ) могут уменьшать их поглощение ретикулоэндотелиальной системой (RES) и пролонгировать время их циркуляции в крови. Отрицательные поверхностные заряды мицелл могут быть результатом поглощения анионов HPO_4^{2-} и/или H_2PO_4^- в PBS частицами мицелл за счет взаимодействия водородных связей между анионами и эфирными группами ПЭГ оболочек или аминогруппами ядер PPMS. Полагается, что для мицелл из амфифильного блок-сополимера гидрофильные сегменты цепи (например, ПЭГ) во внешней оболочке мицеллы могут экранировать заряды в ядре мицелл, при этом блоки с длинной цепью более эффективно снижают дзета-потенциал, чем блоки с короткой цепью. Таким образом, для мицелл сополимера ПЭГ5К-ППМС наблюдались значительно более низкие значения дзета-потенциала по сравнению с мицеллами сополимера PEG2K-PPMS.

Мицеллы сополимера чувствительны к pH: при снижении pH среды с 7,4 до 5,0 размеры мицелл значительно увеличиваются, в то время как заряды поверхности мицелл меняются с отрицательных на положительные. Следовательно, мицеллы сополимера с инкапсулированным DTX, демонстрировали постепенное устойчивое высвобождение лекарственного средства при pH 7,4, но значительно ускорили высвобождение DTX при кислом pH 5,0. Это явление можно использовать для улучшения высвобождения агентов в месте опухоли, поскольку известно, что микросреда опухоли обычно слабокислая (например, 5,7-7,0) в результате накопления молочной кислоты в результате плохой перфузии кислорода. Напротив, внеклеточный pH нормальной ткани и крови слегка щелочной (pH 7,2-7,4). Таким образом, ожидается повышенная эффективность доставки лекарственного средства для мицелл, нагруженных противоопухолевым лекарственным средством, которые реагируют на pH и могут запускаться кислым pH для ускорения высвобождения лекарственного средства. Кроме того, еще более кислые условия (pH=4,0-6,0) встречаются в эндосомах и лизосомах после поглощения мицелл опухолевыми клетками через пути эндоцитоза, что может еще больше увеличить цитотоксичность мицелл с инкапсулированным лекарственным средством.

V. Терапевтические, профилактические и диагностические средства

Полимеры могут образовывать различные полимерные композиции, которые можно использовать для получения различных биodeградируемых медицинских устройств и для доставки лекарственных средств. Устройства, изготовленные из PNA сополимеров, могут найти широкое применение в различных медицинских целях. Примеры таких применений включают контролируемое высвобождение терапевтических, профилактических или диагностических средств; доставке лекарственных средств; каркасы для тканевой

инженерии; инкапсуляция клеток; адресная доставка; биосовместимые покрытия; биосовместимые имплантаты; направленная регенерация тканей; раневые повязки; ортопедические приспособления; протезы и костные цементы (включая адгезивы и/или структурные наполнители); и диагностические средства.

Полимеры можно использовать для инкапсулирования, смешивания или ионного или ковалентного связывания с любым из множества терапевтических, профилактических или диагностических средств. Широкий спектр биологически активных материалов может быть инкапсулирован или включен либо для доставки к месту действия с помощью полимера, либо для придания полимеру свойств, таких как биоадгезия, прикрепление к клеткам, усиление роста клеток, ингибирование роста бактерий и предотвращение образования тромба.

Примеры подходящих терапевтических и профилактических средств включают синтетические неорганические и органические соединения, белки и пептиды, полисахариды и другие сахара, липиды и нуклеиновокислотные последовательности ДНК и РНК, обладающие терапевтической, профилактической или диагностической активностью. Последовательности нуклеиновой кислоты включают гены, антисмысловые молекулы, которые связываются с комплементарной ДНК для ингибирования транскрипции, и рибозимы. Соединения с широким диапазоном молекулярной массы могут быть инкапсулированы, например, от 100 до 500000 г или более на моль. Примеры подходящих веществ включают белки, такие как антитела, лиганды рецепторов и ферменты, пептиды, такие как пептиды адгезии, сахараиды и полисахариды, синтетические органические или неорганические лекарственные средства и нуклеиновые кислоты. Примеры веществ, которые могут быть инкапсулированы, включают ферменты, факторы свертывания крови, ингибиторы или агенты, растворяющие тромб, такие как стрептокиназа и тканевой активатор плазминогена; антигены для иммунизации; гормоны и факторы роста; полисахариды, такие как гепарин; олигонуклеотиды, такие как антисмысловые олигонуклеотиды и рибозимы, и ретровирусные векторы для применения в генной терапии. Полимер также можно использовать для инкапсуляции клеток и тканей. Репрезентативными диагностическими агентами являются агенты, детектируемые с помощью рентгеновских лучей, флуоресценции, магнитно-резонансной томографии, радиоактивности, ультразвука, компьютерной томографии (КТ) и позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ). Ультразвуковые диагностические агенты обычно представляют собой газ, такой как воздух, кислород или перфторуглероды. В предпочтительном варианте полимеры используют для доставки нуклеиновых кислот.

А. Полинуклеотиды

Как более подробно обсуждается ниже, терполимеры можно использовать для трансфекции клеток нуклеиновыми кислотами. Следовательно, также обеспечиваются полиплексы, включающие терполимеры и один или более полинуклеотидов.

Полинуклеотид может кодировать один или более белков, функциональных нуклеиновых кислот или их комбинации. Полинуклеотид может быть моноцистронным или

полицистронным. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид является мультигенным.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид трансфектируется в клетку и остается внехромосомным. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид вводят в клетку-хозяина и интегрируют в геном клетки-хозяина. Как более подробно обсуждается ниже, композиции могут быть использованы в методах генной терапии. Методы генной терапии могут включать введение в клетку полинуклеотида, изменяющего генотип клетки. Введение полинуклеотида может скорректировать, заместить или иным образом изменить эндогенный ген посредством генетической рекомбинации. Способы могут включать введение полной замещающей копии дефектного гена, гетерологичного гена или небольшой молекулы нуклеиновой кислоты, такой как олигонуклеотид. Например, корректирующий ген может быть введен в неспецифическое положение в геноме хозяина.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включен в вектор или является его частью. Способы конструирования экспрессионных векторов, содержащих генетические последовательности и соответствующие элементы контроля транскрипции и трансляции, хорошо известны в данной области. Эти методы включают методы рекомбинантной ДНК *in vitro*, синтетические методы и генетическую рекомбинацию *in vivo*. Экспрессионные векторы обычно содержат регуляторные последовательности и необходимые элементы для трансляции и/или транскрипции вставленной кодирующей последовательности, которая может быть, например, представляющим интерес полинуклеотидом. Кодирующая последовательность может быть операбельно связана с промотором и/или энхансером, чтобы помочь контролировать экспрессию желаемого генного продукта. Промоторы, используемые в биотехнологии, бывают разных типов в зависимости от предполагаемого типа контроля экспрессии генов. Обычно их можно разделить на конститутивные промоторы, тканеспецифические промоторы или промоторы, специфичные для стадии развития, индуцибельные промоторы и синтетические промоторы.

Например, в некоторых вариантах осуществления представляющий интерес полинуклеотид операбельно связан с промотором или другими регуляторными элементами, известными в данной области. Таким образом, полинуклеотид может представлять собой вектор, такой как экспрессионный вектор. Конструирование полинуклеотидов для экспрессии в прокариотической или эукариотической системе может быть осуществлено способами, обычно известными специалистам в области рекомбинантной экспрессии. Экспрессионный вектор обычно содержит одну из композиций под контролем одного или более промоторов. Чтобы поставить кодирующую последовательность «под контроль» промотора, 5'-конец сайта инициации трансляции рамки считывания обычно располагают между 1 и 50 нуклеотидами «даунстрим» (т.е. от 3'-конца) от выбранного промотора. Промотор «апстрим» стимулирует транскрипцию встроенной ДНК и способствует экспрессии кодированного рекомбинантного белка. Это представляет собой значение термина «рекомбинантная экспрессия» в используемом здесь контексте.

Доступны многие стандартные методики для конструирования экспрессионных векторов, содержащих соответствующие нуклеиновые кислоты и последовательности контроля транскрипции/трансляции, для достижения экспрессии белка или пептида в различных системах экспрессия-хозяин. Типы клеток, доступные для экспрессии, включают, не ограничиваясь этим, бактерии, такие как *E.coli* и *B.subtilis*, трансформированные экспрессионными векторами рекомбинантной фаговой ДНК, плазмидной ДНК или космидной ДНК. Следует понимать, что любой из этих векторов может быть упакован и доставлен с использованием полимеров.

Экспрессионные векторы для применения в клетках млекопитающих обычно включают ориджин репликации (при необходимости), промотор, расположенный перед экспрессируемым геном, наряду с любыми необходимыми сайтами связывания рибосом, сайтами сплайсинга РНК, сайтом полиаденилирования и последовательностями терминатора транскрипции. Ориджин репликации может быть обеспечен либо посредством конструирования вектора, включающего экзогенный ориджин, такой может быть получен из SV40 или другого вирусного источника (например, полиомавируса, аденовируса, VSV, BPV), либо может быть обеспечен клеткой-хозяином посредством хромосомного механизма репликации. Если вектор интегрирован в хромосому клетки-хозяина, то последней часто бывает достаточно.

Промоторы могут происходить из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотioneина) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; промотор 7,5К вируса коровьей оспы). Кроме того, также возможно и желательно использовать промоторные или контрольные последовательности, обычно связанные с желаемой генной последовательностью, при условии, что такие контрольные последовательности совместимы с системами клеток-хозяев.

Можно использовать ряд экспрессионных систем на основе вирусов, например, обычно используемые промоторы получают из полиомавируса, аденовируса 2, цитомегаловируса и обезьяньего вируса 40 (SV40). Используются ранний и поздний промоторы вируса SV40, поскольку оба можно легко получить из вируса в виде фрагмента, который также содержит ориджин репликации вируса SV40. Также могут быть использованы более мелкие или более крупные фрагменты SV40, при условии, что они включают последовательность примерно 250 п.н., простирающуюся от сайта HindIII к сайту BglI, расположенному в вирусном ориджине репликации.

В случаях, когда в качестве экспрессионного вектора используется аденовирус, то кодирующие последовательности могут быть лигированы с комплексом контроля транскрипции/трансляции аденовируса, например, с поздним промотором и трехчастной лидерной последовательностью. Затем этот химерный ген может быть встроен в геном аденовируса посредством рекомбинации *in vitro* или *in vivo*. Вставка в неэссенциальную область вирусного генома (например, область E1 или E3) приведет к получению жизнеспособного рекомбинантного вируса, способного экспрессировать белки в инфицированных хозяевах.

Для эффективной трансляции композиций также могут потребоваться специфические иницирующие сигналы. Эти сигналы включают иницирующий кодон ATG и соседние последовательности. Дополнительно могут потребоваться экзогенные сигналы контроля трансляции, включая кодон инициации ATG. Специалист в данной области легко сможет определить эту потребность и обеспечить необходимые сигналы. Хорошо известно, что иницирующий кодон должен находиться в рамке считывания (или в фазе) с рамкой считывания желаемой кодирующей последовательности, чтобы гарантировать трансляцию всей вставки. Эти экзогенные сигналы контроля трансляции и кодоны инициации могут иметь различное происхождение, как естественное, так и синтетическое. Эффективность экспрессии может быть повышена за счет включения соответствующих элементов-энхансеров транскрипции или терминаторов транскрипции.

При эукариотической экспрессии также обычно желательно включить в транскрипционную единицу соответствующий сайт полиаденилирования, если он не содержится в исходном клонированном сегменте. Как правило, сайт добавления поли-А расположен примерно на 30-2000 нуклеотидов «даунстрим» от сайта терминации белка в положении, предшествующем терминации транскрипции.

Для долгосрочной высокопродуктивной продукции рекомбинантных белков предпочтительна стабильная экспрессия. Например, могут быть сконструированы клеточные линии, которые стабильно экспрессируют конструкции, кодирующие белки. Вместо использования экспрессионных векторов, которые содержат вирусные ориджины репликации, клетки-хозяева можно трансформировать векторами, контролируруемыми соответствующими элементами контроля экспрессии (например, промотором, энхансером, последовательностями, терминаторами транскрипции, сайтами полиаденилирования и т. д.) и селективируемым маркером. После введения чужеродной ДНК сконструированным клеткам можно дать возможность расти в течение 1-2 суток в обогащенной среде, и затем перевести их на селективную среду. Селективируемый маркер в рекомбинантной плазмиде придает устойчивость к селекции и позволяет клеткам стабильно интегрировать плазмиду в их хромосомы и расти с образованием фокусов, которые, в свою очередь, могут быть клонированы и размножены в клеточные линии.

В предпочтительных вариантах осуществления полинуклеотидный груз представляет собой РНК, такую как мРНК. мРНК может кодировать представляющий интерес полипептид.

В некоторых вариантах осуществления мРНК имеет кэп на 5'-конце и/или 3'-поли(А)-хвост, который может модулировать связывание рибосомы, инициацию трансляции и стабильность мРНК в клетке.

В. Представляющий интерес полипептид

Полинуклеотид может кодировать один или более представляющих интерес полипептидов. Полипептид может быть любым полипептидом. Например, полипептид, закодированный полинуклеотидом, может представлять собой полипептид, оказывающий терапевтическое или профилактическое действие на организм, или который можно

использовать для диагностики заболевания или расстройства в организме. Например, для лечения рака, аутоиммунных заболеваний, паразитарных, вирусных, бактериальных, грибковых или других инфекций полинуклеотид(ы), предназначенный для экспрессии, может кодировать полипептид, который функционирует в качестве лиганда или рецептора для клеток иммунной системы, или может стимулировать или ингибировать иммунную систему организма. Как обсуждается в приведенном ниже примере, полинуклеотид, кодирующий TNF-связанный апоптоз-индуцирующий лиганд, может быть доставлен в опухолевые клетки с использованием полиплексов в способе лечения рака.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид дополняет или заменяет полинуклеотид, который является дефектным в организме.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает селективируемый маркер, например селективируемый маркер, который эффективен в эукариотической клетке, такой как маркер селекции лекарственной устойчивости. Такой селективный маркерный ген может кодировать фактор, необходимый для выживания или роста трансформированных клеток-хозяев, выращенных в селективной культуральной среде. Типичные селективные гены кодируют белки, которые придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату, канамицину, гентамицину, зооцину или тетрациклину, восполняют дефицит ауксотрофов или поставляют важные питательные вещества, отсутствующие в среде.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает репортерный ген. Гены-репортеры обычно представляют собой гены, которые отсутствуют или не экспрессируются в клетке-хозяине. Репортерный ген обычно кодирует белок, который обеспечивает некоторое фенотипическое изменение или ферментативное свойство. Примеры таких генов приведены в публикации Weising et al., *Ann. Rev. Genetics*, 22, 421 (1988). Предпочтительные репортерные гены включают ген глюкоксидазы (GUS) и гены GFP.

С. Функциональные нуклеиновые кислоты

Полинуклеотид может представлять собой или может кодировать функциональную нуклеиновую кислоту. Функциональные нуклеиновые кислоты представляют собой молекулы нуклеиновой кислоты, выполняющие определенную функцию, например, связывание с молекулой-мишенью или катализ определенной реакции. Функциональные молекулы нуклеиновой кислоты можно разделить на следующие неограничивающие категории: антисмысловые молекулы, миРНК, аптамеры, рибозимы, молекулы, образующие триплекс, РНКи и внешние направляющие последовательности. Молекулы функциональных нуклеиновых кислот могут функционировать в качестве эффекторов, ингибиторов, модуляторов и стимуляторов специфической активности, которыми обладает молекула-мишень, или молекулы функциональных нуклеиновых кислот могут обладать активностью *de novo*, независимой от каких-либо других молекул.

Молекулы функциональных нуклеиновых кислот могут взаимодействовать с любой макромолекулой, такой как ДНК, РНК, полипептиды или углеводные цепи. Таким образом,

функциональные нуклеиновые кислоты могут взаимодействовать с мРНК или геномной ДНК полипептида-мишени или они могут взаимодействовать с самим полипептидом. Функциональные нуклеиновые кислоты часто конструируют для взаимодействия с другими нуклеиновыми кислотами на основе гомологии последовательностей между молекулой-мишенью и молекулой функциональной нуклеиновой кислоты. В других ситуациях специфическое распознавание между молекулой функциональной нуклеиновой кислоты и молекулой-мишенью основано не на гомологии последовательностей между молекулой функциональной нуклеиновой кислоты и молекулой-мишенью, а скорее основано на формировании третичной структуры, которая позволяет осуществлять специфическое распознавание.

Антисмысловые молекулы сконструированы для взаимодействия с молекулой нуклеиновой кислоты-мишени посредством либо канонического, либо неканонического спаривания оснований. Взаимодействие антисмысловой молекулы и молекулы-мишени предназначено для способствования разрушению молекулы-мишени, например, посредством дегградации гибрида РНК-ДНК, опосредованной РНКазой. Альтернативно, антисмысловая молекула сконструирована для прерывания функции процессинга, которая обычно имеет место на молекуле-мишене, такой как транскрипция или репликация. Антисмысловые молекулы могут быть сконструированы на основе последовательности молекулы-мишени. Существует множество методов оптимизации антисмысловой эффективности посредством нахождения наиболее доступных участков молекулы-мишени. Иллюстративные способы включают эксперименты по селекции *in vitro* и исследованиям модификации ДНК с использованием DMS и DEPC. Предпочтительно, чтобы антисмысловые молекулы связывались с молекулой-мишенью с константой диссоциации (K_d), ниже или равной 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} или 10^{-12} .

Аптамеры представляют собой молекулы, которые взаимодействуют с молекулой-мишенью предпочтительно специфическим образом. Обычно аптамеры представляют собой небольшие нуклеиновые кислоты длиной от 15 до 50 оснований, которые сворачиваются в определенные вторичные и третичные структуры, такие как стебель-петля или G-квартет. Аптамеры могут связываться с небольшими молекулами, такими как АТФ и теофиллин, а также большими молекулами, такими как обратная транскриптаза и тромбин. Аптамеры могут очень прочно связываться с молекулой-мишенью с K_d ниже 10^{-12} М. Предпочтительно, чтобы аптамеры связывались с молекулой-мишенью с K_d ниже 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} или 10^{-12} . Аптамеры могут связываться с молекулой-мишенью с очень высокой степенью специфичности. Например, были выделены аптамеры, которые имеют более чем 10000-кратную разницу в аффинности связывания между молекулой-мишенью и другой молекулой, которые отличаются только по одному положению в молекуле. Предпочтительно, чтобы аптамер имел K_d с молекулой-мишенью по меньшей мере в 10, 100, 1000, 10000 или 100000 раз ниже, чем K_d с фоновой связывающей молекулой. Предпочтительно при сравнении молекулы, такой как полипептид, чтобы фоновая молекула представляла собой другой полипептид.

Рибозимы представляют собой молекулы нуклеиновой кислоты, которые способны катализировать химическую реакцию как внутримолекулярно, так и межмолекулярно. Предпочтительно, чтобы рибозимы катализировали межмолекулярные реакции. Существует ряд различных типов рибозимов, которые катализируют реакции нуклеазного типа или полимеразы нуклеиновой кислоты, которые основаны на рибозимах, обнаруженных в природных системах, таких как рибозимы типа «головка молотка». Существует также ряд рибозимов, которые обнаружены в природных системах, но которые были сконструированы для катализа специфических реакций *de novo*. Предпочтительные рибозимы расщепляют субстраты РНК или ДНК и более предпочтительно расщепляют субстраты РНК. Рибозимы обычно расщепляют субстраты нуклеиновых кислот посредством узнавания и связывания субстрата-мишени с последующим расщеплением. Такое распознавание часто основано в основном на канонических или неканонических взаимодействиях пар оснований. Это свойство делает рибозимы особенно хорошими кандидатами для специфического расщепления нуклеиновых кислот, поскольку распознавание субстрата-мишени основано на последовательности субстрата-мишени.

Функциональные триплекс-образующие молекулы нуклеиновой кислоты представляют собой молекулы, которые могут взаимодействовать как с двухцепочечной, так и с одноцепочечной нуклеиновой кислотой. Когда триплексные молекулы взаимодействуют с областью-мишенью, то образуется структура, называемая триплексом, в которой три цепи ДНК образуют комплекс, зависящий как от спаривания оснований по Уотсона-Крику, так и спаривания по Хугстину. Молекулы триплекса являются предпочтительными, поскольку они могут связываться с областями-мишенями с высокой аффинностью и специфичностью. Предпочтительно, чтобы молекулы, образующие триплекс, связывались с молекулой-мишенью с K_d ниже 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} или 10^{-12} .

Внешние направляющие последовательности (EGS) представляют собой молекулы, которые связываются с молекулой-мишенью нуклеиновой кислоты с образованием комплекса, который распознается РНКазой Р с последующим расщеплением молекулы-мишени. EGS можно сконструировать специфически для выбранной молекулы-мишени РНК. РНКазы Р помогают в процессинге транспортной РНК (тРНК) внутри клетки. Бактериальную РНКазу Р можно привлечь для расщепления практически любой последовательности РНК при помощи EGS, которая образует комплекс РНК-мишень:EGS, чтобы имитировать природный тРНК-субстрат. Аналогично, можно использовать эукариотическое EGS/РНКазное Р-направленное расщепление РНК для расщепления желаемых мишеней внутри эукариотических клеток. Репрезентативные примеры того, как получать и применять молекулы EGS для облегчения расщепления ряда различных молекул-мишеней, известны в данной области.

Экспрессия генов также может эффективно подвергаться сайленсингу высокоспецифическим образом посредством РНК-интерференции (РНКи). Такой сайленсинг первоначально наблюдали при добавлении двухцепочечной РНК (дцРНК) (Fire et al. (1998) *Nature*, 391:806-11; Napoli et al. (1990) *Plant Cell*, 2:279-89; Hannon, (2002) *Nature*,

418:244-51). Как только дцРНК попадает в клетку, она расщепляется ферментом, подобным РНКазе III, Dicer, с образованием двухцепочечных малых интерферирующих РНК (миРНК) длиной 21-23 нуклеотида, которые содержат 2 нуклеотидных выступа на 3'-концах (Elbashir et al. (2001) *Genes Dev.*, 15:188-200; Bernstein et al. (2001) *Nature*, 409:363-6; Hammond et al. (2000) *Nature*, 404:293-6). На АТФ-зависимой стадии миРНК интегрируются в мультисубъединичный белковый комплекс, широко известный как РНК-индуцированный сайленсинговый комплекс (RISC), который направляет миРНК к последовательности РНК-мишени (Nykanen et al. (2001) *Cell*, 107:309-21). На какой-то точке дуплекс миРНК раскручивается, и оказывается, что антисмысловая цепь остается связанной с RISC и направляет деградацию комплементарной последовательности мРНК комбинацией эндо- и экзонуклеаз (Martinez et al. (2002) *Cell*, 110:563-74). Однако эффект иРНК или миРНК или их применения не ограничиваются каким-либо типом механизма.

Малая интерферирующая РНК (миРНК) представляет собой двухцепочечную РНК, которая может индуцировать последовательность-специфический посттранскрипционный сайленсинг генов, тем самым снижая или даже ингибируя экспрессию генов. В одном примере миРНК «запускает» специфическую деградацию гомологичных молекул РНК, таких как мРНК, в области идентичности последовательностей как миРНК, так и РНК-мишени. Например, в WO 02/44321 описаны миРНК, способные к последовательность-специфической деградации мРНК-мишеней при спаривании оснований с 3'-концевыми выступами, включенной в настоящее описание в качестве ссылки для способа получения этих миРНК. Последовательность-специфический сайленсинг генов может быть достигнут в клетках млекопитающих, с использованием синтетических коротких двухцепочечных РНК, которые имитируют миРНК, продуцированные под действием фермента Dicer (Elbashir et al. (2001) *Nature*, 411:494-498; Ui-Tei et al. (2000) *FEBS Lett.*, 479:79-82). миРНК может быть синтезирована химическим путем или *in vitro*, или происходить от коротких двухцепочечных шпилечных РНК (кшРНК), которые процессируются в миРНК внутри клетки. Синтетические миРНК обычно конструируют с использованием алгоритмов и обычного синтезатора ДНК/РНК. Поставщики включают Ambion (Austin, Texas), ChemGenes (Ashland, Massachusetts), Dharmacon (Lafayette, Colorado), Glen Research (Sterling, Virginia), MWB Biotech (Esbersberg, Germany), Proligo (Boulder, Colorado) и Qiagen (Vento, The Netherlands). миРНК также можно синтезировать *in vitro* с использованием таких наборов, как Ambion SILENCER® siRNA Construction.

Продукция миРНК из вектора чаще всего осуществляется посредством транскрипции короткой шпилечной РНК (кшРНК). Доступны наборы для получения векторов, содержащих кшРНК, например, такие как наборы Imgenex GENESUPPRESSOR™ и плазмидные и лентивирусные векторы Invitrogen BLOCK-IT™, индуцируемые РНКи.

Композиции полинуклеотидов

Полинуклеотид может представлять собой ДНК- или РНК- нуклеотиды, которые обычно включают гетероциклическое основание (азотистое основание), сахарную группу, присоединенную к гетероциклическому основанию, и фосфатную группу, которая

этерифицирует гидроксильную функцию сахарной группы. Основные встречающиеся в природе нуклеотиды включают урацил, тимин, цитозин, аденин и гуанин в качестве гетероциклических оснований, а также рибозу или дезоксирибозу, связанные фосфодиэфирными связями.

Полинуклеотид может состоять из аналогов нуклеотидов, которые были химически модифицированы для повышения стабильности, периода полураспада или специфичности или аффинности к целевой последовательности по сравнению с аналогом ДНК или РНК. Химические модификации включают химическую модификацию азотистых оснований, остатков сахаров, нуклеотидных связей или их комбинаций. В рамках настоящего изобретения, термин «модифицированный нуклеотид» или «химически модифицированный нуклеотид» означает нуклеотид, который имеет химическую модификацию одного или более составляющих компонентов, гетероциклического основания, сахарной группы или фосфатной группы. В некоторых вариантах осуществления заряд модифицированного нуклеотида снижен по сравнению с ДНК- или РНК- олигонуклеотидами с той же последовательностью азотистых оснований. Например, олигонуклеотид может иметь низкий отрицательный заряд, не иметь заряда или иметь положительный заряд. Модификации не должны препятствовать, а предпочтительно усиливать способность олигонуклеотидов проникать в клетку и выполнять такую функцию, как ингибирование экспрессии генов, как обсуждалось выше.

Как правило, в аналогах нуклеозидов сохраняются основания, способные образовывать водородные связи посредством спаривания оснований по Уотсона-Крику со обычными полинуклеотидными основаниями, где остов аналога презентует основания таким образом, чтобы сделать возможным образование таких водородных связей последовательность-специфическим образом между молекулой аналога олигонуклеотида и основаниями в обычном полинуклеотиде (например, одноцепочечная РНК или одноцепочечная ДНК). Предпочтительными аналогами являются такие, которые имеют по существу незаряженный, фосфор-содержащий остов.

Как более подробно обсуждается ниже, в одном предпочтительном варианте осуществления олигонуклеотид представляет собой морфолино-олигонуклеотид.

1. Гетероциклические основания

Основные встречающиеся в природе нуклеотиды включают урацил, тимин, цитозин, аденин и гуанин в качестве гетероциклических оснований. Олигонуклеотиды могут включать химические модификации их азотистых оснований. Химические модификации гетероциклических оснований или аналогов гетероциклических оснований могут быть эффективными для повышения аффинности связывания или стабильности при связывании с последовательностью-мишенью. Химически модифицированные гетероциклические основания включают, не ограничиваясь этим, инозин, 5-(1-пропинил)урацил (pU), 5-(1-пропинил)цитозин (pC), 5-метилцитозин, 8-оксоаденин, псевдоцитозин, псевдоизоцитозин, 5- и 2-амино-5-(2'-дезокси-D-рибофуранозил)пиримидин (2-аминопиримидин) и различные производные пирроло- и пиазолопиримидина.

2. Модификации сахара

Полинуклеотиды также могут содержать нуклеотиды с модифицированными остатками сахара или аналогами остатка сахара. Модификации сахарной группы включают, не ограничиваясь этим, 2'-О-аминоэтокси, 2'-О-амониоэтил (2'-ОАЕ), 2'-О-метокси, 2'-О-метил, 2-гуанидоэтил (2'-ОАЕ), 2'-О,4'-С-метилен (LNA), 2'-О-(метоксиэтил) (2'-ОМЕ) и 2'-О-(N-(метил)ацетамидо) (2'-ОМА). 2'-О-аминоэтил-замещения группы сахара особенно предпочтительны, поскольку они протонируются при нейтральном pH и, таким образом, подавляют отталкивание зарядов между TFO и дуплексом-мишенью. Такая модификация стабилизирует С3'-эндо-конформацию рибозы или дезоксирибозы, а также образует мостик с i-1 фосфатом в пуриновой цепи дуплекса.

Полинуклеотид может представлять собой морфолино-олигонуклеотид. Морфолино-олигонуклеотиды, как правило, состоят еще из двух или более морфолино-мономеров, содержащих группы спаривания пуриновых или пиримидиновых оснований, эффективные для связывания за счет специфичных для оснований водородных связей с основанием в полинуклеотиде, которые связаны друг с другом фосфорсодержащими связями, состоящими из одного-трех атомов длиной, соединяющими азот морфолино одного мономера с 5'-экзоциклическим углеродом соседнего мономера. Пуриновая или пиримидиновая группа, образующая пару оснований, обычно представляет собой аденин, цитозин, гуанин, урацил или тимин. Синтез, структуры и характеристики связывания олигомеров морфолино подробно описаны в патентах США № 5698685, 5217866, 5142047, 5034506, 5166315, 5521063 и 5506337.

Важные свойства субъединиц на основе морфолино обычно включают: способность связываться в олигомерной форме стабильными, незаряженными связями остова; способность сохранять азотистое основание (например, аденин, цитозин, гуанин, тимидин, урацил или инозин), так что образующийся полимер может гибридизоваться с комплементарной нуклеиновой кислотой-мишенью, включая РНК-мишень, с высокой T_m , даже с такими короткими олигомерами как 10^{14} оснований; способность олигомера активно транспортироваться в клетки млекопитающих; и способность гетеродуплекса олигомер:РНК сохранять устойчивость к расщеплению РНКазой. В некоторых вариантах осуществления в олигонуклеотидах используются субъединицы на основе морфолино, несущие группы спаривания оснований, соединенные незаряженными связями.

3. Межнуклеотидные связи

Межнуклеотидная связь относится к химической связи между двумя нуклеозидными группами. Модификации фосфатного остова ДНК- или РНК-олигонуклеотидов могут повышать аффинность связывания или стабильность полинуклеотидов или снижать чувствительность полинуклеотидов к расщеплению нуклеазами. Катионные модификации, включая, не ограничиваясь этим, диэтилэтилендиамид (DEED) или диметиламинопропиламин (DMAP) могут быть особенно пригодными за счет уменьшения электростатического отталкивания между олигонуклеотидом и мишенью. Модификации фосфатного остова могут также включать замену атома серы на один из немостиковых

атомов кислорода в фосфодиэфирной связи. Такая замена создает фосфоротиоатную межнуклеозидную связь вместо фосфодиэфирной связи. Показано, что олигонуклеотиды, содержащие фосфоротиоатные межнуклеозидные связи, более стабильны *in vivo*.

Примеры модифицированных нуклеотидов со сниженным зарядом включают модифицированные межнуклеотидные связи, такие как аналоги фосфатов, имеющие ахиральные и незаряженные межсубъединичные связи (например, Sterchak et al., *Organic Chem.*, 52:4202, (1987)), незаряженные морфолино-содержащие полимеры, имеющие ахиральные межсубъединичные связи (см., например, патент США № 5034506), как обсуждалось выше. Некоторые аналоги межнуклеотидных связей включают морфолидат, ацеталь и полиамид-связанные гетероциклы.

В еще одном варианте осуществления олигонуклеотиды состоят из заблокированных нуклеиновых кислот. Заблокированные нуклеиновые кислоты (LNA) представляют собой модифицированные нуклеотиды РНК (см., например, Braasch et al., *Chem. Biol.*, 8(1):1-7 (2001)). LNA образуют гибриды с ДНК, которые более стабильны, чем гибриды ДНК/ДНК, и это свойство аналогично гибридам пептидной нуклеиновой кислоты (PNA)/ДНК. Следовательно, LNA можно использовать так же, как и молекулы PNA. В некоторых вариантах осуществления эффективность связывания LNA может быть повышена за счет добавления к ней положительных зарядов. Для получения LNA используются коммерческие синтезаторы нуклеиновых кислот и стандартная химия фосфорамидитов.

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды состоят из пептидных нуклеиновых кислот. Пептидные нуклеиновые кислоты (PNA) представляют собой синтетические миметики ДНК, в которых фосфатный остов олигонуклеотида полностью заменен повторяющимися единицами N-(2-аминоэтил)-глицина, и фосфодиэфирные связи обычно заменены пептидными связями. Различные гетероциклические основания связаны с остовом метиленкарбонильными связями. PNA сохраняют расстояние между гетероциклическими основаниями, подобное обычным ДНК-олигонуклеотидам, но представляют собой ахиральные и нейтрально заряженные молекулы. Пептидные нуклеиновые кислоты состоят из мономеров пептидных нуклеиновых кислот.

Другие модификации остова включают вариации и модификации пептидов и аминокислот. Таким образом, составляющими компонентами остова олигонуклеотидов, таких как PNA, могут быть пептидные связи или, альтернативно, они могут представлять собой непептидные пептидные связи. Примеры включают ацетильные кэпы, аминокспейсеры, такие как 8-амино-3,6-диоксаоктановая кислота (называемые здесь О-линкерами), аминокислоты, такие как лизин, особенно пригодны, если в PNA желательна наличие положительных зарядов и т.п. Методы химической сборки PNA хорошо известны. См., например, патенты США № 5539082, 5527675, 5623049, 5714331, 5736336, 5773571 и 5786571.

Полинуклеотиды необязательно включают один или более концевых остатков или модификаций на одном или обоих концах для повышения стабильности и/или аффинности

олигонуклеотида к его мишени. Обычно используемые положительно заряженные группы включают аминокислоты лизин и аргинин, хотя другие положительно заряженные группы также могут быть пригодными. Например, остатки лизина и аргинина могут быть добавлены к линкеру бис-PNA или могут быть добавлены к карбокси или N-концу цепи PNA. Полинуклеотиды могут быть дополнительно модифицированы таким образом, чтобы они были кэпированы по концам для предупреждения деградации с использованием 3'-пропиламиногруппы. Процедуры 3'- или 5'-кэпирования олигонуклеотидов хорошо известны в данной области.

VI. Покровные агенты для полиплексов

На эффективность доставки полинуклеотидов с использованием полимеров могут влиять положительные заряды на поверхности полиплекса. Например, дзета-потенциал полиплекса +8,9 мВ может притягивать и связываться с отрицательно заряженными белками плазмы в крови во время циркуляции и приводить к быстрому клиренсу ретикулоэндотелиальной системой (RES). На эффективность также может влиять нестабильность наночастиц полиплекса. Например, как обсуждается в нижеприведенных примерах, частицы полиплекса, инкубированные в буферном растворе NaAc, содержащем 10% сыворотки, почти удваиваются в размере в течение 15 мин и увеличиваются более чем в 10 раз через 75 мин. В результате этого увеличения размера укрупненные полиплексы могут выводиться из кровотока за счет поглощения в печени. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления полиплексы обрабатывают или покрывают для повышения эффективности доставки полинуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления покрытие улучшает клеточно-специфическое нацеливание полиплекса, повышает стабильность (т.е. стабилизирует размер полиплекса *in vivo*), увеличивает время полураспада полиплекса *in vivo* (т.е. в системном кровотоке) или их комбинации из них по сравнению с контролем. В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой полиплекс без покрытия.

Иллюстративным покрытием для полиплекса для нацеливания на опухолевые клетки является polyE-mRGD. В рамках настоящего изобретения, polyE-mRGD относится к синтетическому пептиду, содержащему три сегмента: первый сегмент включает участок полиглутаминовой кислоты (polyE), который отрицательно заряжен при физиологическом значении pH и, следовательно, способен к электростатическому связыванию с положительно заряженной поверхностью полиплексов; второй сегмент включает нейтральный участок полиглицина, который служит нейтральным линкером; и третий сегмент включает последовательность RGD, которая связывает эндотелий опухоли посредством взаимодействия RGD с $\alpha v \beta 3$ и $\alpha v \beta 5$.

Как более подробно обсуждается ниже, polyE-mRGD, использованный в примерах, изменял противоположным образом поверхностный заряд полиплекса III-20% PDL/pLucDNA. Когда polyE-mRGD добавляли при массовом соотношении пептид/ДНК 5:1, то дзета-потенциал полиплекса изменялся с +8,9 мВ до -5,8 мВ. Полиплексы, покрытые пептидом, были стабильными при инкубации в NaAc-буфере, содержащем 10% сыворотки,

и устойчивы к агрегации, указывая на то, что модифицированные полиплексы могут избежать клиренса RES во время циркуляции *in vivo*.

В одном варианте осуществления polyE-mRGD включает последовательность EEEEEEEEEEEEEEGGGGGGRGDK (SEQ ID NO:1) или RGDKGGGGGG EEEEEEEEEEEEE (SEQ ID NO:2) или ее вариант с 85%, 90%, 95% или более 95% идентичностью последовательности SEQ ID NO:1 или 2.

Другое иллюстративное покрытие, которое можно использовать для получения частиц с нейтральным зарядом или отрицательно заряженных частиц, сохраняющих свой размер *in vivo*, описано в публикации Harris et al., *Biomaterials*, 31:998-1006 (2010) и может включать аминокислотную последовательность GGGGGEEEEEEEEEEEEEEEE (SEQ ID NO:3, poly-E), для неспецифического системного введения, или последовательность аминокислот GdPdLGdVdRG-GGGGGG-EEEEEEEEEEEEEEEE-CONH₂ (SEQ ID NO:4, poly-E-cat), которая содержит поликатионную последовательность, которая увеличивает нацеливание на селезенку, позвоночник, грудину и бедро. В некоторых вариантах осуществления полипептид, используемый в покрытии, представляет собой вариант SEQ ID NO:3 или 4 с 85%, 90%, 95% или более чем 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO:3 или 4.

Результаты исследования *in vitro* показали, что адсорбция иммуноглобулина G (IgG) и белка комплемента C3 на наночастицах увеличивает их поглощение клетками Купфера, и инкубация в сыворотке увеличивает поглощение печенью *in vivo* после перфузии печени (Nagayama et al., *Int. J. Pharm.*, 342:215-21 (2007)). Сообщения также указывают на то, что галактозу можно использовать для направления полимерных частиц для доставки генов в гепатоциты через асиалогликопротеиновый рецептор (Zhang et al., *J. Controlled Release*, 102:749-63 (2005)).

А. Композиции для изменения поверхностного заряда

Эффективность доставки полинуклеотидов в полиплексах может быть улучшена путем покрытия частиц агентом, который имеет отрицательный заряд при физиологическом значении pH. Предпочтительно отрицательно заряженный агент способен к электростатическому связыванию с положительно заряженной поверхностью полиплексов. Отрицательно заряженный агент может нейтрализовать заряд полиплекса или противоположным образом изменить заряд полиплекса. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления отрицательно заряженный агент придает полиплексу суммарный отрицательный заряд.

В некоторых вариантах осуществления отрицательно заряженный агент представляет собой отрицательно заряженный полипептид. Например, полипептид может включать аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту или их комбинацию, так что суммарный заряд полипептида является отрицательным при нейтральном pH. В некоторых вариантах осуществления полипептид представляет собой полипептид полиаспарагиновой кислоты, состоящий из 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более 20 остатков аспарагиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления полипептид

представляет собой полипептид полиглутаминовой кислоты, состоящий из 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, или более 20 остатков глутаминовой кислоты. Другие отрицательно заряженные молекулы включают небольшие молекулы (т.е. с молекулярной массой менее 1500, 100, 750 или 500 дальтон), такие как гиалуроновая кислота.

Увеличение отрицательного заряда на поверхности частицы может уменьшить или предотвратить негативные взаимодействия, описанные выше, когда более положительно заряженные частицы притягивают и связывают отрицательно заряженные белки плазмы в крови во время циркуляции и приводят к быстрому клиренсу ретикулоэндотелиальной системой (RES). В некоторых вариантах осуществления дзета-потенциал частиц составляет примерно от -15 мВ до примерно 10 мВ, предпочтительно примерно от -15 мВ до примерно 8 мВ, более предпочтительно примерно от -10 мВ до примерно 8 мВ, более предпочтительно примерно от -8 мВ до примерно 8 мВ. Дзета-потенциал может быть более отрицательным или более положительным, чем указанные выше диапазоны, при условии, что частицы стабильны (т. е. не агрегируют и т. д.) и не сразу выводятся из кровотока. Дзета-потенциалом можно манипулировать посредством покрытия или функционализации поверхности частицы с одной или более группами, которые изменяют поверхностный заряд. Альтернативно, сами мономеры могут быть функционализированы и/или в полимер могут быть введены дополнительные мономеры, которые изменяют поверхностный заряд.

В. Нацеливающие группы

В некоторых вариантах осуществления полиплексы включают специфический для типа клеток или состояния клеток нацеливающий домен или нацеливающий сигнал. Примеры групп, которые можно связать или не связать с полиплексами, включают, например, нацеливающие группы, которые обеспечивают доставку молекул к определенным клеткам. Нацеливающий сигнал или последовательность могут быть специфичными для хозяина, ткани, органа, клетки, органеллы, неядерной органеллы или клеточного компартмента. Например, композиции по настоящему изобретению могут быть модифицированы макромолекулами с концевыми галактозильными группами для нацеливания композиций на печень или клетки печени. Модифицированные композиции избирательно проникают в гепатоциты после взаимодействия носителя галактозильных остатков с асиалогликопротеиновым рецептором, присутствующим в больших количествах и с высокой аффинностью только на этих клетках. Более того, композиции здесь могут быть нацелены на другие конкретные межклеточные области, компартменты или типы клеток.

В одном варианте осуществления нацеливающий сигнал связывается со своим лигандом или рецептором, расположенным на поверхности клетки-мишени, так что вектор и клеточные мембраны располагаются достаточно близко друг к другу, чтобы обеспечить проникновение вектора в клетку. Дополнительные варианты осуществления настоящего изобретения направлены на специфическую доставку полинуклеотидов в определенные типы тканей или клеток, где полинуклеотиды могут кодировать полипептид или препятствовать экспрессии другого полинуклеотида. Полинуклеотиды, доставленные в клетку, могут кодировать полипептиды, которые могут усиливать или способствовать

функционированию клетки.

Нацеливающая группа может представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, домен антитела, антиген, Т-клеточный рецептор, рецептор клеточной поверхности, молекулу адгезии клеточной поверхности, белок локуса главного комплекса гистосовместимости, белок оболочки вируса и пептид, селективированный фаговым дисплеем, который специфически связывается с определенной клеткой.

Специалисту в данной области будет понятно, что тропность описанных полиплексов можно изменить простым изменением нацеливающего сигнала. В данной области техники известно, что почти каждый тип клеток в ткани организма млекопитающих обладает некоторым уникальным рецептором или антигеном клеточной поверхности. Таким образом, можно включить практически любой лиганд для рецептора клеточной поверхности или антигена в качестве нацеливающего сигнала. Например, пептидные гормоны можно использовать в качестве нацеливающих групп для нацеливания доставки в те клетки, которые обладают рецепторами для таких гормонов. Аналогично, хемокины и цитокины можно использовать в качестве нацеливающих сигналов для нацеливания доставки комплекса в их клетки-мишени. Разработано множество технологий для идентификации генов, которые предпочтительно экспрессируются в определенных клетках или при определенных состояниях клеток, и специалист в данной области техники может использовать такую технологию для идентификации нацеливающих сигналов, которые преимущественно или исключительно экспрессируются в представляющей интерес ткани-мишени.

Нацеливание на опухоль

В одном варианте осуществления нацеливающий сигнал используется для селективного нацеливания на опухолевые клетки. Опухолевые клетки экспрессируют маркеры клеточной поверхности, которые могут экспрессироваться только в опухоли или присутствовать в неопухолевых клетках, но преимущественно представлены в опухолевых клетках. Такие маркеры могут быть нацелены на увеличение доставки полиплексов к опухолевым клеткам.

Например, в некоторых вариантах осуществления нацеливающая группа представляет собой полипептид, включающий последовательность аргинин-глицин-аспарагиновая кислота. Например, нацеливающая группа может представлять собой другой полипептид аргинин-глицин-аспарагиновая кислота-лизин (RGDK, mRGD), который включает последовательность RGD и способен связываться с эндотелием опухоли посредством взаимодействия RGD с $\alpha v \beta 3$ и $\alpha v \beta 5$. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая группа включает полипептидную последовательность R/KxxR/K, где «x» представляет собой любую аминокислоту, и которая позволяет связываться с нейропилином-1. Связывание с интегринами или нейропилином-1 представляет собой два подхода для повышения доставки, направленной на опухоль и проникающей в опухолевые ткани *in vivo*. Сообщалось, что аналогичные подходы облегчают доставку лиганд-специфических генов *in vitro* и адресную доставку генов в печень, селезенку и костный мозг

in vivo.

Другие иллюстративные опухолеспецифические маркеры клеточной поверхности включают, не ограничиваясь этим, альфа-фетопроtein (AFP), С-реактивный белок (CRP), раковый антиген-50 (CA-50), раковый антиген-125 (CA-125), ассоциированный с раком яичников, раковый антиген 15-3 (CA15-3), ассоциированный с раком молочной железы, раковый антиген-19 (CA-19) и раковый антиген-242, ассоциированный с раком желудочно-кишечного тракта, карциноэмбриональный антиген (CEA), антиген, ассоциированный с карциномой (CAA), хромогранин А, муциноподобный рако-ассоциированный антиген (MC5), антиген, специфичный к эпителию человека (HEA), антиген Льюиса, антиген меланомы, антигены, ассоциированные с меланомой 100, 25 и 150, муциноподобный рако-ассоциированный антиген, белок множественной лекарственной устойчивости (MRPm6), белок множественной лекарственной устойчивости (MRP41), белок онкогена Neu (C-erbB-2), нейронспецифическая энолаза (NSE), Р-гликопротеин (продукт гена *mdr1*), антиген, ассоциированный с множественной лекарственной устойчивостью, p170, антиген, ассоциированный с множественной лекарственной устойчивостью, простатспецифический антиген (PSA), CD56, NCAM, EGFR, CD44 и фолатный рецептор. В одном варианте осуществления нацеливающий сигнал состоит из антител, специфичных к поверхностным маркерам опухолевых клеток.

Антитела

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связанным с полиплексом, которые функционируют в качестве нацеливающего сигнала. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты применимы для направления полиплекса на клеточный тип или клеточное состояние. В одном варианте осуществления полиплекс покрыт полипептидом, который представляет собой связывающий домен антитела, например, из белка, о котором известно, что он связывается с антителом, такого как белок А и белок G из *Staphylococcus aureus*. Другие домены, которые, как известно, связываются с антителом, известны в данной области и могут быть заменены. Связывающий домен антитела связывает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент с полиплексом.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое служит в качестве нацеливающего сигнала, является поликлональным, моноклональным, линейным, гуманизированным, химерным или его фрагментом. Репрезентативные фрагменты антител представляют собой фрагменты, которые связывают связывающий участок антитела невирусного вектора и включают диатела Fab, Fab', F(ab'), Fv, линейные антитела, одноцепочечные антитела и биспецифические антитела, известные в данной области.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающий сигнал включает все или часть антитела, которое направляет полиплекс к желаемому типу клеток-мишеней или состоянию клеток. Антитела могут быть моноклональными или поликлональными, но предпочтительно, чтобы они были моноклональными. Для целей генной терапии человека антитела могут быть получены из генов человека и являются специфичными в отношении

маркеров клеточной поверхности, и их получают для снижения потенциальной иммуногенности для человека-хозяина, как известно в данной области. Например, можно использовать трансгенных мышей, которые содержат полный кластер генов человеческого иммуноглобулина и способны продуцировать «человеческие» антитела. В одном варианте осуществления фрагменты таких антител человека используются в качестве нацеливающих сигналов. В предпочтительном варианте одноцепочечные антитела, модельные антитела человека, получают в прокариотической культуре.

В одном варианте нацеливающий сигнал направлен на клетки нервной системы, включая головной мозг и периферическую нервную систему. Клетки головного мозга включают несколько типов и состояний и обладают уникальными молекулами клеточной поверхности, специфичными для данного типа. Кроме того, типы и состояния клеток могут быть дополнительно охарактеризованы и сгруппированы по презентации общих молекул клеточной поверхности.

В одном варианте нацеливающий сигнал направлен на специфические рецепторы нейротрансмиттеров, экспрессированные на поверхности клеток нервной системы. Распределение рецепторов нейротрансмиттеров хорошо известно в данной области, и специалист в данной области может направлять описанные композиции с использованием специфических антител к рецепторам нейротрансмиттеров в качестве нацеливающих сигналов. Кроме того, учитывая тропность нейротрансмиттеров к их рецепторам, в одном варианте осуществления нацеливающий сигнал состоит из нейротрансмиттера или лиганда, способного специфически связываться с рецептором нейротрансмиттера.

В одном варианте осуществления нацеливающий сигнал специфичен для клеток нервной системы, которые могут включать астроциты, микроглию, нейроны, олигодендриты и шванновские клетки. Эти клетки можно дополнительно разделить по их функции, расположению, форме, классу нейротрансмиттеров и патологическому состоянию. Клетки нервной системы также можно идентифицировать по состоянию их дифференцировки, например стволовые клетки. Типичные маркеры, специфичные для этих типов и состояний клеток, хорошо известны в данной области и включают, не ограничиваясь этим, CD133 и нейросферу.

В одном варианте осуществления нацеливающий сигнал направлен на клетки скелетно-мышечной системы. Мышечные клетки включают несколько типов и обладают уникальными молекулами клеточной поверхности, специфичными для данного типа и состояния. Кроме того, типы и состояния клеток могут быть дополнительно охарактеризованы и сгруппированы по презентации общих молекул клеточной поверхности.

В одном варианте осуществления нацеливающий сигнал направлен на специфические рецепторы нейротрансмиттеров, экспрессированные на поверхности мышечных клеток. Распределение рецепторов нейротрансмиттеров хорошо известно в данной области, и специалист в данной области может направить описанные композиции с использованием специфических антител к рецепторам нейротрансмиттеров в качестве

нацеливающих сигналов. Кроме того, учитывая тропность нейротрансмиттеров к их рецепторам, в одном варианте осуществления нацеливающий сигнал состоит из нейротрансмиттера. Примеры нейротрансмиттеров, экспрессированных на мышечных клетках, на которые можно воздействовать, включают, не ограничиваясь этим, ацетихолин и норадреналин.

В одном варианте осуществления нацеливающий сигнал специфичен для мышечных клеток, которые состоят из двух основных групп, типа I и типа II. Эти клетки можно дополнительно разделить по их функции, расположению, форме, содержанию миоглобина и патологическому состоянию. Мышечные клетки также можно идентифицировать по состоянию их дифференцировки, например, мышечные стволовые клетки. Типичные маркеры, специфичные для этих типов и состояний клеток, хорошо известны в данной области, включают, не ограничиваясь этим, MyoD, Pax7 и MR4.

С. Линкеры

В некоторых вариантах осуществления полиплекс может быть покрыт как отрицательно заряженным агентом, так и нацеливающей группой. В некоторых вариантах осуществления отрицательно заряженный агент и нацеливающая группа связаны друг с другом линкером. Линкер может представлять собой полипептид или любой другой подходящий линкер, известный в данной области, например, полиэтиленгликоль (ПЭГ).

В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой полипептид, который имеет примерно нейтральный заряд при физиологическом значении pH. В некоторых вариантах осуществления линкерный полипептид представляет собой полиглицин. Например, в некоторых вариантах осуществления линкер состоит из 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 остатков глицина. В предпочтительном варианте осуществления линкер представляет собой полиглицин из 6 остатков.

В некоторых вариантах осуществления отрицательно заряженный агент сам по себе или в комбинации с нацеливающей группой связан с полиплексом посредством электростатических взаимодействий. В некоторых вариантах осуществления отрицательно заряженный агент, нацеливающая группа или их комбинация связаны с полиплексом посредством ковалентной конъюгации с остовом полимера или с боковой цепью, присоединенной к остову полимера.

D. Размер полиплексов и способы уменьшения агрегации

Устойчивость к агрегации может иметь важное значение, поскольку сохранение небольшого размера частиц ограничивает клиренс печенью и поддерживает способность полиплексных частиц к трансфекции в клетки-мишени. Следовательно, в предпочтительных вариантах осуществления полиплексы устойчивы к агрегации. Предпочтительно полиплексы с покрытием или без него имеют радиус примерно от 1 до 1000 нм, более предпочтительно примерно от 1 до примерно 500 нм, наиболее предпочтительно примерно от 15 до примерно 250 нм. Например, в некоторых вариантах осуществления полиплексы с покрытием, нагруженные полинуклеотидом, имеют радиус примерно от 150 до 275 нм.

Соотношение массы полинуклеотида к массе полимера (полинуклеотид:полимер), содержание и количество полиплексного покрытия или их комбинацию можно использовать для регулирования размера полиплексов.

Например, в примерах, приведенных ниже показано, что в некоторых вариантах осуществления эффективность трансфекции частиц с соотношением полимера к ДНК 25:1 ниже, чем эффективность трансфекции частиц с соотношением полимера:ДНК 50:1, 100:1, 150:1 и 200:1. Наиболее предпочтительное соотношение полимер:полинуклеотид для конкретного состава можно определить эмпирически с использованием способов, известных в данной области, таких как способы, описанные в приведенных ниже примерах. Как правило, масса:массовое соотношение полимер:полинуклеотид предпочтительно составляет примерно выше 10:1, более предпочтительно примерно выше 50:1, наиболее предпочтительно примерно выше 100:1. Масса:массовое соотношение полимер:полинуклеотид предпочтительно составляет примерно от 10:1 до 500:1, более предпочтительно примерно от 25:1 до 250:1, наиболее предпочтительно примерно от 50:1 до 150:1. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение полимер:полинуклеотид составляет примерно 100:1. Полиплексы предпочтительно имеют сферическую форму.

Примеры также показывают, что в некоторых вариантах осуществления эффективность трансфекции частиц определяется соотношением молекул покровного агента к молекулам полинуклеотида (покровный агент:полинуклеотид). Соотношение выражается по массе. Наиболее предпочтительное соотношение покровной агент:полинуклеотид для конкретного состава можно определить эмпирически с использованием методов, известных в данной области, таких как описанные в примерах ниже. Как правило, соотношение покровный агент:полинуклеотид выше 0, предпочтительно ниже примерно 50:1, более предпочтительно ниже примерно 25:1, наиболее предпочтительно ниже примерно 10:1. Соотношение покровный агент:полинуклеотид предпочтительно составляет примерно от 1:1 до 10:1, более предпочтительно примерно от 2,5:1 до 7,5:1. В некоторых вариантах соотношение покровный агент:полинуклеотид составляет примерно 5:1. Соотношения покровный агент:полинуклеотид 10:1, 5:1 и 2,5:1 также обозначаются здесь как 10x, 5x и 2,5x соответственно. Полиплексы предпочтительно имеют сферическую форму.

Е. ПЭГ-содержащие блок-сополимеры

Полимеры можно использовать для доставки лекарственных средств, например, при формировании частиц, таких как микрочастицы или наночастицы, или мицеллы, которые могут высвобождать одно или более терапевтических, профилактических и/или диагностических средств контролируемым образом в течение желаемого периода времени.

pH-чувствительные мицеллярные наноносители часто образуются путем самосборки амфифильных блок-сополимеров и состоят из гидрофильной (например, ПЭГ) внешней оболочки и гидрофобного внутреннего ядра, способного реагировать на pH среды. Как правило, при изменении pH среды от нейтрального или слабощелочного до

слабокислого ядра мицелл подвергаются ускоренной деградации, становятся полностью растворимыми в воде или существенно набухают в водной среде. В результате мицеллы с инкапсулированным лекарственным средством, с медленной скоростью высвобождения лекарственного средства, при физиологическом значении pH могут активироваться под действием кислого pH с быстрой «выгрузкой» молекул лекарственного средства. Согласно предшествующим сообщениям полимерные сегменты, составляющие ядра мицелл, включают поли(ортоэфиры), поли(β -аминоэфиры), поли(L-гистидин) и другие. Основными недостатками большинства предшествующих мицеллярных систем являются многочисленные стадии, необходимые для получения сополимеров, и сложность контроля молекулярной массы полимера и корректировки состава полимера во время синтеза сополимера.

Сополимеры демонстрировали изменение скорости высвобождения в зависимости от значения pH. Высвобождение лекарственного средства *in vitro* из DTX-инкапсулированных мицелл из образцов сополимера PEG2K-PPMS (PEG2K-PPMS-11%PDL, PEG2K-PPMS-30%PDL и PEG2K-PPMS-51%PDL) исследовали в растворе PBS при физиологическом значении pH 7,4 и кислом значении pH 5,0. В целом, высвобождение DTX из всех образцов мицелл соответствовало двухфазной кинетике высвобождения и демонстрировало заметную зависимость от pH. Нагруженные DTX мицеллы из сополимера PEG2K-PPMS быстро высвобождают 25-45% лекарственного средства в течение первых 12 ч, после чего следует более постепенное высвобождение дополнительных 25-40% лекарственного средства в течение последующих 132 ч. Влияние pH среды на скорость высвобождения лекарственных средств является существенным. Например, в конце инкубационного периода (144 ч) значения накопленного DTX, высвобождаемого из мицелл из сополимеров PEG2K-PPMS-11%PDL, PEG2K-PPMS-30%PDL и PEG2K-PPMS-51%PDL соответственно составляет 66%, 60% и 55% при физиологическом pH 7,4, и данные показатели увеличиваются соответственно до 85%, 81% и 75% при кислом pH 5,0. Наблюдаемое вызванное pH ускорение высвобождения DTX из мицелл из сополимера PEG2K-PPMS согласуется с более ранним наблюдением, согласно которому изменение pH среды с 7,4 до 5,0 вызывает значительное набухание мицелл в результате протонирования и увеличения размера ядра мицеллы PPMS. Это вызванное pH увеличение размера мицелл, безусловно, должно способствовать диффузии и высвобождению захваченного DTX из ядер мицелл в водную среду. При данном pH скорость высвобождения DTX предположительно контролируется взаимодействием между лекарственным средством и матрицей PPMS в ядрах мицелл. Поскольку ожидается, что сополимеры PEG2K-PPMS, богатые PDL, будут образовывать прочные гидрофобные домены во внутренних ядрах своих мицелл, чтобы лучше захватывать и удерживать гидрофобные молекулы DTX, то высвобождение лекарственного средства из таких сополимерных мицелл должно быть более постепенным и продолжительным. Эта гипотеза подтверждается экспериментальными данными, показывающими, что как при pH 7,4, так и при 5,0 скорость высвобождения DTX из мицелл из сополимера PEG2K-PPMS снижается с увеличением

содержания PDL в сегментах цепи PPMS сополимера.

Известно, что при захвате мицелл опухолевыми клетками частицы мицелл подвергаются захвату в эндосомах с pH от 5,5 до 6,0 и в лизосомах с pH от 4,5 до 5,0. Как ясно показывают приведенные выше результаты, такие кислые среды неизбежно вызывают быстрое высвобождение DTX из мицелл из сополимера PEG2K-PPMS, тем самым повышая цитотоксичность мицелл, нагруженных лекарственным средством. Аминогруппы в сополимерах будут функционировать в качестве «протонных губок», облегчая высвобождение из эндосом. Следовательно, pH-чувствительные свойства, проявляемые мицеллами сополимера PEG2K-PPMS, весьма желательны, что делает их превосходными носителями для доставки противоопухолевых препаратов.

VII. Составы

Составы готовят с использованием фармацевтически приемлемого «носителя», состоящего из веществ, которые считаются безопасными и эффективными, и их можно вводить человеку, не вызывая нежелательных биологических побочных эффектов или нежелательных взаимодействий. «Носителем» являются все компоненты, присутствующие в фармацевтическом составе, кроме активного ингредиента или ингредиентов. Термин «носитель» включает, не ограничиваясь этим, разбавители, связующие вещества, смазывающие вещества, разрыхлители, наполнители и покровные композиции.

Подробную информацию о материалах, оборудовании и процессах приготовления таблеток и лекарственных форм с отсроченным высвобождением см. в *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, eds. Lieberman et al. (New York: Marcel Dekker, Inc., 1989) и *Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 6th Ed. (Media, PA: Williams & Wilkins, 1995).

VIII. Способы получения полиплексов

A. Способы получения частиц

Частицы можно приготовить с использованием различных способов, известных в данной области техники. Используемый метод может зависеть от множества факторов, включая полимер, используемый для образования наночастиц, желаемый диапазон размеров получаемых частиц и пригодность вещества, предназначенного для инкапсулирования.

Известные в данной области способы, которые можно использовать для получения наночастиц, включают, не ограничиваясь этим, полиэлектролитную конденсацию (см. Suk et al., *Biomaterials*, 27, 5143-5150 (2006)); одинарную и двойную эмульсию; формование наночастиц и электростатическую самосборку (например, полиэтиленимин-ДНК или липосомы).

В одном варианте осуществления загруженные частицы получают объединением раствора полимера, обычно в органическом растворителе, с представляющим интерес полинуклеотидом. Раствор полимера готовят растворением или суспендированием полимера в растворителе. Растворитель следует выбирать таким образом, чтобы он не оказывал неблагоприятного воздействия (например, дестабилизировал или разрушал)

инкапсулированную нуклеиновую кислоту. Подходящие растворители включают, не ограничиваясь этим, ДМСО и метиленхлорид. Концентрацию полимера в растворителе можно варьировать по мере необходимости. В некоторых вариантах осуществления концентрация составляет, например, 25 мг/мл. Раствор полимера также может быть разбавлен буфером, например натрий-ацетатным буфером.

Затем раствор полимера смешивают с инкапсулируемым агентом, таким как полинуклеотид. Агент можно растворить в растворителе с образованием раствора перед его объединением с раствором полимера. В некоторых вариантах осуществления агент растворяют в физиологическом буфере перед его объединением с раствором полимера. Соотношение объема раствора полимера к объему раствора реагента может составлять 1:1. Комбинацию полимера и агента обычно инкубируют в течение нескольких минут для образования частиц перед использованием раствора для его желаемой цели, такой как трансфекция. Например, раствор полимера/полинуклеотида можно инкубировать в течение 2, 5, 10 или более 10 мин перед использованием раствора для трансфекции. Инкубацию можно провести при комнатной температуре.

В некоторых вариантах осуществления перед использованием частицы также инкубируют с раствором, содержащим покровный агент. Раствор частиц можно инкубировать с покровным агентом в течение 2, 5, 10 или более 10 мин перед использованием полиплексов для трансфекции. Инкубация может быть при комнатной температуре.

В некоторых вариантах осуществления, если агент представляет собой полинуклеотид, то полинуклеотид сначала образует комплекс с поликатионом перед смешиванием с полимером. Комплексообразование может быть достигнуто посредством смешивания полинуклеотидов и поликатионов в подходящем молярном соотношении. Когда в качестве поликатиона используется полиамин, то полезно определить молярное отношение азота полиамина к фосфату полинуклеотида (соотношение N/P). В предпочтительном варианте осуществления ингибирующие РНК и полиамины смешивают друг с другом с образованием комплекса при соотношении N/P примерно от 1:1 до 1:25, предпочтительно примерно от 8:1 до 15:1. Объем раствора полиамина, необходимый для достижения определенных молярных соотношений, можно определить по следующей формуле:

$$V_{\text{NH}_2} = \frac{C_{\text{ингРНК, конечн}} \times M_{\text{w, ингРНК}} / C_{\text{ингРНК, конечн}} \times M_{\text{w, P}} \times \Phi_{\text{N:P}} \times \Phi V_{\text{конечн}}}{C_{\text{NH}_2} / M_{\text{w, NH}_2}}$$

где $M_{\text{w, ингРНК}}$ = молекулярная масса ингибирующей РНК, $M_{\text{w, P}}$ = молекулярная масса фосфатных групп ингибирующей РНК, $\Phi_{\text{N:P}}$ = соотношение N:P (молярное соотношение азота полиамина к фосфату ингибирующей РНК), $C_{\text{NH}_2, \text{запас}}$ = концентрация исходного раствора полиамина, и $M_{\text{w, NH}_2}$ = молекулярная масса на азот полиамина. Способы смешивания полинуклеотидов с поликатионами для конденсации полинуклеотида известны в данной области. См., например, опубликованную заявку на патент США № 2011/0008451.

Термин «поликатион» относится к соединению, имеющему положительный заряд, предпочтительно, по меньшей мере, 2 положительных заряда, при выбранном рН, предпочтительно физиологическом значении рН. Поликатионные группы имеют примерно от 2 до примерно 15 положительных зарядов, предпочтительно примерно от 2 до примерно 12 положительных зарядов и более предпочтительно примерно от 2 до примерно 8 положительных зарядов при выбранных значениях рН. Многие поликатионы известны в данной области техники. Подходящие составляющие компоненты поликатионов включают основные аминокислоты и их производные, такие как аргинин, аспарагин, глутамин, лизин и гистидин; катионные дендримеры; и аминополисахариды. Подходящие поликатионы могут быть линейными, такими как линейные тетрализины, разветвленными или дендримерными по структуре.

Иллюстративные поликатионы включают, не ограничиваясь этим, синтетические поликатионы на основе акриламида и 2-акриламидо-2-метилпропантриметиламина, поли(N-этил-4-винилпиридин) или аналогичный четвертичный полипиридин, диэтиламиноэтиловые полимеры и конъюгаты декстрана, сульфат полимиксина В, липополиамины, поли(аллиламины), такие как сильный поликатион поли(диметилдиаллиламмония хлорид), полиэтиленимин, полибрэн, и полипептиды, такие как протамин, гистоновые полипептиды, полилизин, полиаргинин и полиорнитин.

В некоторых вариантах осуществления поликатион представляет собой полиамин. Полиамины представляют собой соединения, имеющие две или более первичных аминогрупп. Подходящие встречающиеся в природе полиамины включают, не ограничиваясь этим, спермин, спермидин, кадаверин и путресцин. В предпочтительном варианте осуществления полиамин представляет собой спермидин.

В еще одном варианте осуществления поликатион представляет собой циклический полиамин. Циклические полиамины известны в данной области и описаны, например, в патенте США № 5698546, WO 1993/012096 и WO 2002/010142. Примеры циклических полиаминов включают, не ограничиваясь этим, циклен.

Спермин и спермидин являются производными путресцина (1,4-диаминобутана), который образуется из L-орнитина под действием ODC (орнитиндекарбоксилазы). L-орнитин является продуктом деградации L-аргинина под действием аргиназы. Спермидин имеет структуру триамина, которая продуцируется спермидинсинтазой (SpdS), которая катализирует моноалкилирование путресцина (1,4-диаминобутана) декарбоксилированным S-аденозилметионином (dcAdoMet) донором 3-аминопропила. Формильное алкилирование обеих аминогрупп путресцина донором 3-аминопропила дает симметричный тетрааминспермин. Биосинтез спермина протекает до спермидина под действием сперминсинтазы (SpmS) в присутствии dcAdoMet. Донор 3-аминопропила (dcAdoMet) получают из S-аденозилметионина путем последовательной трансформации L-метионина метионин-аденозилтрансферазой с последующим декарбоксилированием с участием AdoMetDC (S-аденозилметиониндекарбоксилазы). Таким образом, путресцин, спермидин и спермин являются метаболитами аминокислот L-аргинина (L-орнитин, путресцин) и L-

метионина (dcAdoMet, донор аминокпропила).

IX. Способы применения частиц/мицелл

A. Доставка лекарственного средства

Частицы можно использовать для доставки эффективного количества одного или более терапевтических, диагностических и/или профилактических средств пациенту, нуждающемуся в таком лечении. Количество вводимого агента может легко определить лечащий врач, и зависит от возраста и массы тела пациента и заболевания или расстройства, подлежащего лечению.

Частицы можно использовать для доставки лекарственных средств (как здесь используется, «лекарственное средство» включает терапевтические, диетические, диагностические и профилактические средства), независимо от того, вводятся они внутривенно, подкожно или внутримышечно, вводятся назально или в дыхательную систему, инъецируются в опухолевую среду, вводятся на поверхность слизистых (вагинально, ректально, буккально, сублингвально) или инкапсулируются для пероральной доставки. Частицы можно вводить в виде сухого порошка, водной суспензии (в воде, физиологическом растворе, забуференном физиологическом растворе и т. д.), в гидрогеле, органогеле или липосоме, в капсулах, таблетках, пастилках или другом стандартном фармацевтическом эксципиенте.

B. Трансфекция

Композиции могут быть предназначены для трансфекции клеток полинуклеотидами. Как более подробно обсуждается ниже, трансфекция может иметь место *in vitro* или *in vivo* и может применяться в применениях, включая генную терапию и лечение заболеваний. Композиции могут быть более эффективными, менее токсичными или их комбинацией по сравнению с контролем. В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой клетки, обработанные альтернативным реагентом для трансфекции, таким как LIPOFECTAMINE 2000 или полиэтиленимин (PEI).

Трансфекцию осуществляют посредством приведения в контакт клеток с раствором, содержащим полиплексы. Для методов *in vivo* контактирование обычно имеет место *in vivo* после введения субъекту раствора. Для методов *in vitro* раствор обычно добавляют к культуре клеток и оставляют контактировать с клетками в течение нескольких минут, часов или суток. Затем клетки можно промыть, чтобы удалить избыток полиплексов.

Конкретный полинуклеотид, доставляемый полиплексом, может быть выбран специалистом в данной области в зависимости от патологического состояния или заболевания, подлежащего лечению. Полинуклеотид может представлять собой, например, представляющий интерес ген или кДНК, мРНК, функциональную нуклеиновую кислоту, такую как ингибирующая РНК, тРНК, рРНК, или экспрессионный вектор, кодирующий представляющий интерес ген или кДНК, функциональную нуклеиновую кислоту или тРНК или рРНК. В некоторых вариантах осуществления два или более полинуклеотида вводят в комбинации.

Композиции можно использовать в способе доставки полинуклеотидов в клетки *in*

in vitro. Например, полиплексы можно использовать для трансфекции клеток *in vitro*. Способ обычно включает приведение клеток в контакт с полиплексом, включающим полинуклеотид в количестве, эффективном для введения полинуклеотида в цитоплазму клетки. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид доставляется в клетку в количестве, эффективном для изменения генотипа или фенотипа клетки. Клетки могут представлять собой первичные клетки, выделенные от субъекта, или клетки стабильной клеточной линии. Клетки могут относиться к гомогенному типу клеток или могут представлять собой гетерогенную смесь различных типов клеток. Например, полиплексы можно ввести в цитоплазму клеток из гетерогенной клеточной линии, содержащей клетки разных типов, например, в клетки фидерной культуры или смешанной культуры на различных стадиях дифференцировки. Клетки могут представлять собой трансформированную клеточную линию, которую можно поддерживать в течение неопределенного периода времени в клеточной культуре. Примерами клеточных линий являются линии, доступные из Американской коллекции типовых культур, включая линии опухолевых клеток.

Любую эукариотическую клетку можно трансфектировать для получения клеток, которые экспрессируют специфическую нуклеиновую кислоту, например метаболический ген, включая первичные клетки, а также стабильные клеточные линии. Подходящие типы клеток включают, не ограничиваясь этим, недифференцированные или частично дифференцированные клетки, включая стволовые клетки, тотипотентные клетки, плюрипотентные клетки, эмбриональные стволовые клетки, внутреннюю клеточную массу, взрослые стволовые клетки, клетки костного мозга, клетки из пуповинной крови и клетки, полученные из эктодермы, мезодермы или энтодермы. Подходящие дифференцированные клетки включают соматические клетки, нейрональные клетки, клетки скелетных мышц, клетки гладкой мускулатуры, клетки поджелудочной железы, клетки печени и клетки сердца. В еще одном варианте осуществления миРНК, антисмысловые полинуклеотиды (включая миРНК или антисмысловые полинуклеотиды) или ингибирующие РНК могут быть трансфектированы в клетку с использованием композиций.

Способы особенно пригодны в области персонализированной терапии, например, для репарации дефектного гена, дедифференцировки клеток или перепрограммирования клеток. Например, клетки-мишени сначала выделяют у донора с использованием методов, известных в данной области, подвергают контактированию с полиплексами, включающими полинуклеотид, вызывающий изменение *in vitro* (*ex vivo*), и вводят пациенту, нуждающемуся в этом. Источники или клетки включают клетки, полученные непосредственно от пациента или аллогенного донора. В предпочтительных вариантах осуществления клетки-мишени для введения субъекту представляют собой аутологичные клетки, т.е. производные от субъекта, или сингенные. Аллогенные клетки также могут быть выделены от антигенно совместимых, генетически неродственных доноров (идентифицированных через национальный реестр) или с использованием клеток-мишеней, полученных или происходящих от генетически родственного брата или сестры,

или родителя.

Клетки можно отобрать методами положительной и/или отрицательной селекции. Например, антитела, связывающиеся с определенным белком клеточной поверхности, можно конъюгировать с магнитными гранулами, и использовать иммуногенные процедуры для выделения желаемого типа клеток. Может оказаться желательным обогатить клетки-мишени перед транзientной трансфекцией. Используемый здесь в контексте композиций, обогащенных конкретной клеткой-мишенью, термин «обогащенный» указывает на долю желаемого элемента (например, клетки-мишени), которая выше, чем доля, обнаруженная в природном источнике клеток. Композиция клеток может быть обогащена по сравнению с природным источником клеток по меньшей мере на один порядок, предпочтительно на два или три порядка, и более предпочтительно на 10, 100, 200 или 1000 порядков. После выделения клеток-мишеней, их можно размножить культивированием в подходящей среде согласно общепризнанным методам, известным в данной области. Стабильные клеточные линии также могут быть пригодными в способах. При необходимости клетки можно хранить замороженными до трансфекции.

Затем клетки подвергают контактированию с композицией *in vitro* для репарации, дедифференцировки, редифференцировки и/или перепрограммирования клетки. За клетками можно наблюдать, и можно выбрать желаемый тип клеток для терапевтического введения.

После репарации, дедифференцировки и/или редифференцировки и/или перепрограммирования клетки вводят пациенту, нуждающемуся в этом. В наиболее предпочтительных вариантах осуществления клетки выделяют и вводят обратно тому же пациенту. В альтернативных вариантах осуществления клетки выделяют у одного пациента и вводят второму пациенту. Данный метод также можно использовать для получения замороженных запасов измененных клеток, которые можно хранить в течение длительного времени для последующего использования. В одном варианте осуществления фибробласты, кератиноциты или гемопоэтические стволовые клетки выделяют у пациента и репарируют, дедифференцируют или репрограммируют *in vitro* для получения терапевтических клеток для пациента.

С. Способы *in vivo*

Композиции можно использовать в способе доставки полинуклеотидов в клетки *in vivo*. Было обнаружено, что полимеры более эффективны и/или менее токсичны для системной трансфекции полинуклеотидов *in vivo*, чем альтернативные реагенты для трансфекции, включая LIPOFECTAMINE 2000, PEI и даже другие PMSC. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления клеточно-специфические полиплексы, включающие терапевтический полинуклеотид, вводят системно *in vivo* для лечения заболевания, например, рака.

В некоторых подходах *in vivo* композиции вводят субъекту в терапевтически эффективном количестве. В рамках настоящего изобретения, термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» означает дозу, достаточную

для лечения, ингибирования или облегчения одного или более симптомов заболевания, которое подвергается лечению, или для иного обеспечения желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Точная доза будет варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как переменные, зависящие от субъекта (например, возраст, состояние иммунной системы и т. д.), заболевание и проводимое лечение.

Фармацевтические композиции могут быть предназначены для введения парентеральным (внутримышечная, внутрибрюшинная, внутривенная (в/в) или подкожная инъекция), чрескожным (пассивно или с использованием ионофореза или электропорации) или мукозальным (назальным, вагинальным, ректальным или сублингвальным) путем введения или с использованием биоразлагаемых вкладышей и могут быть приготовлены в виде лекарственных форм, подходящих для каждого пути введения.

В некоторых вариантах осуществления композиции вводят системно, например, внутривенно или внутрибрюшинно, в количестве, эффективном для доставки композиций к клеткам-мишеням. Другие возможные пути включают чрескожный или пероральный.

В некоторых вариантах осуществления композиции вводят местно, например, путем инъекции непосредственно в место, подлежащее лечению. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят инъекцией или вводят иным образом непосредственно в одну или более опухолей. Как правило, местная инъекция обеспечивает повышенную локальную концентрацию композиций, превышающую ту, которая может быть достигнута при системном введении. В некоторых вариантах осуществления композиции доставляются местно в соответствующие клетки с помощью катетера или шприца. Другие способы локальной доставки таких композиций в клетки включают использование инфузионных насосов (например, производства Alza Corporation, Palo Alto, Calif.) или включение композиций в полимерные имплантаты (см., например, P. Johnson and J.G. Lloyd-Jones, eds., *Drug Delivery Systems* (Chichester, England: Ellis Horwood Ltd., 1987), которые могут обеспечить замедленное высвобождение полиплексов непосредственно в области имплантата.

Полиплексы могут быть доставлены в клетку непосредственно, например, путем их контактирования с клеткой или опосредованно, например, посредством действия любого биологического процесса. Например, полиплексы можно приготовить в физиологически приемлемом носителе или растворителе и ввести в ткань или жидкость, окружающую клетку. Полиплексы могут проходить через клеточную мембрану посредством простой диффузии, эндоцитоза или любого активного или пассивного транспортного механизма.

Композиции можно использовать в протоколах генной терапии для лечения заболеваний или расстройств, ассоциированных с генами. Дисфункцию клеток также можно лечить или уменьшать с использованием композиций и способов. В некоторых вариантах осуществления специфически нацелены на заболевания, поддающиеся генной терапии. Заболевание может иметь место у детей, например, у лиц младше 18 лет, обычно младше 12 лет, или у взрослых, например, у лиц в возрасте 18 лет и старше. Таким образом, варианты осуществления настоящего изобретения направлены на лечение хозяина, у

которого диагностировано заболевание, путем трансфекции полиплекса, включающего полинуклеотид, в клетку, пораженную заболеванием, где полинуклеотид кодирует терапевтический белок. В еще одном варианте осуществления ингибирующая РНК направлена на определенный тип или состояние клеток для снижения или элиминации экспрессии белка, тем самым достигая терапевтического эффекта. Настоящее раскрытие охватывает манипулирование, усиление или замену генов для лечения заболеваний, вызванных генетическими дефектами или аномалиями.

Подходящие генетические заболевания, которые можно лечить с помощью описанных здесь композиций, включают, не ограничиваясь этим:

Митохондриальное заболевание: болезнь Альперса; синдром Барта; дефекты β-окисления; дефицит карнитина-ацилкарнитина; дефицит карнитина; дефицит кофермента Q10; дефицит комплекса I; дефицит комплекса II; дефицит комплекса III; дефицит комплекса IV; дефицит комплекса V; дефицит цитохром-с-оксидазы (COX), LHON - наследственная оптическая нейропатия Лебера; MM - митохондриальная миопатия; LMM - летальная инфантильная митохондриальная миопатия; MMC - материнская миопатия и кардиомиопатия; NARP - нейрогенная мышечная слабость, атаксия и пигментный ретинит; болезнь Ли; FICP - фатальная детская кардиомиопатия плюс, MELAS-ассоциированная кардиомиопатия; MELAS - митохондриальная энцефаломиопатия с лактоацидозом и инсультоподобными эпизодами; LDYT - наследственная оптическая нейропатия Лебера и дистония; MERRF - миоклоническая эпилепсия и рваные красные мышечные волокна; MHCМ - гипертрофическая кардиомиопатия, наследуемая по материнской линии; CPEO - хроническая прогрессирующая наружная офтальмоплегия; KSS - синдром Кернса-Сейра; DM - сахарный диабет; DMDF сахарный диабет+глухота; CIPO - хроническая псевдообструкция кишечника с миопатией и офтальмоплегией; DEAF - глухота, наследуемая по материнской линии, или глухота, вызванная аминогликозидами; PEM - прогрессирующая энцефалопатия; SNHL - нейросенсорная тугоухость; энцефаломиопатия; митохондриальная цитопатия; дилатационная кардиомиопатия; GER - желудочно-кишечный рефлюкс; DEMCHO - слабоумие и хорея; AMDF - атаксия, миоклонус; непереносимость физических нагрузок; ESOC эпилепсия, инсульты, атрофия зрительного нерва и снижение когнитивных функций; FBSN семейный двусторонний некроз полосатого тела; FSGS фокально-сегментарный гломерулосклероз; LMM летальная детская митохондриальная миопатия; MDM миопатия и сахарный диабет; MEPR миоклоническая эпилепсия и психомоторная регрессия; MERME MERRF/MELAS перекрывающаяся болезнь; MHCМ гипертрофическая кардиомиопатия, наследуемая по материнской линии; MICM кардиомиопатия, наследуемая по материнской линии; MILS синдром Ли, наследуемый по материнской линии; митохондриальная энцефалокардиомиопатия; мультисистемное митохондриальное расстройство (миопатия, энцефалопатия, слепота, потеря слуха, периферическая невропатия); NAION неартериальная передняя ишемическая нейропатия зрительного нерва; NIDDM инсулиннезависимый сахарный диабет; PEM прогрессирующая энцефалопатия; PME прогрессирующая миоклоническая эпилепсия; RTT

синдром Ретта; SIDS синдром внезапной детской смерти; MIDD диабет и глухота по материнской линии; и MODY диабет взрослого типа у молодых.

Нуклеарная болезнь: мышечные дистрофии, синдром Эллиса-ван Кревелда, синдром Марфана, миотоническая дистрофия, спинальная мышечная атрофия, ахондроплазия, боковой амиотрофический склероз, синдром Шарко-Мари-Тута, синдром Кокейна, диастрофическая дисплазия, мышечная дистрофия Дюшенна, синдром Эллиса-ван Кревелда, прогрессирующая оссифицирующая фибродисплазия, болезнь Альцгеймера, синдром Ангельмана, эпилепсия, эссенциальный тремор, синдром ломкой X-хромосомы, атаксия Фридрейха, болезнь Хантингтона, болезнь Ниманна-Пика, болезнь Паркинсона, синдром Прадера-Вилли, синдром Ретта, спиноцеребеллярная атрофия, синдром Вильямса, атаксия телеангиэктазия, анемия, серповидноклеточная лимфома, лимфома Беркитта, болезнь Гоше, гемофилия, лейкемия, пароксизмальная ночная гемоглобинурия, порфирия, талассемия, болезнь Крона, дефицит альфа-1-антитрипсина, кистозный фиброз, глухота, синдром Пендреда, глаукома, круговая атрофия сосудистой оболочки и сетчатки, гиперплазия надпочечников, адренолейкодистрофия, синдром Кокейна, синдром удлиненного интервала QT, иммунодефицит с гипер-IgM, синдром Альпорта, синдром Эллиса-ван Кревелда, прогрессирующая оссифицирующая фибродисплазия, синдром Ваарденбурга, синдром Вернера.

Инфекционное заболевание: вирусная инфекция - СПИД, комплекс, связанный со СПИДом, ветряная оспа (Varicella), простуда, цитомегаловирусная инфекция, колорадская клещевая лихорадка, лихорадка Денге, геморрагическая лихорадка Эбола, эпидемический паротит, грипп, болезнь рук, ящур, гепатит - простой герпес, опоясывающий герпес, HPV, грипп, лихорадка Ласса, корь, геморрагическая лихорадка Марбург, инфекционный мононуклеоз, эпидемический паротит, полиомиелит, прогрессирующая мультифокальная лейкоэнцефалопатия, бешенство, краснуха, SARS, оспа (натуральная оспа), вирусный энцефалит, вирусный гастроэнтерит, вирусный менингит, вирусная пневмония, болезнь Западного Нила - желтая лихорадка; бактериальные инфекции - сибирская язва, бактериальный менингит, бруцеллез, бубонная чума, кампилобактериоз, болезнь кошачьих царапин, холера, дифтерия, сыпной тиф, гонорея, болезнь Хансена, легионеллез, проказа, лептоспироз, листериоз, болезнь Лайма, мелиоидоз, инфекция MRSA, нокардиоз, коклюш, пневмококковая пневмония, пситтакоз, Ку-лихорадка, пятнистая лихорадка Скалистых гор или RMSF, сальмонеллез, скарлатина, шигеллез, сифилис, столбняк, трахома, туберкулез, туляремия, брюшной тиф, сыпной тиф, коклюш; паразитарные инвазии - африканский трипаносомоз, амебиаз, аскаридоз, бабезиоз, болезнь Шагаса, клонорхоз, криптоспориоз, цистицеркоз, дифиллоботриоз, дракункулез, эхинококкоз, энтеробиоз, фасциолез, фасциолопсидоз, филяриатоз, свободноживущая амебозоидная инфекция, лямблиоз, гнатостоматоз, гименолепидоз, кладоспориоз, лейшманиоз, малярия, метагонимоз, миаз, онхоцеркоз, педикулез, острицы, чесотка, шистосомоз, тениоз, токсокароз, токсоплазмоз, трихинеллез, трихиноз, трихоцефалез, трипаносомоз.

Рак: рак молочной железы и яичников, лимфома Беркитта, хронический миелоидный

лейкоз, рак толстого кишечника, рак легких, злокачественная меланома, множественная эндокринная неоплазия, нейрофиброматоз, р53 синдром Ли-Фраумени, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, ретинобластома, синдром Хиппеля-Линдау, поликистозная болезнь почек, туберозный склероз.

Метаболические болезни: адренолейкодистрофия, атеросклероз, болезнь Беста, болезнь Гоше, глюкозо-галактозная мальабсорбция, гиратная атрофия, юношеский диабет, ожирение, пароксизмальная ночная гемоглобинурия, фенилкетонурия, болезнь Рефсума, болезнь Танжера, болезнь Тея-Сакса, адренолейкодистрофия, диабет 2 типа, синдром Гоше, наследственный гемохроматоз, синдром Леша-Нихана, болезнь «кленового сиропа», синдром Менкеса, болезнь Ниманна-Пика, рак поджелудочной железы, синдром Прадера-Вилли, порфирия, болезнь Рефсума, болезнь Танжера, болезнь Вильсона, синдром Зельвегера, прогерия, SCID.

Аутоиммунные заболевания: аутоиммунный полигландулярный синдром, волчанка, диабет I типа, склеродермия, рассеянный склероз, болезнь Крона, хронический активный гепатит, ревматоидный артрит, болезнь Грейвса, миастения, миозит, антифосфолипидный синдром (APS), увеит, полимиозит, синдром Рейно и демиелинизирующие невропатии, и редкие расстройства, такие как ревматическая полимиалгия, височный артериит, синдром Шегрена, болезнь Беше, синдром Чарга-Стросса и артериит Такаясу.

Воспалительные заболевания: алоpecia, диастрофическая дисплазия, синдром Эллиса-ван Кревелда, астма, артрит, в том числе остеоартрит, ревматоидный артрит и спондилоартропатии.

Возрастные болезни: болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, атеросклероз, возрастная макулярная дегенерация, возрастной остеопороз.

Способы и композиции также можно использовать для лечения, контроля или ослабления симптомов, связанных со старением, в регенерации тканей/регенеративной медицине, трансплантации стволовых клеток, индукции обратимых генетических модификаций, экспрессии ингибирующей РНК, улучшении когнитивных функций, повышении работоспособности и косметических изменениях для человека или животного, отличного от человека.

D. Трансгенные животные, отличные от человека

Композиции и способы также можно использовать для создания трансгенных животных, отличных от человека. В частности, микроинъекция зиготы, перенос ядра, электрослияние бластомеров и инъекция бластоцисты гибридов эмбриональных стволовых клеток (ES) обеспечили возможные стратегии для создания трансгенных животных. В одном варианте осуществления эмбриональную стволовую (ES) клетку трансфектируют и вводят в бластоцисту эмбриона млекопитающего в качестве средства для получения химерных мышей. В другом варианте осуществления сначала получают эмбриональные стволовые (ES) клетки с последующей инъекцией бластоцисты в эмбрионы. Использование клеток, несущих определенные гены и представляющие интерес модификации, позволяет создавать и исследовать последствия трансфекции ДНК. Теоретически этот метод

предлагает перспективу переноса любого полинуклеотида в целый организм. Например, способы и композиции можно использовать для создания мышей, обладающих полинуклеотидом, доставляемым в клетки определенного типа или состояния клеток.

Одноклеточные или многоклеточные организмы, отличные от человека, предпочтительно млекопитающие, отличные от человека, более предпочтительно мыши, могут быть трансфектированы композициями путем введения композиций по настоящему изобретению в организм, отличный от человека. В одном варианте осуществления полинуклеотид сохраняется эписомальным и не интегрируется стабильно в геном организма-хозяина. В другом варианте осуществления полинуклеотид предотвращает экспрессию представляющего интерес гена. Таким образом, экспрессию полинуклеотида в конкретных клетках-хозяевах можно контролировать с помощью количества полинуклеотида, вводимого хозяину.

Трансфектированные «нечеловеческие» организмы имеют ряд преимуществ перед традиционными трансгенными организмами. Например, трансфектированный организм по настоящему изобретению может быть получен за меньшее время, чем традиционные трансгенные организмы без полового размножения. Более того, экспрессия представляющего интерес полинуклеотида у хозяина может напрямую регулироваться количеством представляющего интерес полинуклеотида, вводимого хозяину. Контролируемая дозой экспрессия представляющего интерес полинуклеотида может коррелировать с наблюдаемыми фенотипами и изменениями у трансфектированного животного. Кроме того, индуцируемые элементы контроля экспрессии и/или репликации могут быть включены в представляющий интерес полинуклеотид для обеспечения индуцибельной и зависящей от дозировки экспрессии и/или репликации. Подходящие индуцибельные элементы контроля экспрессии и/или репликации известны в данной области. Кроме того, влияние генов и генных модификаций на определенные типы и состояния клеток можно изучать, не затрагивая все клетки животного.

Х. Наборы

Также настоящее изобретение относится к наборам или упаковкам, которые содержат элементы, необходимые для проведения трансфекции эукариотических или прокариотических организмов, в частности трансфекции определенных типов клеток или состояний клеток. В соответствии с одним вариантом осуществления обеспечивается набор, включающий полимеры и, необязательно, покрытие полиплекса, например покрытие, специфичное для мишени. Полимер можно комбинировать с полинуклеотидом по выбору пользователя для получения комплекса, который можно использовать для трансфекции хозяина или клетки-хозяина. Полиплекс можно дополнительно смешать с покрытием, чтобы обеспечить специфический тропизм к типу клеток или состоянию клеток.

Отдельные компоненты наборов могут быть упакованы в различные контейнеры, например флаконы, пробирки, планшеты для микротитрования, бутылки и т.п. Другие реагенты могут быть включены в отдельные контейнеры и поставляться в комплекте;

например, образцы положительного контроля, образцы отрицательного контроля, буферы, среды для культивирования клеток и т. д. Предпочтительно, чтобы наборы также включали инструкции по применению.

Примеры

Настоящее изобретение будет дополнительно пояснено со ссылкой на следующие неограничивающие примеры.

Проблема, которую необходимо решить: белковые терапевтические средства можно использовать в качестве высокоэффективных медицинских препаратов для широкого ряда заболеваний (Harris et al., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 150e151 48e56 (2016), Jiang et al., *J. Control Release*, 213 36e44 (2015), Natarajan et al., *Transl Res.*, 188 10e26 (2017), Efremenko et al., *J. Control Release*, 247 175e181 (2017), Jiang et al., *Funct. Mater.* 28 (6) 1703982 (2018), Jiang et al., *J. Control Release*, 231 38e49 (2016)). Однако клиническое применение данной группы терапевтических средств было ограничено за счет их стоимости и нестабильности после системного введения, что свидетельствует о необходимости новых подходов для обеспечения длительной, эффективной и безопасной доставки (Carter, *Exp. Cell Res.*, 317 (9) 1261e1269 (2011)). Генная терапия привлекательна за счет возможной длительной секреции белка при низкой частоте введения (Weissman, *Expert Rev., Vaccines* 14 (2) 265e281 (2015)).

В то время как терапия на основе ДНК с использованием вирусов обеспечивает долгосрочную экспрессию белка, она также вызывает многочисленные опасения по поводу безопасности, особенно в отношении риска инсерционного мутагенеза, индукции тяжелых иммунных ответов и сложности контролирования уровня экспрессии белка. В отличие от ДНК, мРНК вызывает экспрессию кодированного белка, не проникая в ядро, что демонстрирует более высокую эффективность при трансфекции неделящихся клеток при одновременном снижении риска инсерционного мутагенеза. Терапия на основе мРНК имеет дополнительное преимущество, заключающееся в том, что ее дозирование можно масштабировать, и лечение транзистентно связано со стабильностью мРНК в цитозоле.

Решение проблемы: в данном случае предлагается подход «сверху-вниз» для синтеза библиотеки полимерных материалов. Сополимер полиамина и сложного полиэфира (PASE) использовали для доставки генов. Полиплексы PASE:pDNA являются одними из наиболее эффективных и наименее токсичных невирусных векторов (Zhou et al., *Nat. Mater.*, 11 (1) 82e90 (2012)). PASE полимеры были разработаны таким образом, чтобы они обладали несколькими ключевыми характеристиками: (1) биодegradацией, обеспечиваемой сложноэфирной связью в основной цепи полимера; (2) низкой плотностью катионного заряда, которая позволяет образовывать электростатические комплексы с нуклеиновыми кислотами, избегая при этом токсичности, ассоциированной с высококатионными полимерами; и (3) гидрофобностью, обеспечиваемой лактонными группами, которая стабилизирует полиплекс. Устойчивость к липазной химии обеспечивает высокую химическую универсальность, позволяя модулировать структуру полимера посредством выбора мономера, чтобы легко получить семейство различных материалов. Такая универсальность дает возможность трансформировать технологию PASE для доставки

мРНК.

В химический состав были внесены дополнительные модификации, и было показано, что система для доставки эффективна для доставки агента в дыхательную систему.

Пример 1: PACE полимер может доставлять мРНК

Материалы и методы

Материалы

и-пентадекалактон (PDL), диэтилсебагинат (DES), себагиновую кислоту, N-метилдиэтанолламин (MDEA), хлороформ, дихлорметан, гексан, хлороформ-d, ацетилацетонат хрома (III), этилендиамин, этаноламин, глицин и 1,10-карбонилдидиазол (CDI) получали от Sigma Aldrich (Saint Louis, MO) и использовали в готовом виде. 2-[(2-Аминоэтил)(метил)амино]этанол (AEMAE) получали от ChemBridge Corporation (San Diego, CA). Иммуобилизованная липаза *B. Candida antarctica* (CALB), нанесенная на акриловую смолу (Novozym 435), также была получена от Sigma Aldrich и была высушена при 50°C при давлении 2,0 мм рт.ст. в течение 20 ч перед использованием. Набор для трансфекции TransIT-мРНК был приобретен у Mirus Bio LLC (Madison, WI). Модифицированную мРНК Fluc, кодирующую люциферазу, и мРНК мышинового EPO, кодирующую эритропоэтин (ЭПО), приобретали у TriLink Biotechnologies (San Diego, CA). Клетки HEK293, клетки Daoy и клетки SH-SY5Y были получены из ATCC (Manassas, VA).

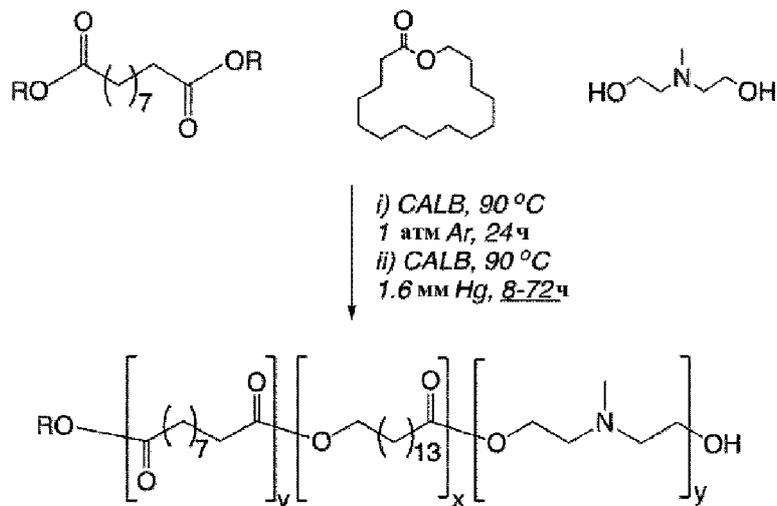
Синтез полимеров

Синтез PACE проводили, как описано Zhou et al., Nat. Mater., 11 (1) 82-90 (2012)), включая несколько модификаций для получения полимеров различной структуры. Вкратце: (1) для получения классического или кислого PACE для полимеризации использовали диэтилсебагинат или себагиновую кислоту; (2) для изменения гидрофобности классического PACE к реагентам добавляли различные проценты PDL (10% или 20%), и (3) для изменения молекулярной массы (ММ) классического PACE, содержащего 10% PDL, время реакции на второй стадии варьировали от 8 до 72 ч, чтобы получить полимеры с молекулярной массой от 2 кДа до 20 кДа.

Результаты

PACE представляет собой семейство терполимеров, образованных при использовании ферментативной сополимеризации сложных диэфиров/двухосновных кислот с аминзамещенными диолами и лактонами. PACE может эффективно доставлять пДНК (Zhou et al., Nat. Mater., 11 (1) 82e90 (2012)), микроРНК (Adams et al., Cancer Res., 76 (4) 927e939 (2016)) и миРНК (Cui et al., Nat. Commun., 8 (1) 191 (2017)). Однако, учитывая структурные различия между мРНК и указанными другими нуклеиновыми кислотами (Kauffman et al., Nano Lett., 15 (11) 7300e7306 (2015)), модификацию имеющихся структур PACE и/или разработку новых вариантов PACE рассматривали в качестве средства улучшения доставки. Высокая устойчивость к липазному катализатору обеспечивает универсальность структур, особенно с точки зрения гидрофобности и молекулярной массы. Начиная с одной из наиболее эффективных композиций PACE для доставки и трансфекции

ДНК (классический PACE), синтезировали различные полимеры с различной молекулярной массой и содержанием лактона, чтобы специфически улучшить доставку и трансфекцию мРНК.



Синтез PACE модифицировали для изменения различных параметров конечного полимера. Диэтилсебацат ($R=\text{CH}_2\text{CH}_3$) или себациновую кислоту ($R=\text{H}$) использовали для получения концов классического (сложный эфир/ОН) или кислого (COOH/ОН) PACE соответственно. Для классического PACE продолжительность второй стадии синтеза варьировала от 8 до 72 ч для варьирования MW. Содержание PDL (10% или 20%) варьировали для изменения гидрофобности полимера.

Гель-проникающую хроматографию (GPC) использовали для определения молекулярной массы полимера. Все PACE полимеры были способны образовывать комплексы с мРНК и образовывать наноразмерные полиплексы с нейтральным или отрицательным зарядом.

При оценке с использованием анализа RIBOGREEN® все полимеры были способны инкапсулировать мРНК с эффективностью от 55 до 76%. Способность различных PACE полимеров трансфектировать мРНК, экспрессирующую люциферазу (LUC) в клетках HEK-293, использовали для скрининга эффективности трансфекции *in vitro*. Ни один из этих PACE полимеров, представляющих различные структурные модификации, обеспечивал уровни трансфекции, сравнимые с коммерческим агентом TRANSIT®, который использовали в качестве положительного контроля (фиг. 1A-1C). Однако наблюдалась четкая зависимость уровней трансфекции от молекулярной массы полимеров. По мере снижения молекулярной массы полимера с 20 кДа до 5 кДа наблюдали повышение эффективности трансфекции на два порядка ($1,1 \times 10^5$ RLU/мг и $4,4 \times 10^7$ RLU/мг соответственно). Однако эта тенденция, по-видимому, выходит на плато при 5 кДа, поскольку уровень трансфекции резко снижался с использованием PACE с молекулярной массой 2 кДа, что сравнимо с уровнем, полученным со свободной мРНК. По результатам предшествующих исследований сообщалось, что активность и устойчивость электростатического комплексообразования между поликатионами и полианионами

экспоненциально увеличиваются с использованием поликатиона (Akinc et al., Bioconj. Chem., 14 (5) 979e988 (2003), Tsuchida & Osada, Makromol. Chem., 175, (2) 593-601 (1974), Choosakoonkriang et al., J. Pharmaceut. Sci., 92 (8) 1710-e1722 (2003), Schaffer et al., Biotechnol. Bioeng., 67 (5) 598-606 (2000)).

Эти результаты показывают, что очень короткие полимеры (2 кДа) неэффективны для трансфекции, вероятно, за счет слабого комплексообразования мРНК. Выше порогового значения 2 кДа более короткие полимеры (5 кДа) более эффективно доставляют мРНК, чем полимеры с более высокой молекулярной массой (10 кДа или 20 кДа), вероятно, за счет неэффективного высвобождения мРНК из РАСЕ полиплексов с высокой молекулярной массой внутри клеток. Высокомолекулярные РАСЕ цепи содержат большое количество зарядов и гидрофобных доменов, которые приводят к термодинамически стабильному связыванию с мРНК и предотвращают ее высвобождение из полиплексов. Результаты показывают, что эффективная доставка мРНК происходит за счет тонкого баланса молекулярной массы полимера: длина полимерной цепи должна быть достаточно большой, чтобы имело место комплексообразование мРНК и стабилизация полиплекса, но достаточно короткой для высвобождения мРНК внутри клеток. С другой стороны, повышение содержания PDL с 10% до 20% РАСЕ полимера с молекулярной массой 10 кДа не оказывает существенного влияния на эффективность трансфекции (фиг. 1В), не согласуясь с тем, что наблюдали с пДНК, и подтверждая, что структура полимера выигрывает от модуляции для каждого генетического материала.

Данные показывают, что полимеры с молекулярной массой от более чем 2 кДа до менее чем 10 кДа, предпочтительно от 3 кДа до 8 кДа, наиболее предпочтительно 5 кДа, являются наиболее эффективными.

Пример 2: эффективность трансфекции РАСЕ сильно зависит от состава его концевых групп

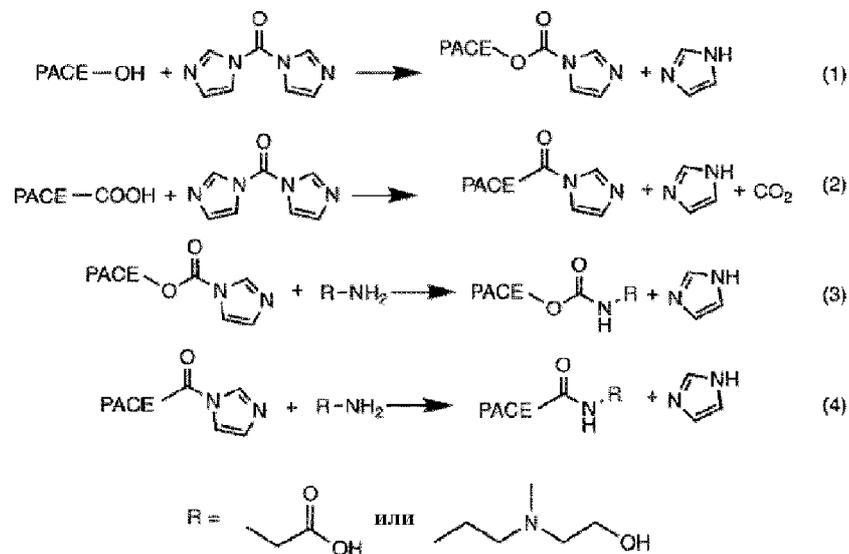
Материалы и методы

Модификация концевых групп полимера

Для получения РАСЕ с различными концевыми группами исходный полимер синтезировали с себациновой кислотой вместо диэтилсебагината, что дает РАСЕ со смесью гидроксильных и карбоксильных концевых групп. Затем обе концевые группы активировали CDI в молярном соотношении 1:40 путем перемешивания в сухом дихлорметане в течение ночи при комнатной температуре. Смесь трижды промывали деионизированной водой с последующим выпариванием DCM в вакууме с получением реагента РАСЕ-CDI (см. схему реакций ниже).

РАСЕ-CDI подвергали взаимодействию с молекулами, содержащими аминогруппы, с получением РАСЕ с новыми концевыми группами. В частности, глицин и АЕМАЕ использовали для получения РАСЕ-СООН и РАСЕ-МАЕ соответственно. Для конъюгации 5 мМ глицина или АЕМАЕ подвергали взаимодействию с 0,5 мМ РАСЕ-CDI в ДМСО в течение 40 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании. После окончания реакции смесь промывали 10-кратным объемом деионизированной воды,

экстрагировали DCM с последующим выпариванием DCM в вакууме с получением PACE-COOH и PACE-MAE. Когда данный протокол адаптировали для синтеза 10 кДа кислого PACE, то 5 кДа PACE-CDI и этилендиамин добавляли в точном молярном соотношении 2:1.



Как показано выше, для получения PACE с концевыми группами -COOH или -MAE кислый PACE активировали CDI (1, 2) с последующим нуклеофильным замещением молекулой, содержащей амин (3,4; R=глицин или АЕМАЕ).

Характеристика полимера

^1H и ^{13}C ЯМР спектры снимали на спектрометре Bruker AVANCE 500. Для ^{13}C ЯМР с обратным стробированием образцы готовили при 50 мг/мл полимера в хлороформе-d и добавляли ацетилацетонат хрома (III) ($\text{Cr}(\text{acac})_3$) в концентрации 5 мг/мл в качестве релаксирующего агента. Сигнал регистрировали с использованием времени релаксации T_1 , равного 10 с. Молекулярные массы (MW) полимеров определяли гель-проникающей хроматографией (GPC) с использованием системы ВЭЖХ Waters, снабженной колонкой microSTYRAGEL (смешанного слоя; размеры пор 100 \AA - 10^6 \AA). В качестве элюента использовали хлороформ, содержащий 0,2 мас.% триэтиламина, со скоростью потока 1 мл/мин. Использовали концентрации образцов 2 мг/мл и объемы инъектирования 100 мкл. Молекулярную массу полимера определяли на основе стандартной калибровочной кривой, полученной с использованием стандартов полистирола с узкой полидисперсностью от Sigma Aldrich (Saint Louis, MO). Программное обеспечение Empower II GPC использовали для работы прибора GPC и выполнения расчетов MW.

Получение и характеристика полиплекса

Если не указано иное, то полиплексы полимер:мРНК готовили при массовом соотношении полимер:мРНК 100:1 в 25 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 5,8). Для экспериментов *in vitro* готовили раствор с концентрацией мРНК 10 мкг/мл: 1 мкл раствора полимера (100 мг/мл в ДМСО) сначала разводили в 50 мкл натрий-ацетатного буфера. После кратковременного встряхивания раствор полимера смешивали с 1 мкг мРНК, растворенной в 50 мл натрий-ацетатного буфера, и снова встряхивали. Смесь

полимер:мРНК перед использованием инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Для экспериментов *in vivo* тем же способом готовили раствор 100 мкг мРНК/мл в натрий-ацетатном буфере.

Гидродинамический диаметр полиплексов измеряли методом динамического светорассеяния (DLS) на приборе Malvern Nano-ZS (Malvern Instruments, Великобритания) после разведения полиплексов в деионизированной воде при концентрации мРНК 2 мкг/мл. Для измерения дзета-потенциала тот же раствор загружали в одноразовую капиллярную ячейку и анализировали на приборе Malvern Nano-ZS.

Эффективность инкапсулирования (ЕЕ) мРНК в полиплексах измеряли с использованием набора Quant-IT RiboGreen RNA (Invitrogen, номер по каталогу R11491) в соответствии с инструкциями производителя. Поскольку с использованием анализа RiboGreen можно измерить количество свободной мРНК в растворе, то это количество вычитали из исходного количества, добавленного для образования полиплексов с получением количества мРНК, комплексированной в полиплексах.

Культивирование клеток

Клетки HEK293 и клетки SH-SY5Y культивировали в среде DMEM с концентрацией 4,5 г/л глюкозы (Gibco #11965) с добавлением 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина при 37°C и 5% CO₂. Клетки Daou культивировали в среде EMEM с 2 mM L-глутамина, 1 mM пирувата натрия и 1500 мг/л бикарбоната натрия (ATCC #30-2003) с добавлением 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина при 37°C и 5% CO₂.

Трансфекция in vitro

Для трансфекции мРНК Fluc *in vitro* клетки высевали в 24-луночные планшеты с плотностью 75000 клеток/лунку в 500 мкл среды и инкубировали в течение ночи для обеспечения адгезии. Среду заменяли на 400 мкл среды для трансфекции (культуральная среда, содержащая 10% FBS, но без пенициллина/стрептомицина), и в каждую лунку добавляли 100 мкл полиплексов (всего 1 мкг мРНК). Для контрольной свободной мРНК, 1 мкг мРНК разводили в 100 мкл ацетатного буфера и вносили в лунки. В качестве контроля использовали коммерческий набор для трансфекции мРНК TransIT. Вкратце, 1 мкг мРНК смешивали с 0,7 мкл реагента Boost и 1,1 мкл реагента TransIT в 100 мкл среды OPTIMEM (Gibco, номер по каталогу 11058021). Через 24 ч после трансфекции измеряли экспрессию люциферазы. Клетки промывали и лизировали, используя 200 мкл 1x буфера для лизиса (Promega, номер по каталогу E397A) и проводили один цикл замораживания-оттаивания при -80°C. Затем 20 мкл лизата смешивали со 100 мкл репортерного люциферазного реагента (Promega, номер по каталогу E1483) и люминесценцию анализировали на люминометре Glomax (Promega). Содержание белка в лизате измеряли с использованием набора для анализа белка Pierce BCA (ThermoFisher, номер по каталогу 23225). Все эксперименты проводили в трех независимых испытаниях в двух повторностях.

Результаты

На фиг. 2 представлена столбчатая диаграмма, показывающая эффективность трансфекции PACE-COOH и PACE-MAE с молекулярной массой 5 кДа или 10 кДа,

синтезированных способами, описанными в примере 2. Статистическую значимость определяли с использованием t-критерия Стьюдента (обозначается следующим образом: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

PACE, синтезированный терполимеризацией диэтилсебагината, PDL и MDEA, содержит смесь метильных (из диэтилсебагината) и гидроксильных (из MDEA) концевых групп. Когда мономер диэтилсебагинат заменяли себагиновой кислотой в синтезе PACE для получения кислого PACE, то его эффективность трансфекции мРНК увеличилась вдвое (фиг. 2). Различные концевые группы одного и того же полимера могут оказывать сильное влияние на эффективность трансфекции пДНК (Sunshine et al., *Biomacromolecules*, 12 (10) 3592e3600 (2011), Sunshine et al., *Mol. Pharm.*, 9 (11) 3375e3383 (2012)). Были проведены эксперименты для определения того, насколько композиции концевых групп также влияют на трансфекцию мРНК и, в частности, могут ли модифицированные концевые группы на PACE улучшить доставку мРНК.

В качестве исходного материала использовали кислый PACE, содержащий смесь концевых карбоксильных и гидроксильных групп с молекулярной массой примерно 5 кДа. Обе эти две концевые группы можно активировать 1,10-карбонилдиимидазолом (CDI), который затем замещали аминоксодержащими молекулами, включая глицин или АЕМАЕ, с образованием карбоксильной (-COOH) концевой группы (PACE-COOH) или (метиламино)этанольной (-MAE) концевой группы (PACE-MAE) соответственно.

PACE с концевыми группами -COOH или -MAE, кислый PACE получали активацией CDI с последующим нуклеофильным замещением аминоксодержащей молекулой (3,4; R=глицин или АЕМАЕ).

Эти два мономера были выбраны, чтобы имитировать встречающуюся в природе смесь концевых групп, обнаруженную в кислом PACE, чтобы идентифицировать концевую группу с более высокой эффективностью трансфекции. Механизм реакции обеспечивает степень превращения обеих концевых групп на уровне более 90%, что подтверждается спектроскопией ЯМР.

Затем оценивали способность этих полимеров трансфектировать мРНК *in vitro*. На фиг. 3А представлена столбчатая диаграмма, показывающая влияние (среднее значение LUC/мг белка) молекулярной массы при использовании классического PACE с 10% содержанием PDL, с молекулярной массой 2 кДа, 5 кДа, 10 кДа и 20 кДа. На фиг. 3В представлена столбчатая диаграмма, показывающая влияние (среднее значение LUC/мг белка) содержания PDL при использовании 10 или 20% PDL классического полимера PACE с молекулярной массой 10 кДа. На фиг. 3С представлена столбчатая диаграмма, показывающая эффективность трансфекции (среднее значение LUC/мг белка) кислого PACE и классического PACE с молекулярной массой 5 кДа при 10% содержанием PDL. Результаты представлены как среднее \pm стандартное отклонение из трех независимых экспериментов, проведенных в двух повторностях.

Достоверные различия в эффективности трансфекции наблюдали между PACE с разными концевыми группами, так полимер PACE-MAE 5 кДа продемонстрировал на два

порядка более высокую эффективность трансфекции, чем PACE-COOH с той же молекулярной массой (фиг. 3С). Такой эффект можно объяснить разницей в ЕЕ этих двух полимеров, поскольку PACE-MAE инкапсулировал 98% всей мРНК, PACE-COOH был способен инкапсулировать только 18%. Хотя кислый PACE с молекулярной массой выше 5 кДа непосредственно не синтезировали за счет технических проблем (трудности в удалении водного побочного продукта по мере увеличения длины полимерной цепи), кислый PACE с 10 кДа может быть получен путем CDI-активации полимеров 5 кДа с последующим поперечным сшиванием двух полимерных цепей молекулой этилендиамина. Когда кислый PACE с молекулярной массой 10 кДа модифицировали либо карбоксильной, либо гидроксильной концевой группой, то его эффективность трансфекции была достоверно выше по сравнению с его аналогами с молекулярной массой 5 кДа (фиг. 3А), означая, что для полимеров PACE-COOH и PACE-MAE эффективность трансфекции увеличивается, когда повышается молекулярная масса.

Такое поведение резко отличается от классического PACE, эффективность трансфекции которого снижается по мере увеличения молекулярной массы, что еще раз демонстрирует важность концевых групп в определении эффективности трансфекции. Хотя ЕЕ PACE-COOH увеличивалась с 18% до 45%, когда его MW увеличивалась с 5 кДа до 10 кДа, то показатель ЕЕ PACE-MAE фактически не сильно изменялся (98% при 5 кДа против 95% при 10 кДа), что указывает на то, что увеличение ЕЕ не является единственным объяснением повышения эффективности трансфекции.

Полученные данные показывают, что вклад концевых групп PACE и MW является более чем аддитивным. В то время как природа концевых групп PACE, по-видимому, способствует их способности образовывать комплекс с мРНК, то MW также играет роль в комплексообразовании и может участвовать в последующих биологических стадиях, таких как высвобождение из эндосом и/или высвобождение мРНК в цитозоле.

Пример 3: актуация PACE «сверху-вниз» для доставки мРНК активированных полимеров PACE

Материалы и методы

Актуация полимеров

Полимеры (20-30 мг) с различной исходной молекулярной массой равномерно распределяли по внутренней поверхности стеклянных флаконов, с образованием тонких пленок для обеспечения эффективного проникновения воздуха. Затем флаконы инкубировали при контролируемой температуре (обычно 37°C) с воздействием потока влажного воздуха в течение различных периодов времени.

Токсичность in vitro

Для оценки цитотоксичности полимеров PACE и TransIT клетки НЕК293 высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 10000 клеток/луноку в 100 мкл среды и инкубировали в течение ночи для обеспечения адгезии. Полиплексы полимер:мРНК или комплексы TransIT/мРНК получали с использованием тех же массовых соотношений, что и для экспериментов по трансфекции, и разбавляли в средах для трансфекции в различных

концентрациях. В лунки добавляли по 100 мкл среды, содержащей полиплексы, до достижения конечных концентраций мРНК в диапазоне от 0,01 до 20 мкг/мл. Через 24 ч инкубации жизнеспособность клеток оценивали с использованием МТТ-анализа. Все эксперименты проводили в трех независимых испытаниях в двух повторностях.

Лиофилизация полиплексов

Полиплексы РАСЕ:мРНК готовили с использованием натрий-ацетатного буфера и к суспензии полиплексов добавляли растворы трегалозы в различных концентрациях (30 мг/мл или 60 мг/мл в 25 мМ натрий-ацетатном буфере, pH=5,8) в объемном соотношении 1:1 для получения конечных концентраций трегалозы 0, 15 или 30 мг/мл. Затем смеси быстро замораживали в жидком азоте и лиофилизировали в течение 2 суток. По окончании лиофилизации полиплексы ресуспендировали в натрий-ацетатном буфере и оценивали эффективность трансфекции на клетках НЕК293. Трансфекцию и оценку экспрессии гена проводили с использованием методов, описанных выше.

Результаты

После начального скрининга с синтезом библиотеки РАСЕ «снизу вверх» молекулярную массу полимера и состав концевых групп идентифицировали в качестве двух важных параметров, определяющих эффективность трансфекции данного материала для мРНК. Эффект молекулярной массы, по-видимому, существенно влияет на эффективность трансфекции в узком диапазоне от 5 кДа до 10 кДа. Подход «сверху-вниз» был адаптирован для одновременного изменения молекулярной массы РАСЕ и концевых групп посредством контролируемого гидролиза полимеров с высокой молекулярной массой. При этом моделировали и идентифицировали концевые группы РАСЕ с более высокой эффективностью трансфекции и MW.

Данный метод позволил создать новое семейство материалов, названных РАСЕ с актуацией (aPASE). Эти биодegradуемые aPASE полимеры давали высокие уровни трансфекции как *in vitro*, так и *in vivo* с проявлением незначительной токсичности.

aPASE получали контролируемым гидролизом сложноэфирного остова. Воздействие воздуха при умеренной температуре обеспечивает мягкие условия для гидролиза РАСЕ, что снижает его молекулярную массу и экспонирует концевые гидроксильные и карбоксильные группы.

Для подтверждения этого, aPASE был охарактеризован с использованием ЯМР-спектроскопии и GPC. ЯМР-анализ aPASE показал, что в результате процесса актуации экспонируются гидроксильные и карбоксильные концевые группы, поскольку наблюдали увеличение площади пика гидроксильной группы (58,2 и 58,9 для aPASE и классического РАСЕ соответственно) и появление четкого пика карбоксила при 178 ppm в aPASE по сравнению с классическим РАСЕ без актуации. Результаты GPC показали, что процесс актуации уменьшал молекулярную массу всех РАСЕ полимеров (фиг. 4).

Гидролиз сложных полиэфиров хорошо известен. Обычно такие реакции могут протекать при высоких температурах, высоком давлении и/или в присутствии катализатора. Наблюдали, что актуация может ускоряться при температуре 100°C по сравнению с 37°C.

Однако использование более мягких температур обеспечивало более воспроизводимый процесс, что приводило к желаемой молекулярной массе aPASE.

Для исследования влияния протокола актуации на эффективность трансфекции PASE для мРНК, тестировали aPASE, полученные из образцов с различными исходными молекулярными массами с различными периодами актуации. Самособирающиеся полиплексы, полученные из aPASE и мРНК, были высокоэффективны при трансфекции клеток HEK293, что приводило к уровням экспрессии люциферазы, сравнимым с положительным контролем, TransIT (фиг. 5A-5B). Эффективность трансфекции, вероятно, зависит от времени актуации и исходной молекулярной массы подвергнутого актуации полимера с оптимальным временем актуации для каждой исходной молекулярной массы (фиг. 5A: 5 суток для полимера с 5 кДа, 10 суток для полимера с 10 кДа, и 30 суток для полимера с 20 кДа). Для такого улучшенного времени актуации все aPASE полимеры обеспечивали уровни трансфекции, сопоставимые с TransIT, и достоверно более высокие уровни трансфекции по сравнению с их не подвергшимися актуации аналогами (фиг. 2, $p < 0,005$).

При тестировании на цитотоксичность в различных концентрациях TransIT вызывал значительную гибель клеток, в то время как при одинаковых количествах доставляемой мРНК все составы aPASE не были цитотоксичными (фиг. 5C).

Процесс ускоренной актуации, при котором полимер 20 кДа подвергался актуации в течение 6 ч при 100°C, приводил к таким же уровням трансфекции, как и полимер 20 кДа с актуацией в течение 30 суток при 37°C (рис. 5D). Несмотря на ускоренный процесс актуации, аналогичный кинетический профиль наблюдали при актуации при 100°C в сравнении с 37°C. Оба процесса показали увеличение эффективности трансфекции до оптимума с последующим падением активности. Данное наблюдение указывает на то, что аналогичный процесс, зависящий от времени, происходит при обеих температурах.

Значения молекулярной массы этих aPASE были близки друг к другу и колебались от 6 кДа до 8 кДа. Учитывая различия в их эффективности трансфекции, данные указывают на быстрые изменения эффективности трансфекции в узком диапазоне молекулярной массы aPASE, подчеркивая ценность для скрининга использования подхода актуации «сверху-вниз». Поскольку средства для доставки должны модифицироваться для переноса различного генетического материала, то управляемый процесс актуации «сверху-вниз» представляет собой простой и эффективный способ оптимизации комбинации молекулярной массы и концевой группы для каждого генетического материала. Преимущество этого процесса заключается в точности тонкой настройки таких ключевых факторов, как молекулярная масса, а также в простоте синтеза дискретной библиотеки полимеров на стадиях актуации из одного и того же исходного материала. В целом, результаты подтвердили, что подход обеспечивает оптимальное сочетание молекулярной массы и конечной группы, адаптированное для доставки мРНК и трансфекции.

Для того, чтобы убедиться в широкой эффективности aPASE, эти полимеры также тестировали на трансфекцию на клетках Daou, клеточной линии медуллобластомы

человека, и на клетках SH-SY5Y, клеточной линии нейробластомы человека. Как наблюдали на клетках HEK293, процесс актуации достоверно увеличивал эффективность трансфекции PACE на обеих клеточных линиях.

Также исследовали влияние лиофилизации на полиплексы aPACE:mРНК. Трегалозу использовали в качестве криопротектора, и эффективность трансфекции оценивали в клетках HEK293 после восстановления полиплексов. Лيوфилизированные полиплексы, приготовленные с использованием aPACE, были также эффективными, как и свежеприготовленные полиплексы, даже в отсутствие криопротектора, и добавление трегалозы в высокой концентрации (6%) несколько повышало эффективность трансфекции.

Пример 4: aPACE эффективен для доставки мРНК *in vivo*

Материалы и методы

*Исследования *in vivo**

Всю работу с животными проводили в Йельском университете в соответствии с рекомендациями Йельского центра ресурсов животных (YARC) и Институционального комитета по уходу и использованию животных (IACUC). В экспериментах использовали самок мышей BALB/c (20 г, Charles River, Willimantic, CT, USA).

Полиплексы PACE:mРНК (0,1 мг/мл в мРНК, N=3), полиплексы aPACE:mРНК (0,1 мг/мл в мРНК, N=3), комплексы TransIT:mРНК (0,1 мг/мл в мРНК, N=3) свободную мРНК, разведенную в натрий-ацетатном буфере (0,1 мг/мл в мРНК, N=3) или натрий-ацетатный буфер (25 мМ, pH 5,8, N=3), вводили внутривенно в хвостовую вену в объеме 200 мкл.

Забор крови из ретроорбитального сплетения (50 мкл) выполняли перед введением частиц и через 6 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч и 7 суток после инъекции. Сразу после забора крови плазму отделяли центрифугированием (3000 g, 10 мин) и замораживали при -80°C до дальнейшего анализа. Концентрацию EPO в плазме измеряли с использованием набора ELISA (R&D Systems). Через 24 ч и 7 суток после инъекции отбирали образцы печени, почек и селезенки, окаршивали гематоксилин-эозином, и независимый патологоанатом проводил исследование на предмет любой аномальной клеточной морфологии. Программное обеспечение GraphPad, La Jolla California, США, www.graphpad.com/) использовали для построения графиков и статистического анализа. Статистическую значимость проверяли с использованием двустороннего непарного t-критерия Стьюдента с уровнем достоверности 95%.

Результаты

Для оценки aPACE полимеров в отношении доставки терапевтически значимой мРНК, их способность доставлять мРНК, экспрессирующую EPO, оценивали на мышах. Два aPACE полимера (PACE 5 кДа с актуацией в течение 5 суток, и PACE 10 кДа с актуацией в течение 10 суток) тестировали и сравнивали с положительным контролем TransIT, который был выбран за счет его доказанной эффективности для доставки мРНК *in vivo* (Kariko et al., Mol. 20 (5) 948e953 (2012)). Подвергшийся актуации в течение 30 суток PACE с 20 кДа не тестировали, так как образующиеся полиплексы были недостаточно стабильными по размеру при высоких концентрациях, необходимых для введения *in vivo*.

Полиплексы мРНК EPO:aPACE вводили внутривенно мышам дикого типа для доставки общей дозы 20 мг мРНК, и кровь отбирали на различные временные точки после инъекции для измерения уровней EPO с использованием ELISA. Полиплексы мРНК с использованием оптимизированных полимеров aPACE продемонстрировали высокую эффективность доставки мРНК EPO, что отражалось на последующей продукции EPO.

Через 6 ч после инъекции PACE 5 кДа без актуации, который был лучшим из не подвергшихся актуации полимеров, продуцировал высокий уровень EPO (530 нг/мл), более высокий, чем положительный контроль TRANSIT® (170 нг/мл). PACE 10 кДа без актуации обеспечивал более низкий уровень EPO (14 нг/мл) через 6 ч, что подтверждает тенденцию, наблюдаемую *in vitro* для не подвергшихся актуации полимеров, согласно которой полиплексы, образованные из полимеров с молекулярной массой выше 5 кДа, обеспечивают более низкую эффективность трансфекции.

На фиг. 5А представлен линейный график, показывающий эффективность трансфекции мРНК люциферазы (среднее значение LUC/мг белка) в зависимости от времени актуации (сутки), демонстрирующий предпочтительное время актуации для каждой молекулярной массы (линии, обозначенные как 20 кДа - нижняя точка данных на сутки 0; 10 кДа - средняя точка данных на сутки 0; 5 кДа - верхняя точка данных на сутки 0). PACE 5 кДа с актуацией не вызывал достоверного увеличения продукции EPO по сравнению с его не подвергшейся актуации формой, но актуация PACE 10 кДа в течение 10 суток при 37°C достоверно увеличивала уровень EPO до 1100 нг/мл (фиг. 5А, $p < 0,0001$).

На фиг. 5В представлена столбчатая диаграмма, показывающая эффективность трансфекции (среднее значение LUC/мг белка) с использованием PACE без актуации и PACE с актуацией с различной начальной молекулярной массой на предпочтительное для них время актуации (5 суток для полимера 5 кДа, 10 суток для полимера 10 кДа, и 30 суток для полимера 20 кДа, $**p < 0,005$). На фиг. 5С представлен линейный график, показывающий профили цитотоксичности (жизнеспособность клеток (%)) полиплексов мРНК:aPACE (5 кДа 5D, 10 кДа 10D, 20 кДа 30D (кластер верхних линий)) по сравнению с комплексами мРНК:TransIT (нижняя линия). Результаты биохимического анализа крови и гистологического анализа показали, что aPACE не вызывает системной токсичности через 24 ч или 7 суток после введения. На фиг. 5D представлена столбчатая диаграмма эффективности трансфекции (среднее значение LUC/мг белка) aPACE с использованием различной температуры актуации ($**p < 0,005$).

На фиг. 6А представлена столбчатая диаграмма, показывающая концентрацию EPO в крови через 6 ч после внутривенного введения мРНК (в целом 20 мг) с использованием TRANSIT®, PACE 5 кДа без актуации, PACE 5 кДа с актуацией в течение 5 суток, PACE 10 кДа без актуации или aPACE 10 кДа с актуацией в течение 10 суток. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение для N=3 животных ($****p < 0,0001$). На фиг. 6С-6F представлен линейный график, показывающий временную динамику продукции EPO после внутривенного введения мРНК (в целом 20 мг) с использованием растворителя (нижняя линия), TransIT (средняя линия), aPACE 10 кДа с

актуацией в течение 10 суток (верхняя линия). Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение для N=3 животных ($***p<0,001$ и $*p<0,05$). На фиг. 6C-6F представлены столбчатые диаграммы, показывающие результаты биохимического анализа крови (АСТ (фиг. 6C), АЛТ (фиг. 6D), мочевины (фиг. 6E), креатинин (фиг. 6F)) через 24 ч и 7 суток после внутривенного введения ацетатного буфера, свободной мРНК или полиплексов мРНК:aPASE. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для N=3 животных.

Как для полиплексов TRANSIT®, так и для полиплексов aPASE продукция ЕРО достигала пика через 6 ч после инъекции. Инъекция ацетатного буфера (растворитель) с последующим повторным отбором образцов крови приводила к небольшому повышению уровня ЕРО в крови во времени, но уровни ЕРО после введения подвергшихся актуации полиплексов PASE 10 кДа были достоверно выше по сравнению с уровнями, полученными после введения TRANSIT® до 48 ч ($p < 0,001$ через 6 ч и $p < 0,05$ через 24 ч и 48 ч).

При использовании наилучшего aPASE полимера (10 кДа с актуацией в течение 10 суток) была достигнута достоверно более высокая продукция ЕРО на 48 ч, что достоверно больше, чем период полувыведения из крови свободного ЕРО (примерно 2 ч).

Полученные результаты демонстрируют, что концевая группа и молекулярная масса PASE влияет на трансфекцию мРНК. Комбинация MW и концевых групп в подвергнутой актуации полимерах обеспечивает эффективное комплексообразование мРНК и трансфекцию *in vitro* и *in vivo*, и низкая катионная плотность PASE обеспечивает низкий профиль токсичности.

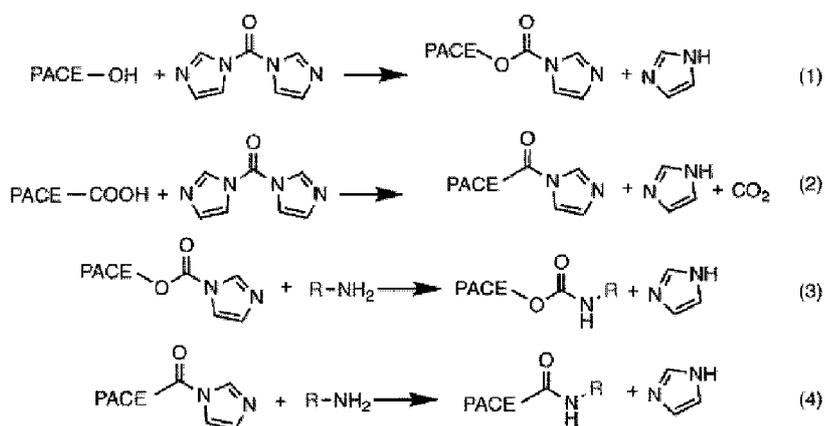
Пример 5: концевые группы PASE влияют на загрузку матричной РНК в полиплексы

Материалы и методы

Синтез PASE полимеров с модифицированными концевыми группами и полиплексов

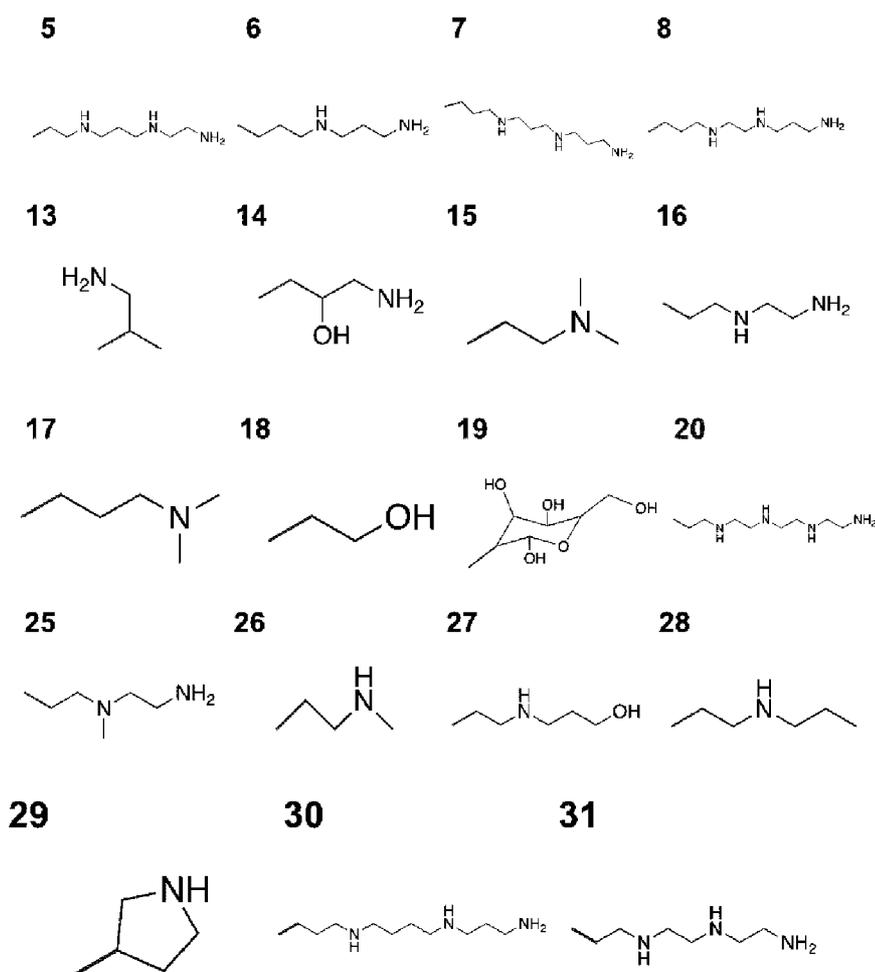
Остов PASE, полученный из катионных диолов, диэтилсебагината и лактонов, имеет смесь концевых гидроксильных и метильных групп (Zhou et al., Nature Materials, 11:82-90 (2012). [PMCID: PMC4180913]).

Для модификации PASE другими концевыми группами, исходный полимер синтезировали с себагиновой кислотой вместо диэтилсебагината, что дает PASE со смесью гидроксильных и карбоксильных концевых групп. Обе две концевые группы активировали карбодиимидазолом (CDI) в молярном соотношении 1:40 посредством перемешивания в сухом дихлорметане (DCM) в течение ночи при комнатной температуре. Смесь трижды промывали деионизированной водой с последующим выпариванием DCM в вакууме с получением реагента PASE-CDI:активация CDI (1, 2) с последующим нуклеофильным замещением аминосодержащей молекулой (3,4), как показано ниже и в примерах 1-4.



Для конъюгации 5 мМ аминоконъюгирующей молекулы подвергали взаимодействию с 0,5 мМ PACE-CDI в ДМСО в течение 40 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании. После окончания реакции смесь промывали 10-кратным объемом деионизированной воды, экстрагировали DCM с последующим выпариванием DCM в вакууме с получением PACE с новыми концевыми группами.

Химическая структура концевых групп показана ниже:



Анализ загрузки мРНК с использованием Ribogreen

Ribogreen представляет собой низкомолекулярный краситель, который излучает флуоресценцию после связывания с матричной РНК. После комплексообразования с PACE

матричная РНК становится недоступной для красителя, и будет наблюдаться более низкий сигнал флуоресценции. мРНК, полиплекс и Ribogreen смешивали и контролировали флуоресценцию.

Анализ поглощения Cy5 мРНК/полиплекса

Белок ddRLuc-Fc и мРНК, кодирующую fLuc, сначала совместно инкапсулировали полимерами PACE, и затем вводили в клетки Expi293F в течение 7 ч в присутствии ингибитора протеасом, эпоксимицина. Затем клетки тестировали с помощью двойного люциферазного анализа для выявления активности RLuc (n=4). Данные нормализовали к TRANSIT® (установленному на 1).

мРНК, меченная Cy5, образовывала полиплексы с PACE с разными концевыми группами, которые вносили в питательную среду для клеток HEK293. Клетки контролировали по флуоресценции.

Анализ высвобождения из эндосом

Высвобождение из эндосом полиплексов, приготовленных с мРНК fLuc с использованием PACE с различными концевыми группами, количественно оценивали с помощью системы ddRLuc.

Результаты

Концевая группа PACE оказывает влияние на загрузку матричной РНК в полиплексы. Результаты анализа Ribogreen приведены на фиг. 7 и очень хорошо согласуются с результатами соответствующего анализа задержки в геле.

Концевая группа PACE влияет на поглощение полиплексов клетками. Результаты анализа поглощения клетками приведены на фиг. 8A-8D. На фиг. 8A схематически показано, что происходит для получения результатов на фигурах 8B, 8C и 8D, демонстрируя эффективность инкапсуляции мРНК, захвата и высвобождения из эндосомы, а также эффективность трансфекции. Эффективность инкапсуляции мРНК количественно оценивали с помощью анализа Ribogreen (n=4). Полимеры, инкапсулирующие мРНК, меченную Cy5, вводили в клетки Expi293F с последующей FACS для количественного определения уровня поглощения (n=3) (фиг. 8B). Статистически достоверные различия анализировали с использованием непарного критерия Стьюдента между каждым полимером с группами мРНК; * обозначает $p < 0,05$, ** обозначает $p < 0,01$, *** обозначает $p < 0,001$, **** обозначает $p < 0,0001$ и n.s. означает отсутствие статистически достоверной разницы.

PACE с разными концевыми группами демонстрировал разную способность к захвату клетками. Концевая группа PACE влияет на высвобождение мРНК из эндосомы. Результаты анализа эндосомального высвобождения с использованием мРНК fLuc и PACE с различными концевыми группами приведены на фиг. 8C.

Химия концевых групп PACE оказывает влияние на эффективность трансфекции полимерной системы для доставки. Эффективность трансфекции PACE измеряли по активности fLuc, продуцированной клетками HEK293. Результаты приведены на фиг. 8D.

На фиг. 9A-9C показана линейная корреляция эффективности трансфекции

(представленной как активность *fluc*) и различными сталями трансфекции, включая загрузку мРНК (фиг. 9А), поглощение (фиг. 9В) и высвобождение из эндосомы (фиг. 9С). По мере того, как биологическая стадия приближается к продукции белка, значения линейной корреляции R2 становятся выше, что указывает на лучшую прогностическую способность.

Пример 6: количественный анализ эндосомального высвобождения библиотеки полимеров для доставки мРНК

Материалы и методы

Синтез полимеров

Синтез PACE проводили, как описано выше, включая несколько модификаций для получения полимеров PACE с разными концевыми группами. Исходный полимер синтезировали с себаценовой кислотой, что дало PACE со смесью гидроксильных и карбоксильных концевых групп. Обе две концевые группы активировали CDI в молярном соотношении 1:40 посредством перемешивания в сухом дихлорметане в течение ночи при комнатной температуре. Смесь трижды промывали деионизированной водой с последующим выпариванием DCM в вакууме с получением реагента PACE-CDI.

Затем PACE-CDI подвергали взаимодействию с аминоксодержащими соединениями (таблица 1) с получением PACE с новыми концевыми группами. Для конъюгации 5 мМ каждого соединения подвергали взаимодействию с 0,5 мМ PACE-CDI в ДМСО в течение 40 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании. После окончания реакции смесь промывали 10-кратным объемом деионизированной воды, экстрагировали ДХМ с последующим выпариванием DCM в вакууме с получением новых полимеров, обозначенных как P1-P31 (таблица 1).

Характеристика полимера

ЯМР ¹H спектры снимали на ЯМР-спектрометре Agilent DD2 400 МГц. Сигнал регистрировали с использованием времени релаксации T1, равного 10 с. Молекулярные массы (MW) полимеров определяли с использованием гель-проникающей хроматографии (GPC) с использованием системы ВЭЖХ Waters, снабженной колонкой microSTYRAGEL (смешанного слоя; размеры пор 100 Å-106 Å). В качестве элюента использовали хлороформ, содержащий 0,2 мас.% триэтиламина, со скоростью потока 1 мл/мин. Использовали концентрации образцов 2 мг/мл и объемы инъектирования 100 мкл. Молекулярную массу полимера определяли на основе стандартной калибровочной кривой, полученной с помощью стандартов полистирола с узкой полидисперсностью от Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, США). Программное обеспечение Empower II GPC использовали для работы прибора GPC и выполнения расчетов MW.

Реакцию модификации концевой группы PACE контролировали по спектру ЯМР. Характерные пики PACE были распределены в диапазоне 1-4,5 ppm. Когда мономер MDEA был концевой группой, то водороды на его концевой стороне смещались с 4,2 (g) к 3,6 (g') ppm и с 2,7 (e) к 2,6 (e') ppm соответственно. Активация CDI приводила к образованию разделенных пиков в области 7-8,5 ppm за счет образования двух разных конъюгатов PACE-

CDI (фиг. S2). Водороды на концевой стороне мономера MDEA смещались с 3,6 (g') к 4,4 (g'') ppm и с 2,6 (e') к 2,8 (e'') ppm соответственно; водороды на концевой стороне мономера себаценовой кислоты смещались с 2,3 (c) к 2,4 (c'') ppm и с 1,5 (b) к 1,7 (b'') ppm соответственно. Затем реакция конъюгации 31 небольшой молекулы была подтверждена исчезновением расщепленных пиков в области 7-8,5 ppm, а также миграцией пиков g'', e'', c'' и b''.

Таблица 1

Перечень концевых групп PACE и характеристика методом динамического светорассеяния полиплексов, полученных с использованием мРНК FLuc с полимерами PACE с разными концевыми группами

| # | Название | CAS # | GPC | | Dh (нм) | | PDI | | дзета-потенциал (мВ) | |
|----|--|------------|-------------------|-----|------------------|------|------------------|-------|----------------------|-----|
| | | | Mw | PDI | среднее значение | sem | среднее значение | sem | среднее значение | sem |
| 1 | 4-аминобутанол | 13325-10-5 | $9,4 \times 10^3$ | 2,2 | 319,9 | 17,3 | 0,418 | 0,066 | -24,4 | 2,0 |
| 2 | N-(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамин | 13531-52-7 | $6,1 \times 10^3$ | 1,4 | 199,4 | 5,1 | 0,189 | 0,012 | -10,0 | 0,4 |
| 3 | 2-амино-2-метил-1-пропанол | 124-68-5 | $1,2 \times 10^4$ | 2,8 | 210,4 | 4,9 | 0,200 | 0,017 | 39,7 | 0,8 |
| 4 | 3-(N-метилпиперазино)пропиламин | 4572-03-6 | $5,5 \times 10^3$ | 2,3 | 236,2 | 9,0 | 0,248 | 0,006 | -7,5 | 2,2 |
| 5 | N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамин | 4741-99-5 | $6,2 \times 10^3$ | 1,6 | 171,4 | 5,2 | 0,298 | 0,025 | 60,7 | 0,4 |
| 6 | Бис (3-аминопропил)амин | 56-18-8 | $6,3 \times 10^3$ | 1,7 | 216,1 | 3,3 | 0,351 | 0,007 | 35,7 | 2,3 |
| 7 | N,N'-бис(3-аминопропил)-1,3-пропандиамин | 4605-14-5 | $9,3 \times 10^3$ | 2,3 | 166,7 | 2,9 | 0,240 | 0,006 | 69,8 | 1,3 |
| 8 | N,N'-бис(3-аминопропил)-1,2-диамин | 10563-26-5 | $6,2 \times 10^3$ | 1,7 | 169,8 | 8,4 | 0,295 | 0,018 | 56,9 | 1,5 |
| 9 | 1,4-бис(3-аминопропил)пиперазин | 7209-38-3 | $6,0 \times 10^3$ | 1,6 | 170,7 | 6,2 | 0,291 | 0,019 | 24,8 | 1,7 |
| 10 | 2,2',2''-триаминаотриэтиламин | 4097-89-6 | $1,0 \times 10^4$ | 2,5 | 179,2 | 3,7 | 0,182 | 0,014 | -51,4 | 2,9 |
| 11 | 3,3-диамино-N- | 105-83-9 | $6,1 \times 10^3$ | 1,6 | 212,9 | 15,3 | 0,116 | 0,009 | -42,2 | 1,2 |

| | | | | | | | | | | |
|----|---------------------------------------|------------|-------------------|-----|-------|------|-------|-------|-------|------|
| | метилдипропиламин | | | | | | | | | |
| 12 | 1,3-диаминопропан | 109-76-2 | $9,6 \times 10^3$ | 2,2 | 149,9 | 4,3 | 0,184 | 0,022 | -53,8 | 1,0 |
| 13 | 1,2-диаминопропан | 78-90-0 | $1,6 \times 10^4$ | 2,1 | 170,8 | 6,4 | 0,225 | 0,054 | -7,5 | 0,9 |
| 14 | 1,3-диамино-2-гидроксипропан | 616-29-5 | $6,7 \times 10^3$ | 1,5 | 332,9 | 73,8 | 0,429 | 0,018 | 16,9 | 17,6 |
| 15 | N, N-диметилэтилендиамин | 108-00-9 | $5,0 \times 10^3$ | 2,7 | 157,2 | 1,7 | 0,178 | 0,010 | 61,2 | 4,4 |
| 16 | Диэтилентриамин | 111-40-0 | $6,4 \times 10^3$ | 1,5 | 161,0 | 2,9 | 0,180 | 0,026 | -32,3 | 1,3 |
| 17 | 1-Амино-3-(диметиламино)пропан | 109-55-7 | $4,3 \times 10^3$ | 2,9 | 132,8 | 4,2 | 0,260 | 0,020 | 69,5 | 1,4 |
| 18 | Этаноламин | 141-43-5 | $1,0 \times 10^4$ | 2,3 | 265,3 | 23,0 | 0,360 | 0,027 | -33,3 | 4,8 |
| 19 | D-(+)-глюкозамин | 66-84-2 | $6,5 \times 10^3$ | 1,8 | 328,9 | 88,5 | 0,436 | 0,043 | -39,9 | 3,6 |
| 20 | Тетраэтиленпентамин | 112-57-2 | $5,7 \times 10^3$ | 1,5 | 152,0 | 4,7 | 0,207 | 0,014 | 64,8 | 2,8 |
| 21 | L-гистидин | 5934-29-2 | $5,0 \times 10^3$ | 1,8 | 194,8 | 3,7 | 0,194 | 0,010 | -28,4 | 4,0 |
| 22 | 2,2,2-трифторэтиламин | 373-88-6 | $4,9 \times 10^3$ | 1,7 | 343,6 | 3,7 | 0,309 | 0,021 | -2,67 | 0,7 |
| 23 | N-(3-гидроксипропил)- этилендиамин | 56344-32-2 | $6,1 \times 10^3$ | 1,9 | 220,1 | 14,3 | 0,180 | 0,014 | -23,8 | 2,3 |
| 24 | 2-метилкадаверин | 15520-10-2 | $5,3 \times 10^3$ | 1,8 | 198,1 | 22,5 | 0,359 | 0,039 | -19,5 | 2,1 |
| 25 | N-метил-2,2'-диаминодиэтиламин | 4097-88-5 | $4,7 \times 10^3$ | 1,8 | 229,5 | 45,1 | 0,326 | 0,062 | 3,1 | 7,3 |
| 26 | N-метилэтан-1,2-диамин | 109-81-9 | $5,5 \times 10^3$ | 1,5 | 141,4 | 5,4 | 0,214 | 0,016 | 66,0 | 1,7 |
| 27 | 2-(2-аминоэтиламино)этанол | 111-41-1 | $6,0 \times 10^3$ | 2,1 | 135,3 | 4,8 | 0,272 | 0,011 | 67,0 | 1,9 |
| 28 | N-пропилэтан-1,2-диамин | 111-39-7 | $4,7 \times 10^3$ | 1,7 | 222,8 | 13,7 | 0,268 | 0,024 | 48,0 | 2,9 |
| 29 | Пирролидин-3-амин | 79286-79-6 | $4,9 \times 10^3$ | 1,7 | 201,1 | 13,1 | 0,224 | 0,011 | -10,4 | 1,3 |
| 30 | Спермин | 71-44-3 | $4,7 \times 10^3$ | 1,7 | 318,9 | 85,4 | 0,374 | 0,068 | 11,9 | 4,1 |
| 31 | Триэтилететрамин | 112-24-3 | $5,8 \times 10^3$ | 1,4 | 214,3 | 18,4 | 0,227 | 0,001 | -0,2 | 1,7 |

Получение и характеристика полиплекса

Если не указано иное, то полиплексы полимер:мРНК готовили при массовом соотношении полимер:мРНК 100:1 в 25 мМ натрий-ацетатном буфере (рН 5,8). Для экспериментов *in vitro* готовили раствор с концентрацией мРНК 10 мкг/мл: 1 мкл раствора полимера (100 мкг/мл в ДМСО) предварительно разводили в 50 мкл натрий-ацетатного буфера. После кратковременного встряхивания раствор полимера смешивали с 1 мкг мРНК, разведенной в 50 мкл натрий-ацетатного буфера, и снова встряхивали. Смесь полимер:мРНК перед использованием инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Для экспериментов *in vivo* тем же способом готовили раствор с концентрацией 100 мкг мРНК/мл в натрий-ацетатном буфере.

Гидродинамический диаметр полиплексов измеряли методом динамического светорассеяния (ДРС) на приборе Malvern Nano-ZS (Malvern Instruments, Великобритания) после разведения полиплексов в деионизированной воде в концентрации мРНК 2 мкг/мл. Для измерения дзета-потенциала тот же раствор загружали в одноразовую капиллярную ячейку и анализировали на приборе Malvern Nano-ZS.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЕМ)

2 мкл наночастиц наносили на сетку для ТЕМ (Electron microscopy sciences, номер по каталогу CF400-Cu-TN). Через 1 мин жидкость осторожно удаляли. Затем на верхнюю часть сетки добавляли одну каплю окрашивающего раствора (Nanoprobes, NANO-W). Через 1 мин жидкость удаляли. Сетку высушивали на воздухе. Изображения получали с использованием ТЕМ (FEI Tecnai Osiris 200kV TEM).

Культивирование клеток

Клетки Expi293F™ (Thermo Fisher, по каталогу A14527) выдерживали при 37°C и 8% CO₂ в среде для экспрессии Expi293™ (Thermo Fisher, номер по каталогу A1435102) при постоянном встряхивании на шейкере для микропланшетов (VWR, номер по каталогу 89032-092).

Очистка ddRLuc-Fc

Плазмиду, кодирующую ddRLuc-Fc, трансфектировали в клетки Expi293F с использованием линейного полиэтиленimina (Polysciences Inc, номер по каталогу 23966). Через 60 ч после трансфекции клетки собирали и ddRLuc-Fc выделяли из клеточного лизата. Клетки лизировали в TBS (10 мМ Трис, 150 мМ NaCl, рН 7,5) с добавлением 0,5-1% Triton X-100 (AmericanBio, номер по каталогу AB02025) и смеси ингибиторов протеазы без ЭДТА (Roche, номер по каталогу 11873580001) при 4°C в течение 1 ч. Затем клеточный лизат очищали центрифугированием при 110000 g в ультрацентрифуге Optima L-100K (Beckman Coulter) в течение 1 ч при 4°C с последующей фильтрацией через фильтр 0,22 мкм (EMD Millipore, номер по каталогу SCGPT01RE). Гранулы белок A-SEPHAROSE® (GE Healthcare, номер по каталогу 17-0780-01) добавляли к отфильтрованному клеточному лизату и инкубировали при 4°C в течение 3 ч с вращением для связывания белка. Гранулы промывали в TBS, и белок элюировали 100 мМ глицина (рН 3,3). Затем элюат нейтрализовали, концентрировали и заменяли буфер на PBS.

Соинкапсуляция мРНК FLuc и ddRLuc-Fc полимерами PACE

Для проверки эффективности соинкапсуляции мРНК, кодирующей зонд FLuc, и ddRLuc-Fc, проводили анализ на замедление подвижности в агарозном геле. Свободная мРНК и белок могут мигрировать в гель, в то время как инкапсулированные продукты оставались в загрузочных лунках.

Горизонтальный электрофорез в агарозном геле

5 мкг ddRLuc-Fc и 1 мкг мРНК, кодирующей FLuc, смешивали со 100 мкг полимеров в общем объеме 18 мкл и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. 2 мкл буфера для загрузки ДНК 10× добавляли к полиплексам с последующей загрузкой в 1% агарозный гель. Миграцию мРНК обнаруживали с использованием УФ-света, и миграцию белков определяли с помощью окрашивания кумасси синим (Bio-rad, номер по каталогу 161-0786).

Люциферазный анализ

Клетки Expi293F сначала обрабатывали 200 нМ эпоксимицина (ArexBio Technology, номер по каталогу A2606) в течение 30 мин при 37°C, и затем добавляли в 96-V-образный планшет, содержащий свободную мРНК (отрицательный контроль), TRANSIT® (Mirus, номер по каталогу MIR2250, положительный контроль) или полимеры, соинкапсулирующие мРНК ddRLuc-Fc и FLuc в количестве 200000 клеток на лунку. Через 7 ч после трансфекции клетки трижды промывали PBS и лизировали в 50 мкл буфера для пассивного лизиса (Promega, номер по каталогу E1910) с добавлением 20 мкМ z-VAD(OMe)-FMK (Abcam, номер по каталогу ab120487) при комнатной температуре в течение 20 мин. Лизат анализировали на высокочувствительном люминометре для микропланшетов Centro XS³ LB 960 (Berthold, номер по каталогу 46970). Люминесценцию RLuc измеряли в течение 1 с использованием нативного Coelenterazine (Nanolight Technology, номер по каталогу 303), и люминесценцию FLuc измеряли в течение 3 с с использованием системы анализа люциферазы (Promega, номер по каталогу E1501). Все независимые эксперименты проводили в трех повторах.

Трансляция in vitro (IVT)

IVT полиплексов, нагруженных мРНК, выполняли с использованием системы лизата ретикулоцитов кролика (Promega, номер по каталогу L4960) в соответствии с инструкциями производителя. Полиплексы, нагруженные 1 мкг мРНК, кодирующей FLuc, инкубировали в 50 мкл смеси лизатов при 37°C в течение 75 мин. Каждые 15 мин из реакционной смеси отбирали образцы в объеме 2 мкл и немедленно замораживали на сухом льду. После сбора образцов активность FLuc во всех образцах измеряли с использованием системы анализа люциферазы (Promega, номер по каталогу E1501). Уровень IVT для конкретного полиплекса оценивали как наклон линии линейной регрессии между активностью FLuc и временем отбора образцов.

Измерение эффективности инкапсуляции

Эффективность инкапсуляции мРНК в полиплексах измеряли с использованием набора Quant-IT RiboGreen RNA (Invitrogen, номер по каталогу R11491) в соответствии с

инструкциями производителя. Поскольку с использованием анализа RIBOGREEN® определяется количество свободной мРНК в растворе, то это количество вычитали из исходного количества, добавленного для образования полиплексов, чтобы получить количество мРНК, закомплексованной в полиплексах.

Сортировка клеток, активируемая флуоресценцией (FACS)

Клетки Expi293F высевали в 24-луночный планшет из расчета 5000 клеток/лунку. Через 12 ч в каждую лунку добавляли наночастицы, инкапсулирующие мРНК Cy5. Через 1 ч клетки собирали для анализа FACS (Life Technologies, Attune NxT).

Результаты

Результаты приведены на фиг. 10А-10В. Уровень IVT для всех полиплексов измеряли по активности FLuc в час. Простой линейный регрессионный анализ между результатом трансфекции мРНК FLuc и уровнем IVT, а также уровнем IVT и эффективностью инкапсуляции проводили с использованием количественных и нормализованных данных. Каждая точка данных представляет полимер PACE, несущий уникальную концевую группу. Прямая линия представляет наилучшее соответствие. Значение R2 помечено.

Влияние концевой группы полимера и пути введения

Уровень трансляции мРНК полиплексов *in vitro* не коррелирует с эффективностью трансфекции. На фиг. 10А и 10В представлены графики, демонстрирующие, что уровень трансляции мРНК полиплексов *in vitro* не коррелирует с эффективностью трансфекции. Уровень IVT для всех полиплексов измеряли по активности FLuc в час. Простой линейный регрессионный анализ между (фиг. 10А) результатом трансфекции мРНК FLuc и уровнем IVT и (фиг. 10В) уровнем IVT и эффективностью инкапсуляции проводили с использованием количественных и нормализованных данных. Каждая точка данных представляет PACE полимер, несущий уникальную концевую группу. Прямая линия представляет наилучшее соответствие. Значение R2 помечено.

Пример 7: получение PACE-ПЭГ смешанных полиплексов и пульмональная доставка состава PACE-полиплекс

Вакцины на основе мРНК являются многообещающей стратегией, которую можно легко адаптировать к вновь появляющимся вирусным штаммам, таким как SARS-CoV-2, но необходимы дополнительные исследования стратегий доставки для разработки оптимальных составов мРНК-вакцин. Библиотека катионных сополимеров полиамина и сложного полиэфира или PACE с различными концевыми группами продемонстрировала, что они являются эффективным и безопасным средством доставки мРНК.

Недавние события, связанные с такими заболеваниями, как COVID-19 и вызванное им заболевание легких, ясно показали, что улучшенные составы для пульмональной доставки имеют решающее значение. Ниже приводятся результаты исследования, в котором полиплексы PACE подвергались скринингу *in vitro* для определения перспективных составов для ингаляционной доставки мРНК в легкие. В исследовании изучали влияние полиэтиленгликоля (ПЭГ) на эффективность трансфекции мРНК и его

роль в стабилизации наночастиц. Дополнительные исследования продемонстрировали высокие уровни трансфекции в легких после легочной доставки полиплексов.

Материалы и методы

Библиотеку PACE полимеров с различными концевыми группами, описанными в приведенных выше примерах и в таблице 1, подвергали скринингу на размер, стабильность и эффективность трансфекции мРНК EGFP в клетках легкого человека A459. Для оптимизации составов полиплексы готовили в буферных растворах с диапазоном pH от 4,8 до 6, и для повышения стабильности полиплекса добавляли небольшие объемы ПЭГ-конъюгированного PACE (PACE-ПЭГ).

Синтез полимеров

Полимеры PACE синтезировали, как описано выше.

Состав полиплекса

Все PACE полиплексы получали при массовом соотношении PACE к мРНК 1:100. Полимер растворяли в ДМСО (100 мг/мл) в течение ночи при 37°C при встряхивании. Для формирования полиплексов мРНК разводили в 25 mM натрий-ацетатном буфере (pH 4,8-6,0) до концентрации 20-200 мкг/мл. В отдельной пробирке растворенный PACE разбавляли 25 mM натрий-ацетатным буфером (pH 4,8-6,0) до концентрации 2-20 мг/мл и встряхивали в течение 15 с. Затем разбавленную мРНК и разбавленный PACE объединяли и встряхивали в течение 25 с. Перед использованием раствор оставляли на 10 мин при комнатной температуре для образования полиплексов. Размер полиплекса и дзета-потенциал определяли с помощью динамического светорассеяния (DLS, Zetasizer Pro, Malvern Analytical).

Для приготовления PACE-ПЭГ смешанных полиплексов, PACE-ПЭГ и PACE растворяли по отдельности в ДМСО в концентрации 100 мг/мл. Растворенный PACE-ПЭГ растворяли в растворенном PACE (с промежуточными разведениями при необходимости) для получения раствора смешанного полимера с желаемой концентрацией PACE-ПЭГ. Затем готовили полиплексы, как описано выше.

Полиплексы, покрытые DSPE-PEG (PEG2k, Nano OCS), получали растворением DSPE-PEG в ДМСО (10 мг/мл). Затем растворенный DSPE-PEG объединяли с PACE в ДМСО (100 мг/мл) в объемном соотношении 1:10. Промежуточные разведения DSPE-PEG в ДМСО готовили по мере необходимости для достижения желаемого конечного соотношения DSPE-PEG к PACE. Затем получали полиплексы, как описано выше, путем замены смеси DSPE-PEG/PACE в ДМСО на PACE в ДМСО.

Исследования стабильности полиплекса

Для оценки стабильности полиплексов полиплексы готовили до конечной концентрации 1 мг/мл в натрий-ацетатном буфере, как описано выше. 20 мкл раствора полиплекса добавляли в пробирки с 1 мл забуференного фосфатом (PBS), и затем образцы помещали в термостат со встряхиванием (300 об/мин, 37°C) и образцы извлекали на разные временные точки для определения размера с помощью DLS. Jiang Y, Lu Q, Wang Y, et al. Quantitating Endosomal Escape of a Library of Polymers for mRNA Delivery. Nano Lett.

2020;20(2):1117-1123. doi:10.1021/acs.nanolett.9b04426.

Скрининг in vitro

Линию клеток легкого человека A549 (ATCC) использовали во всех экспериментах по скринингу *in vitro*. Клетки культивировали в растворе 1:1 DMEM:F12 (GE Healthcare), обогащенной добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, Atlanta Biologicals) и 50 мкг/мл гентамицина, и хранили в термостате при 37°C при 5% CO₂. За 24 ч до доставки полиплекса клетки высевали из расчета 50000 клеток на лунку в 24-луночный планшет. Непосредственно перед доставкой полиплекса клеточную среду обновляли и клетки обрабатывали 0,5 мкг мРНК EGFP (Trilink Biotechnologies) с использованием полиплексов PACE. Через 24 ч после обработки клетки промывали PBS, разделяли с помощью фермента TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific) в течение 15 мин, и затем переносили в 96-луночный круглодонный планшет. Клетки однократно промывали 2% бычьим сывороточным альбумином (BSA) в PBS, и затем окрашивали Zombie Live/Dead Fixable Near IR (Biolegend) в соответствии с инструкциями производителя. После окрашивания клетки еще раз промывали 2% BSA в PBS и затем анализировали проточной цитометрией (Attune NxT). Результаты анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo версия 10.6.2.

Анализ in vivo

Всю работу с животными проводили в Йельском университете в соответствии с рекомендациями Йельского центра ресурсов животных (YARC) и Институционального комитета по уходу и использованию животных (IACUC). Для экспериментов использовали самцов мышей BALB/c (20 г, Charles River, Willimantic, CT, USA). Полиплексы PACE:мРНК (0,1 мг/мл мРНК, N=3), разведенные в натрий-ацетатном буфере, вводили внутривенно или внутрибрюшинно в объеме 200 мкл. Биолюминесценцию *in vivo* (фотон/с/см²/ср) определяли и количественно определяли с помощью IVIS Spectrum (PerkinElmer) через 6 ч после инъекции.

Ингаляционная доставка

Эксперименты *in vivo* проводили на мышах C57BL/6 (доставка мРНК EGFP) и мышах BALB/c (доставка мРНК FLuc) в возрасте 10-30 недель. Растворы полиплекса (10 мг/мл полимера) готовили непосредственно перед введением. Для ингаляционной доставки мышей анестезировали изофлураном и подвешивали за резцы. Язык оттягивали пинцетом и в заднюю часть ротовой полости вводили 5 мкг мРНК в полиплексах PACE. Язык удерживали в оттянутом положении на протяжении 10 вдохов с одновременным вдыханием полиплексов.

Для анализа экспрессии EGFP проточной цитометрией мышей подвергали эвтаназии через 24 ч. Легкие перфузировали 10 мл PBS, и затем 1 мл диспазы (50 ЕД/мл, Corning Life Sciences). Затем интубировали трахею иглой с тупым концом, в легкие вводили 1 мл диспазы (50 ЕД/мл) и закрепляли вдоль трахеи швом. Легкие удаляли и помещали в охлажденный льдом PBS до дальнейшей обработки. Для приготовления суспензии одиночных клеток для проточной цитометрии, легочную ткань измельчали ножницами на

кусочки размером 2-3 мм, переносили в пробирку емкостью 15л с 5 мл ДНКазы 1 (1 мг/мл, Roche Diagnostics) и коллагеназы 1 (5 мг/мл, Worthington Biochemical) в PBS и инкубировали (37°C, при встряхивании) в течение 30 мин. Затем кусочки ткани набирали в шприц на 5 мл с иглой 18 размера 3-5 раз. При последней аспирации жидкость сливали на предварительно смоченный 70-мкм фильтр. С помощью поршня шприца осторожно разрушали оставшуюся ткань на фильтре, фильтр промывали 2 мл 0,5% BSA в PBS и полученную клеточную суспензию центрифугировали в течение 5 мин при 1200 об/мин. Для лизиса оставшихся эритроцитов клетки ресуспендировали в 2 мл лизирующего буфера аммоний-хлорид-калий (АСК) и инкубировали 4 мин при комнатной температуре. Затем буфер нейтрализовали 4 мл 10% FBS в PBS, клетки повторно фильтровали через фильтр 70 мкм и центрифугировали 5 мин при 1200 об/мин. Клетки ресуспендировали в 2% BSA в PBS, переносили в 96-луночный круглодонный планшет и еще раз промывали 2% BSA в PBS. Клетки окрашивали Zombie Live/Dead Fixable Near IR (Biolegend) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки еще раз промывали 2% BSA в PBS и затем анализировали проточной цитометрией. Результаты анализировали с использованием программного обеспечения в FlowJo версия 10.6.2.

Экспрессию люциферазы в легких анализировали с помощью системы визуализации *in vivo* (IVIS, PerkinElmer) и путем прямого анализа экстрагированного белка из легких. Через 6 мин после доставки мРНК мышам внутрибрюшинно вводили 150 мг/кг D-люциферина, анестезировали изофлураном и через 32 мин регистрировали люминесцентный сигнал с помощью IVIS. Через 24 ч мышам повторно вводили D-люциферин (150 мг/кг) и визуализировали через 15 мин. Отбирали образцы легких, селезенки, печени, почек и сердца и анализировали *ex vivo* люминесценцию органов с помощью IVIS через 30 мин после первоначальной инъекции. Затем ткань легкого и селезенки измельчали и помещали в пробирки для лизиса Precellys (Bertin Instruments) с 1 мл лизирующего буфера Glo (Promega) и дважды гомогенизировали при 6500 об/мин в течение 30 с. Лизат переносили в пробирки Эппендорфа и центрифугировали при 21000× g в течение 10 мин для удаления клеточного дебрис. 20 мкл лизата объединяли со 100 мкл D-люциферина (Promega) и измеряли люминесценцию в течение 10 с на люминометре. Значения люминесценции нормировали на общую концентрацию белка, которую измеряли с использованием анализа белка Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты

рН

На фиг. 11 представлен график эффективности трансфекции (в процентах) при рН 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8 и 6,0 для полимеров 2, 4, 14, 15, 16, 17, 20, 25, 27 и 31 из таблицы 1. Результаты демонстрируют оптимальный рН буфера ацетата натрия для РАСЕ полиплексов с различными концевыми группами.

Эффективность трансфекции РАСЕ сильно зависит от рН буфера, и оптимальный рН изменяется в зависимости от концевой группы полимера.

Концентрация ПЭГ

Как показано на фиг. 12А, присутствие PACE-PEG повышало стабильность полиплекса.

На фиг. 12В представлен график эффективности трансфекции (%) для полимеров 14, 15, 16, 17, 25, 27 и 31 из таблицы 1 в зависимости от содержания PACE-ПЭГ (%), 0, 0,05, 0,1, 0,25, 0,50 и 1. На фиг. 12С представлен график экспрессии EGFP в тех же смесях PACE-ПЭГ, показывающий, что ПЭГ повышал экспрессию EGFP, один полимер (P14) сохранял высокую эффективность трансфекции в диапазоне концентраций ПЭГ.

Разработка состава вакцины на основе мРНК для ингаляционной доставки ставит уникальные задачи, особенно в преодолении слизистого барьера при сохранении высокой способности к трансфекции. Покрытия ПЭГ часто используют для увеличения проникновения через слизь, однако покрытие ПЭГ должно быть оптимизировано, чтобы гарантировать, что эффективность трансфекции не будет потеряна.

Полиплексы, покрытые DSPE-PEG (PEG2k, Nano OCS), получали растворением DSPE-PEG в ДМСО (10 мг/мл). Затем растворенный DSPE-PEG объединяли с PACE в ДМСО (100 мг/мл) в объемном соотношении 1:10. Промежуточные разведения DSPE-PEG в ДМСО готовили при необходимости для достижения желаемого конечного соотношения DSPE-PEG к PACE. Затем формировали полиплексы, как описано выше, путем замены смеси DSPE-PEG/PACE в ДМСО на PACE в ДМСО.

Влияние ПЭГ на эффективность трансфекции и экспрессию генов показано на фиг.13А-13С. На фиг. 13А представлен график зависимости эффективности 0%, 0,01%, 0,1%, 1% или 10% DSPE-PEG от размера (нм) и полидисперсности. На фиг. 13В представлен график влияния содержания DSPE-PEG на эффективность трансфекции (%) для полимеров 14, 15, 16, 17, 25, 27 и 31 из таблицы 1. На фиг. 13С представлен график влияния концентрации DSPE-PEG (0, 0,05, 0,10, 0,25, 0,50, 1,0, 2,5 и 5%) на экспрессию EGFP.

Путь введения влияет на распределение в тканях

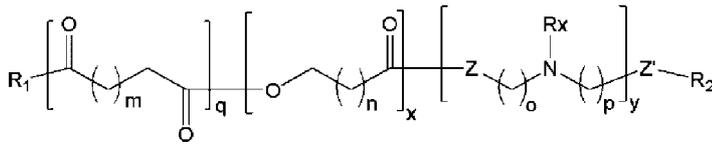
Как показано на фиг. 14А и 14В, распределение биолюминесценции через 6 ч после в/в инъекции и в/б инъекции до вскрытия показывают, что полиплексы в первую очередь распределяются в селезенке, и затем в селезенке, печени и кишечнике при инъекции.

Напротив, как показано на фиг. 15, введение в легкие показывает неожиданно высокие концентрации в легких с небольшой экспрессией в других тканях.

Этим установлено, что этот состав является эффективным и высокоселективным средством доставки нуклеиновой кислоты, такой как мРНК, в легкие, который вводят пульмонально.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полимер формулы I:

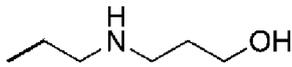


формула I

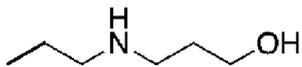
где n представляет собой целое число 1-30, m, o и p независимо представляют собой целые числа 1-20, x, y и q независимо представляют собой целые числа 1-1000, R представляет собой атом водорода, замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный арил или замещенный или незамещенный алкокси, Z и Z' независимо представляют собой O или NR', где R' представляет собой атом водорода, замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный арил,

где R₁ и R₂ представляют собой химические группы, содержащие гидроксильную группу, первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу, третичную аминогруппу или их комбинации.

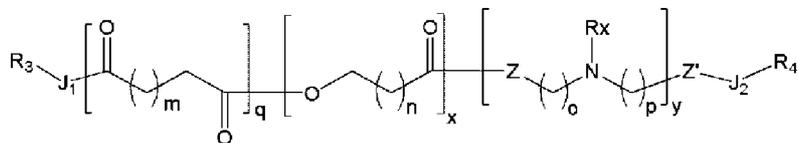
2. Полимер по п. 1, где R₁ и/или R₂ не являются:



3. Полимер по п.1, где полиплексы или частицы, образованные из полимера, демонстрируют улучшенную загрузку, улучшенную клеточную трансфекцию, улучшенное внутриклеточное эндосомальное высвобождение или комбинацию этого мРНК по сравнению с соответствующими полиплексами или частицами, где R₁ и/или R₂ состоят из:



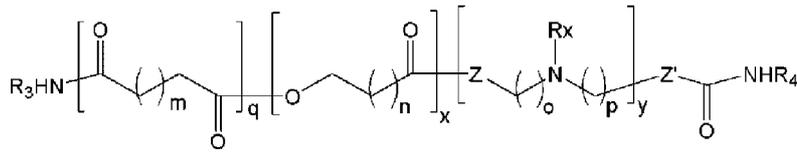
4. Полимер по п. 1, где полимер имеет структуру формулы II:



формула II

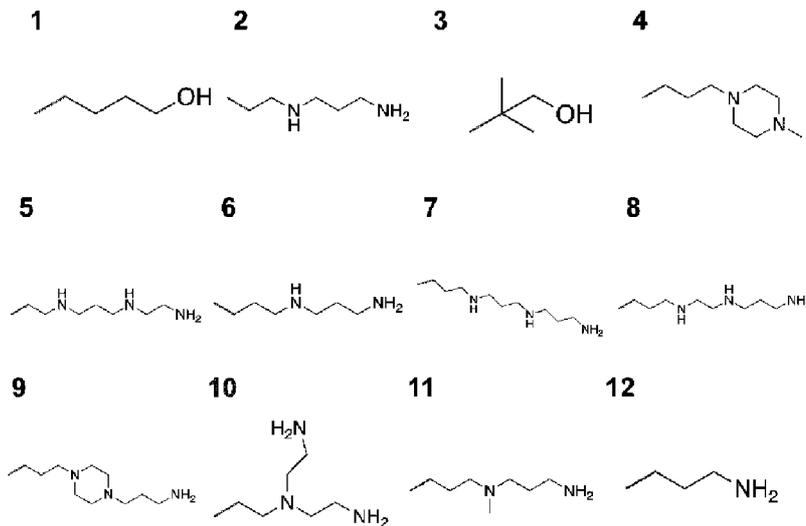
где J₁ и J₂ независимо представляют собой связывающие группы или отсутствуют, R₃ и R₄ представляют собой замещенный алкил, содержащий гидроксильную группу, первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу, третичную аминогруппу или их комбинации.

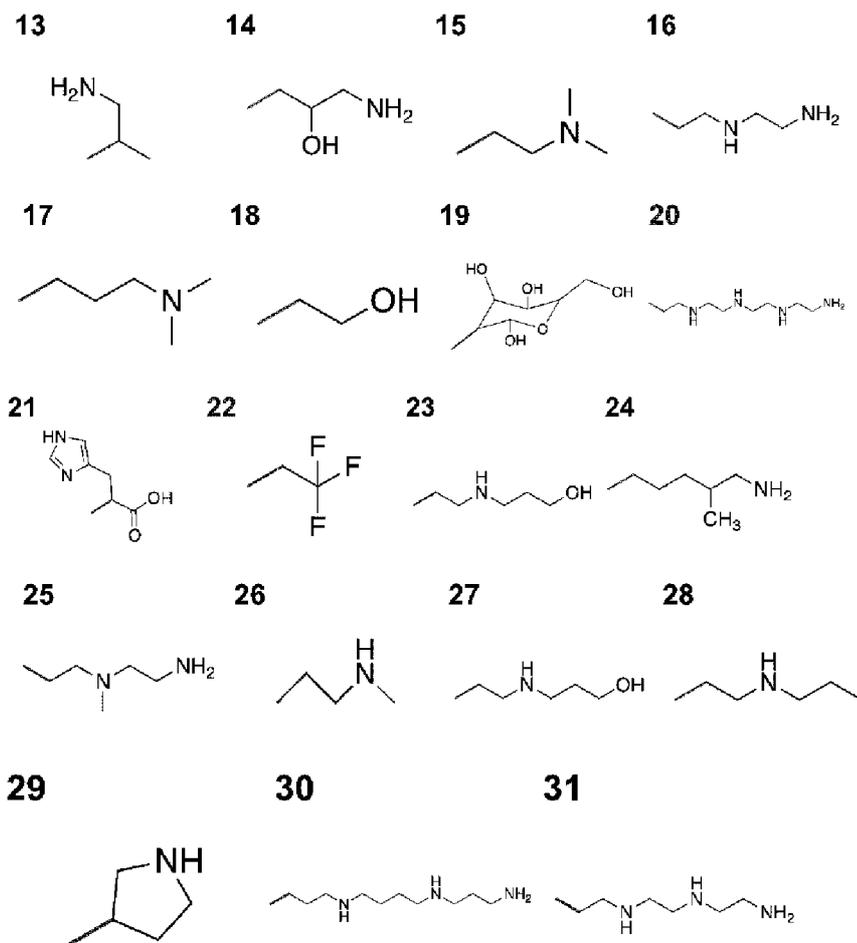
5. Полимер по п. 1, где полимер имеет структуру формулы III:



формула III

6. Полимер по п. 1, где Z является таким же, как Z' .
7. Полимер по п. 1, где n равно 4, 10, 13 или 14.
8. Полимер по п. 1, где m равно 5, 6 или 7.
9. Полимер по п.1, где R_x представляет собой замещенный или незамещенный алкил.
10. Полимер по п. 1, где средневесовая молекулярная масса, измеренная гелепроникающей хроматографией с использованием стандартов полистирола с узкой полидисперсностью, составляет примерно от 2000 до 20000 дальтон, предпочтительно примерно от 2000 до примерно 10000 дальтон, наиболее предпочтительно примерно 2000 дальтон и примерно 7000 дальтон.
11. Полимер по п.4, где R_3 является таким же, как R_4 .
12. Полимер по п. 4, где R_3 и/или R_4 независимо выбраны из группы, состоящей из:





13. Полимер по п.4, где J_1 представляет собой -O- или -NH, J_2 представляет собой -C(O)NH- или -C(O)O- или их комбинацию.

14. Полимер по п.4, где R_3 , R_4 или оба содержат первичную аминогруппу и необязательно одну или более вторичных или третичных аминогрупп.

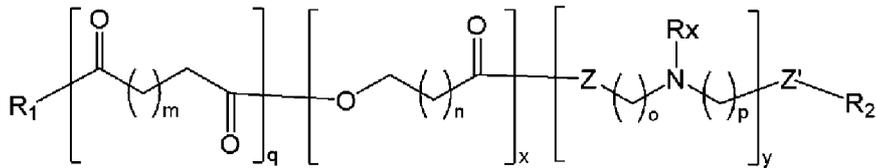
15. Полимер по п.4, где R_3 , R_4 или оба содержат гидроксильную группу и необязательно одну или более аминогрупп.

16. Полимер по п.4, где R_3 , R_4 или оба содержат гидроксильную группу и не содержат аминогруппы.

17. Полимер по п.4, где по меньшей мере один из R_3 и R_4 не содержит гидроксильной группы.

18. Полимер по п.4, где R_3 , R_4 или оба представляют собой -незамещенный C_1 - C_{10} алкилен-Aq-незамещенный C_1 - C_{10} алкилен-Bq, -незамещенный C_1 - C_{10} алкилен-Aq-замещенный C_1 - C_{10} алкилен-Bq, - замещенный C_1 - C_{10} алкилен-Aq-незамещенный C_1 - C_{10} алкилен-Bq или -замещенный C_1 - C_{10} алкилен-Aq-замещенный C_1 - C_{10} алкилен-Bq, где Aq отсутствует или представляет собой -NR₅-, и Bq представляет собой гидроксил, первичный амин, вторичный амин или третичный амин, где R₅ представляет собой атом водорода, замещенный или незамещенный алкил или замещенный или незамещенный арил.

19. Полимер по п.1, где сополимеры полиамина и сложного полиэфира или сополимеры полиамина и полиамида имеют структуру:



формула I

где n представляет собой целое число 1-30,

m, o и p независимо представляют собой целые числа 1-20,

x, y и q независимо представляют собой целые числа 1-1000,

R_x представляет собой атом водорода, замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный алкокси,

Z и Z' независимо представляют собой O или NR', где R' представляет собой атом водорода, замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный арил,

R_1 и R_2 представляют собой химические группы, содержащие гидроксильную группу, первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу, третичную аминогруппу или их комбинации.

20. Полимер по п.19, где Z является таким же, как Z'.

21. Полимер по п.20, где Z представляет собой O и Z' представляет собой O, Z представляет собой NR' и Z' представляет собой NR'.

22. Полимер по п.19, где Z представляет собой O и Z' представляет собой NR' или Z представляет собой NR' и Z' представляет собой O.

23. Полимер по п.19, где Z' представляет собой O, и n представляет собой целое число 1-24, такое как 4, 10, 13 или 14, где необязательно Z также представляет собой O.

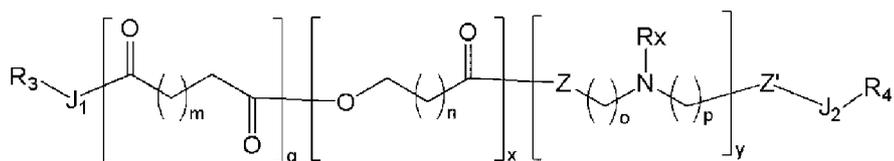
24. Полимер по п.23, где m представляет собой целое число 1-10, такое как 4, 5, 6, 7 или 8, где необязательно Z также представляет собой O.

25. Полимер по п.19, где Z' представляет собой O, n представляет собой целое число 1-24, такое как 4, 10, 13 или 14, m представляет собой целое число 1-10, такое как 4, 5, 6, 7 или 8, и o и p представляют собой одно и то же целое число 1-6, такое как 2, 3 или 4, где необязательно Z также представляет собой O.

26. Полимер по п.19, где Z' представляет собой O, n представляет собой целое число 1-24, такое как 4, 10, 13 или 14, m представляет собой целое число 1-10, такое как 4, 5, 6, 7 или 8, и R представляет собой алкил, такой как метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, изобутил, втор-бутил, циклогексил, (циклогексил)метил, циклопропилметил, или гомологи и изомеры, например, н-пентил, н-гексил, н-гептил и н-октил, или арил, такой как фенил, нафталил, антраценил, фенантрил, хризенил, пиренил, толил или ксиллил, необязательно, где Z также представляет собой O.

27. Полимер по п.19, где n равно 14, необязательно пентадекалактон (PDL), m равно 7, необязательно себациновая кислота, и o и p равны 2, необязательно N-метилдиэтанолламин (MDEA).

28. Полимер по п.1, имеющий структуру формулы II:



формула II

где R_x , Z , Z' , m , n , o , p , q , x и y имеют значения, определенные выше для формулы I, J_1 и J_2 независимо отсутствуют или представляют собой связывающие группы, такие как $-C(O)-$, $-C(O)NH-$, $-C(O)O-$, $-O-$ и $-NH-$,

R_3 и R_4 в формуле II независимо представляют собой замещенный алкил, содержащий гидроксильную группу, первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу, третичную аминогруппу или их комбинации.

29. Полимер по п.28, где:

J_1 представляет собой $-O-$ или $-NH-$ и

J_2 представляет собой $-C(O)-$, $-C(O)NH-$ или $-C(O)O-$.

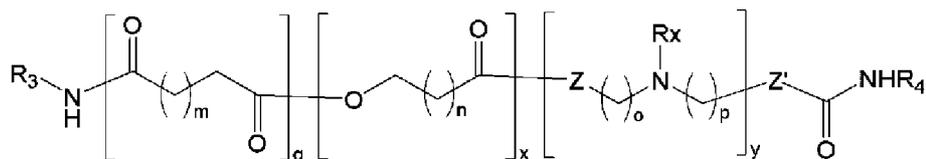
30. Полимер по п.28, где R_3 идентичен R_4 , где необязательно R_3 и/или R_4 являются линейными.

31. Полимер по п.30, где R_3 , R_4 или оба содержат гидроксильную группу, и, необязательно, R_3 , R_4 или оба содержат гидроксильную группу и одну или более аминогрупп, необязательно вторичные или третичные аминогруппы.

32. Полимер по п.28, где R_3 , R_4 или оба содержат гидроксильную группу и не содержат аминогруппы.

33. Полимер по п.28, где по меньшей мере один из R_3 и R_4 не содержит гидроксильной группы.

34. Полимер по п.1, имеющий структуру формулы III:



формула III

где R_x , Z , Z' , m , n , o , p , q , x и y имеют значения, определенные выше для формулы I, J_1 и J_2 независимо отсутствуют или представляют собой связывающие группы, такие как $-C(O)-$, $-C(O)NH-$, $-C(O)O-$, $-O-$ и $-NH-$,

R_3 и R_4 в формуле II независимо представляют собой замещенный алкил, содержащий гидроксильную группу, первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу, третичную аминогруппу или их комбинации.

35. Полимер по п.34, где:

J_1 представляет собой $-O-$ или $-NH-$ и

J_2 представляет собой $-C(O)-$, $-C(O)NH-$ или $-C(O)O-$.

36. Полимер по п.34, где R_3 идентичен R_4 , где необязательно R_3 и/или R_4 являются

линейными.

37. Полимер по п.34, где R_3 , R_4 или оба содержат гидроксильную группу, и, необязательно, R_3 , R_4 или оба содержат гидроксильную группу и одну или более аминогрупп, необязательно вторичные или третичные аминогруппы.

38. Полимер по п.34, где R_3 , R_4 или оба содержат гидроксильную группу и не содержат аминогруппы.

39. Полимер по п.34, где по меньшей мере один из R_3 и R_4 не содержит гидроксильной группы.

40. Полимер по любому из пп.19-39, где средневесовая молекулярная масса полимера составляет более 20000 дальтон, более 15000 дальтон, более 10000 дальтон, более 5000 дальтон или более 2000 дальтон.

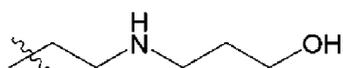
41. Полимер по п.40, где средневесовая молекулярная масса полимера составляет примерно от 2000 до примерно 20000 дальтон, более предпочтительно примерно от 5000 до примерно 10000 дальтон.

42. Полимер по любому из пп.19-41, полученный из одного или более лактонов, одного или более аминдиолов (Z и $Z'=O$) или триаминов (Z и $Z'=NR'$) и одной или более двухосновных кислот или диэфиров, где при использовании двух или более различных мономеров лактона, двухосновной кислоты или диэфира и/или триамина или аминдиола значения n , o , p и/или m могут быть одинаковыми или разными.

43. Полимер по любому из пп.19-42, сформированный в виде полиплексов или их частиц.

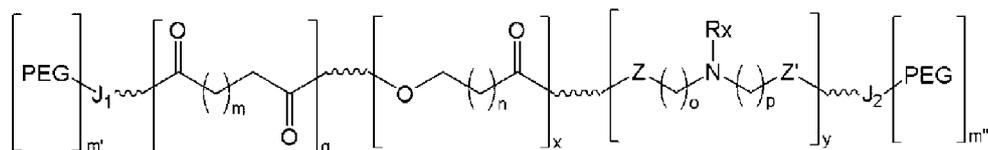
44. Полимер по п.43, сформированный в виде полиплексов или их частиц, с инкапсулированными в них одной или более нуклеиновыми кислотами.

45. Полимер по п.44, где полиплексы или частицы образованы из полимера, где R_1 и/или R_2 не состоят из или не включают:



46. Полимер по п.44, сформированный в виде полиплексов или их частиц, где сополимеры полиамина и сложного полиэфира или сополимеры полиамина и полиамида находятся в смеси, содержащей сополимеры полиамина и сложного полиэфира или сополимеры полиамина и полиамида, конъюгированные с полиэтиленгликолем (ПЭГ), т.е. ПЭГ-конъюгированные сополимеры полиамина и сложного полиэфира или сополимеры полиамина и полиамида.

47. Полимер по п.46, где ПЭГ-конъюгированные сополимеры полиамина и сложного полиэфира или сополимеры полиамина и полиамида содержат структуру:



формула XI

где m' и m'' независимо равны 0 или 1, при условии, что $m' + m''$ равно 1 или 2,

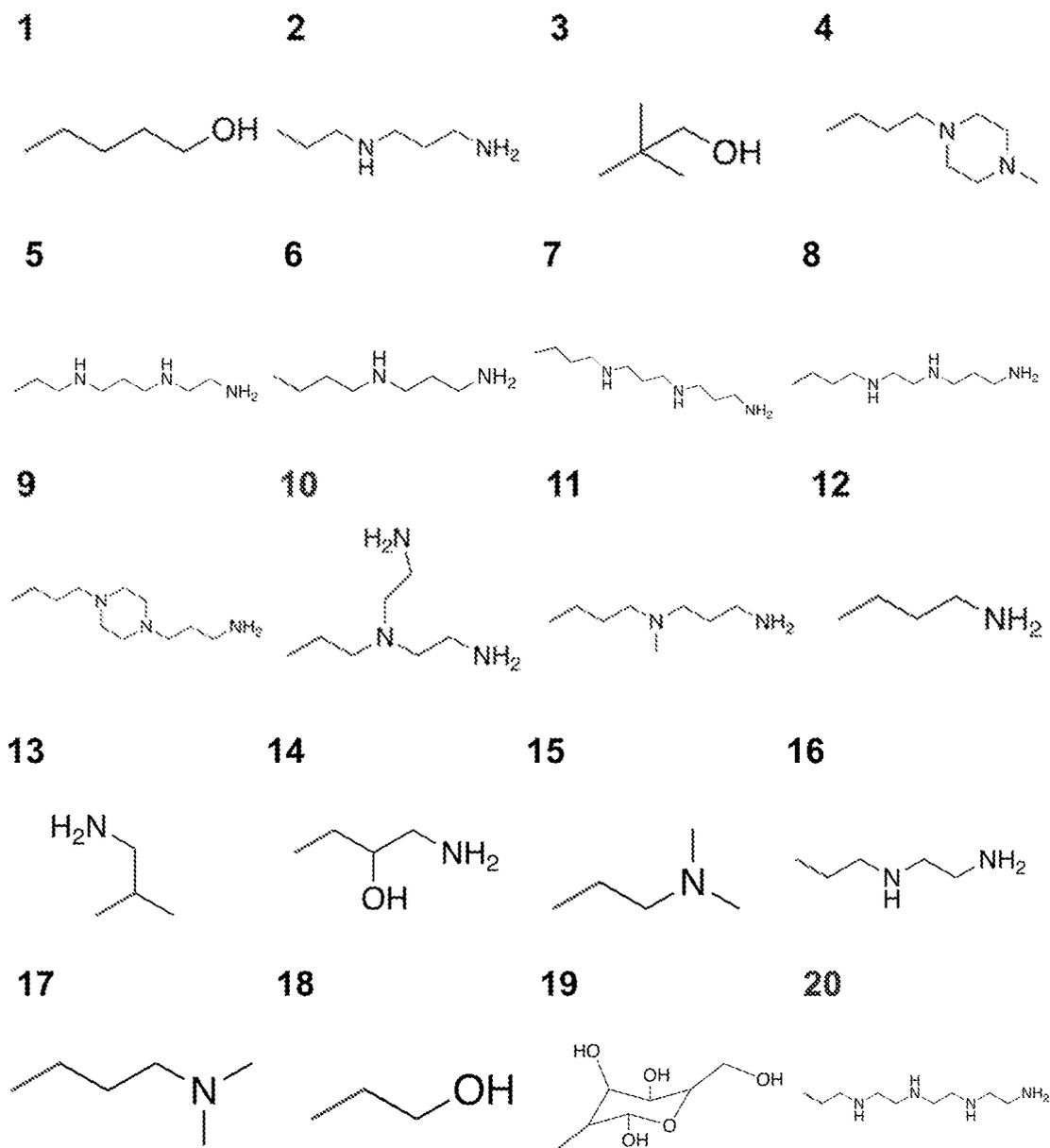
J_1 и J_2 в формуле XI независимо отсутствуют или представляют собой связывающие группы, такие как -C(O)-, -C(O)NH-, -C(O)O-, -O- и -NH-.

В некоторых формах формулы XI, J_1 представляет собой -O- или -NH-. В некоторых формах формулы XI, J_2 представляет собой -C(O)-, -C(O)NH- или -C(O)O-.

48. Способ введения одного или более терапевтических, диагностических или профилактических средств на основе нуклеиновых кислот или их комбинаций *in vivo*, включающий введение полимера в форме полиплекса или частиц по любому из пп. 1-47 в клетки или субъекту, нуждающемуся в этом.

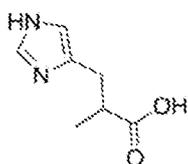
49. Способ по п.48, включающий трансфекцию клеток посредством приведения в контакт клеток с частицами или полиплексом.

50. Способ по п.48, где полиплекс или частицы вводят в легкое.

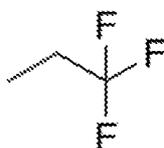


ФИГ. 1

21



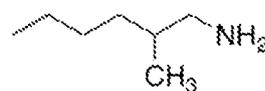
22



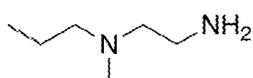
23



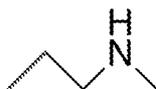
24



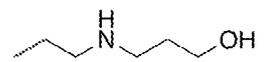
25



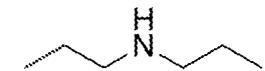
26



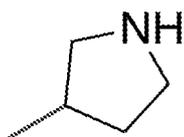
27



28



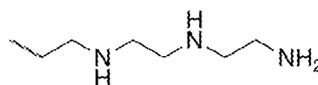
29



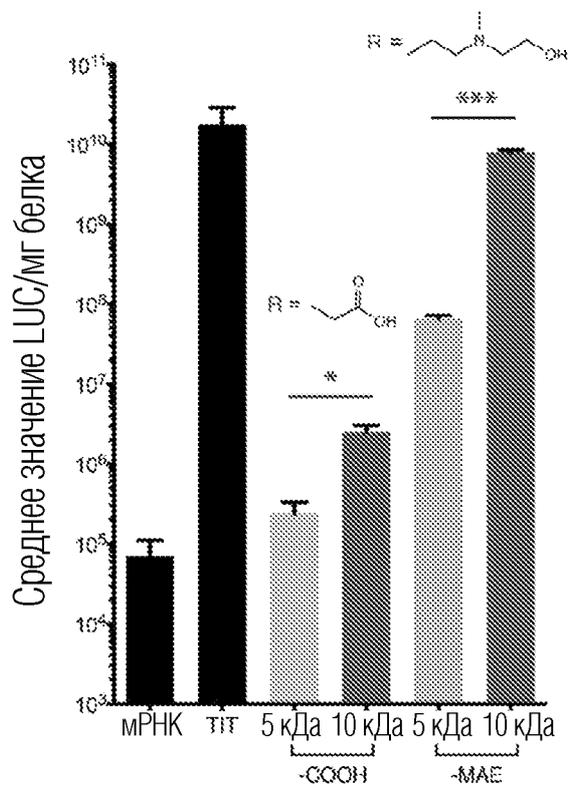
30



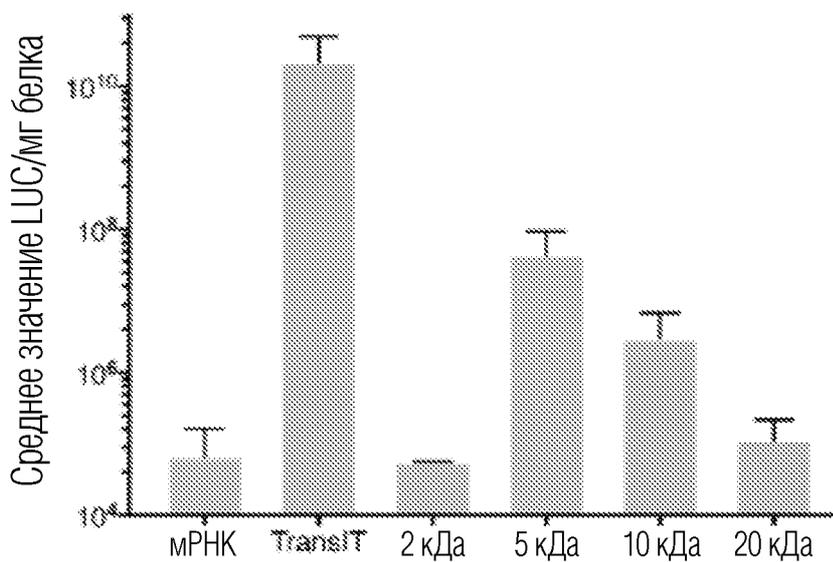
31



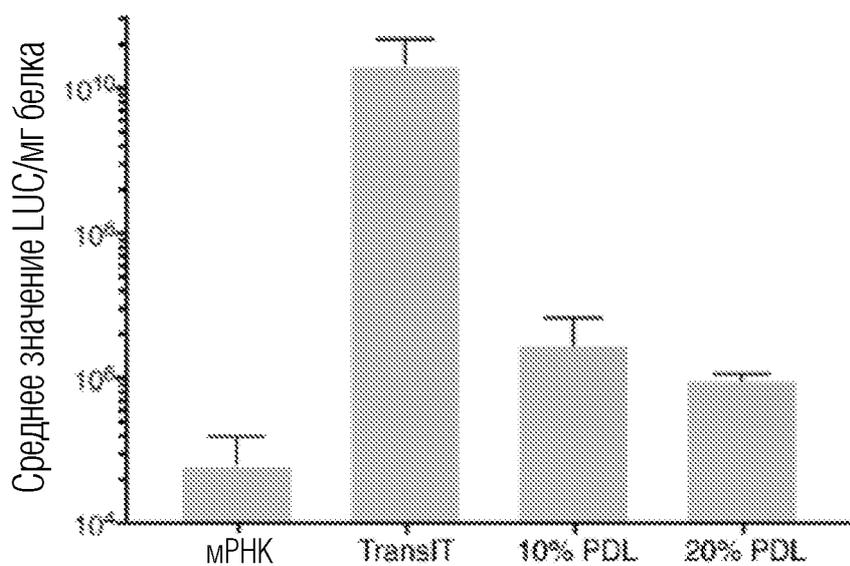
ФИГ. 1 продолжение



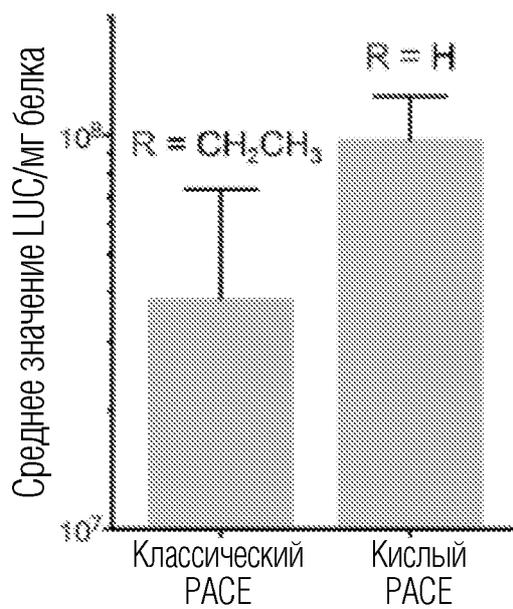
ФИГ. 2



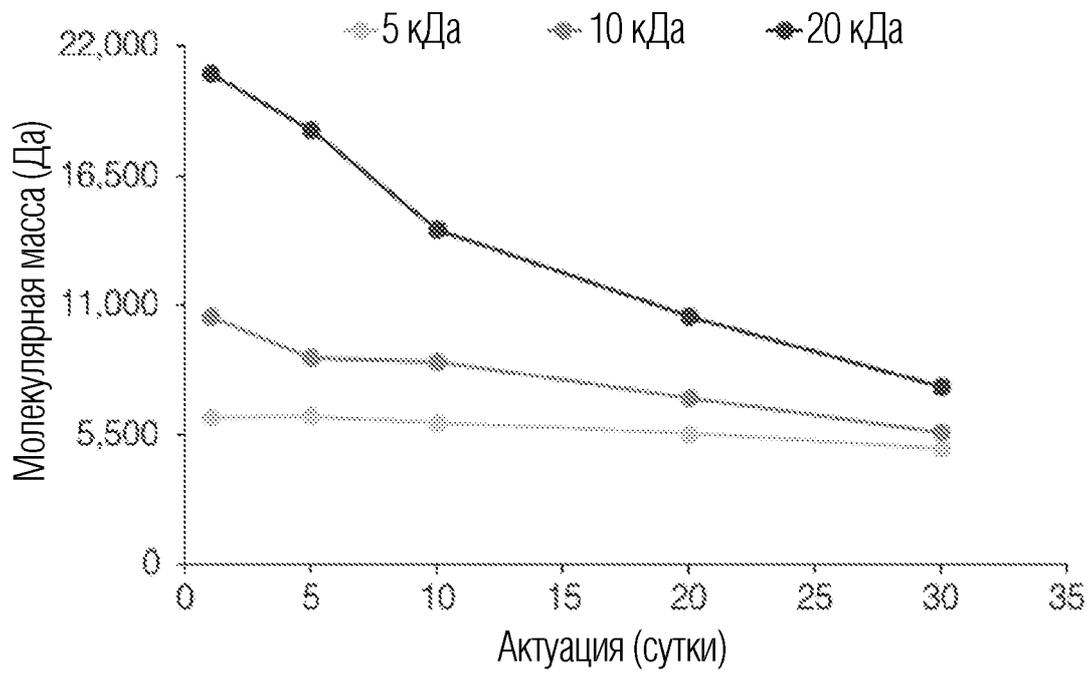
ФИГ. 3А



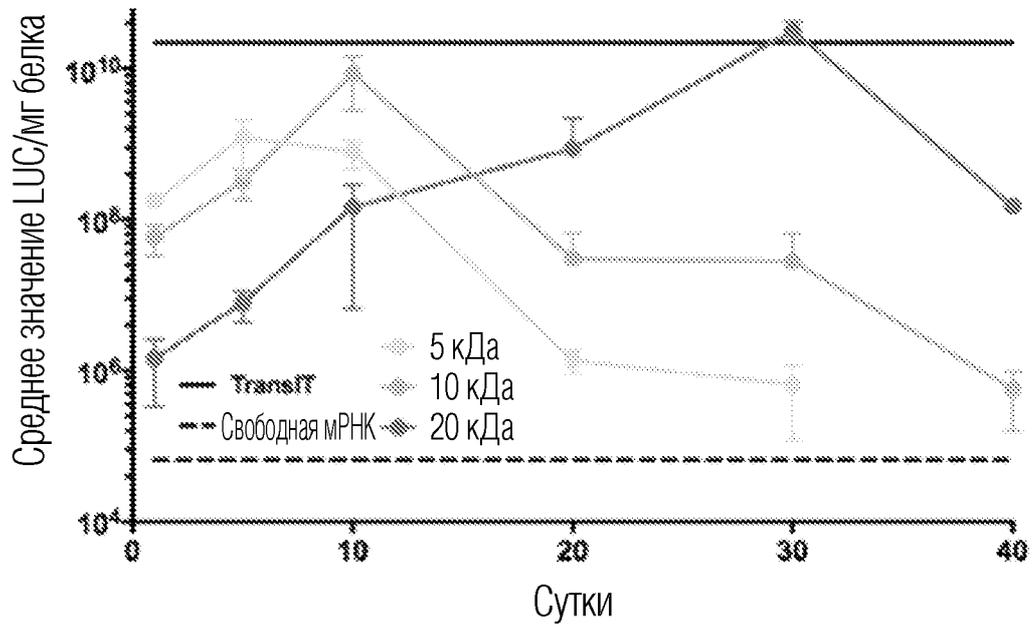
ФИГ. 3В



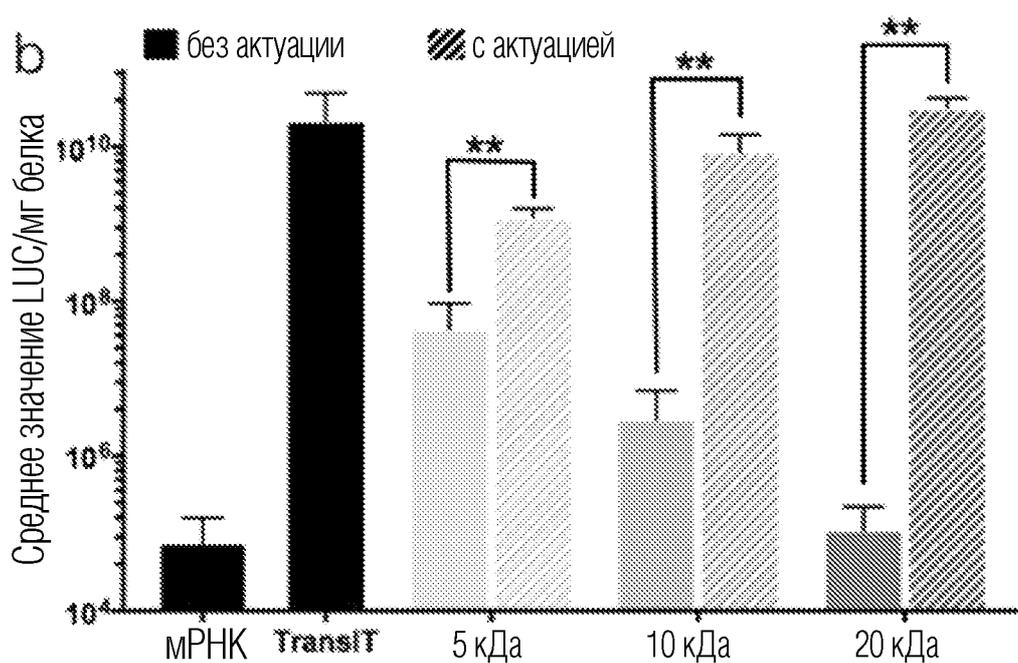
ФИГ. 3С



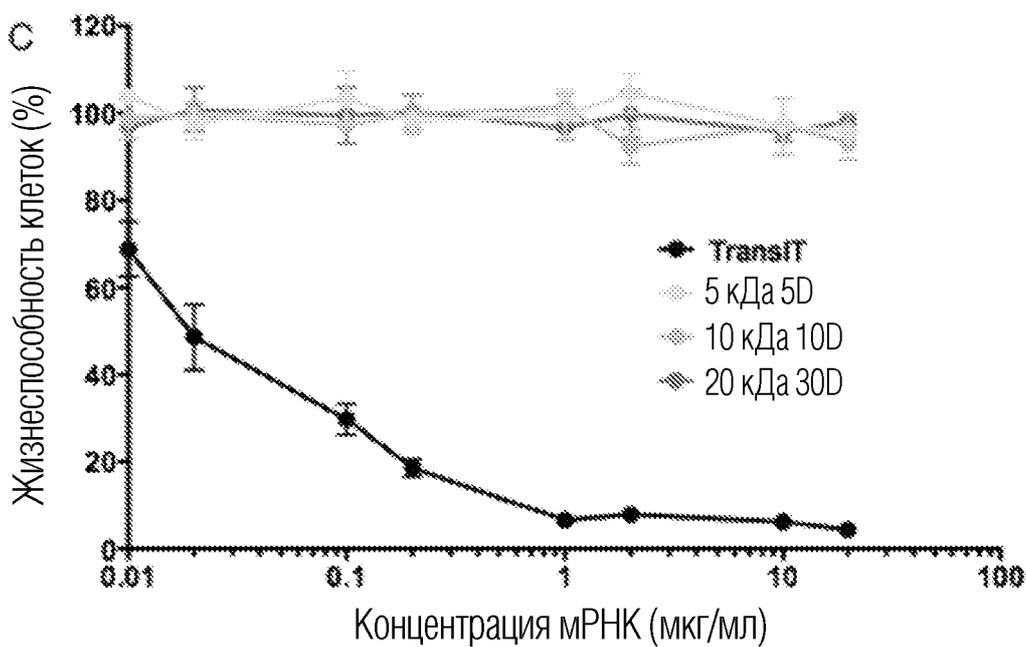
ФИГ. 4



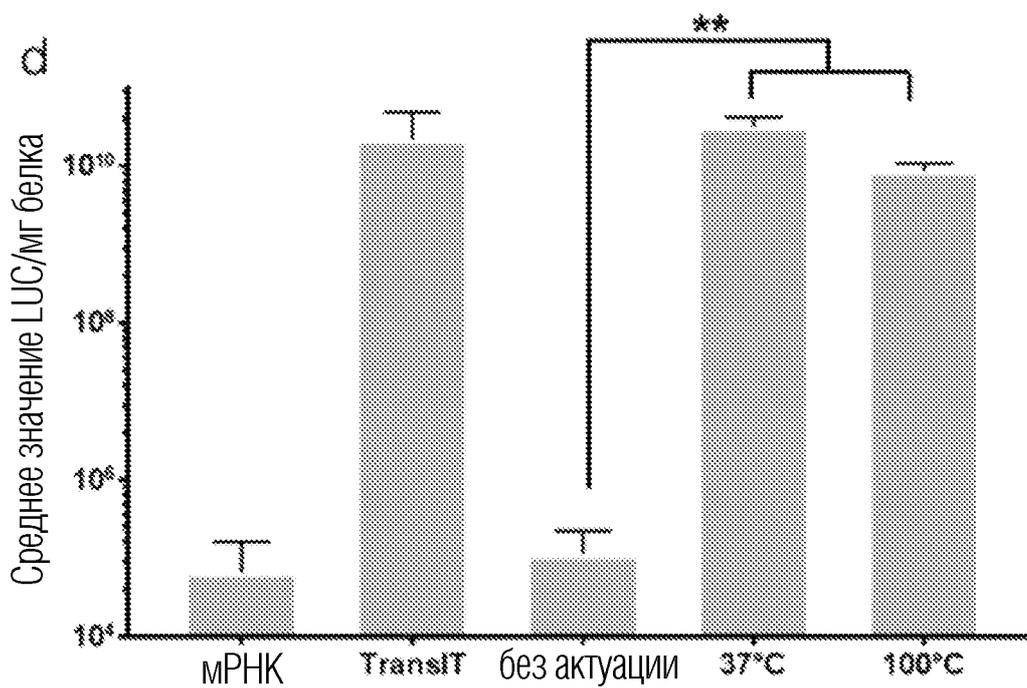
ФИГ. 5А



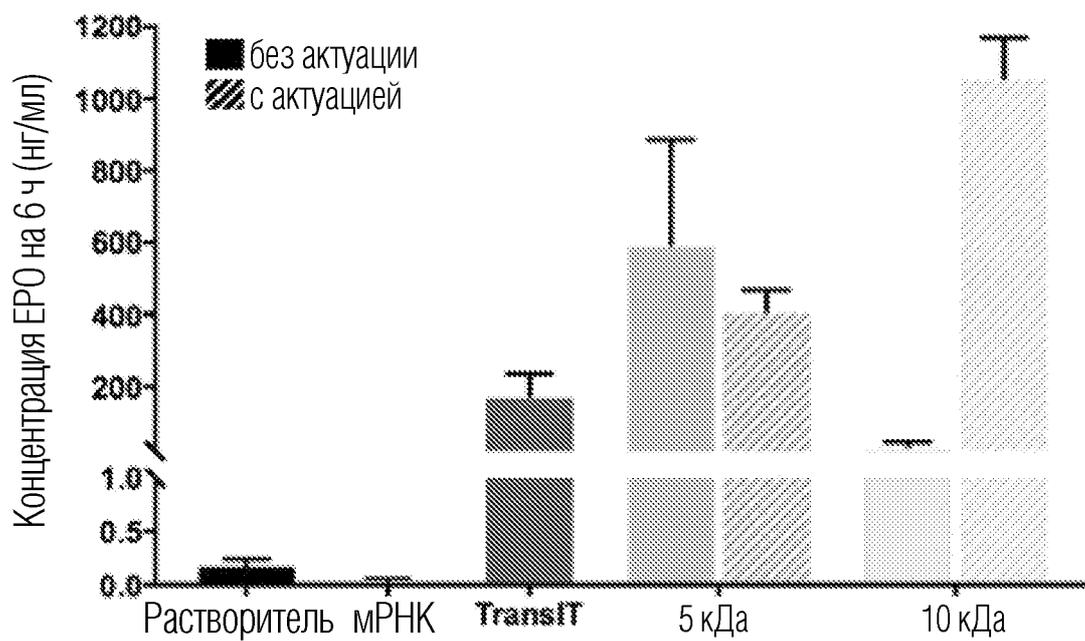
ФИГ. 5В



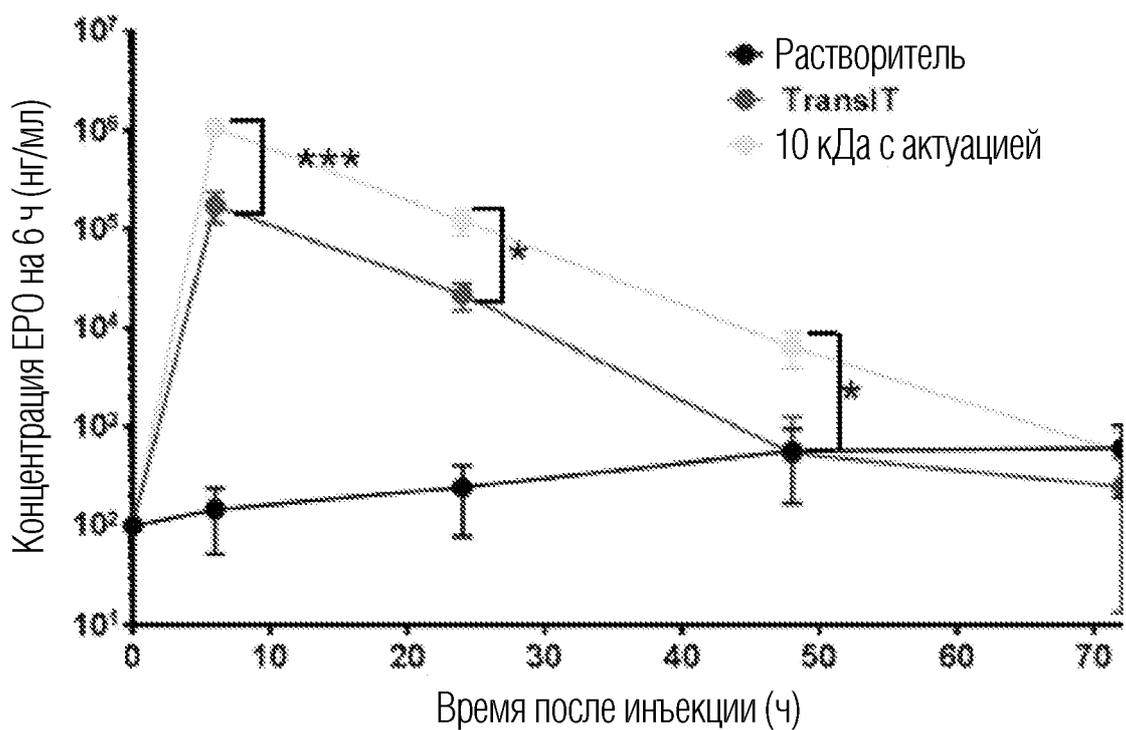
ФИГ. 5С



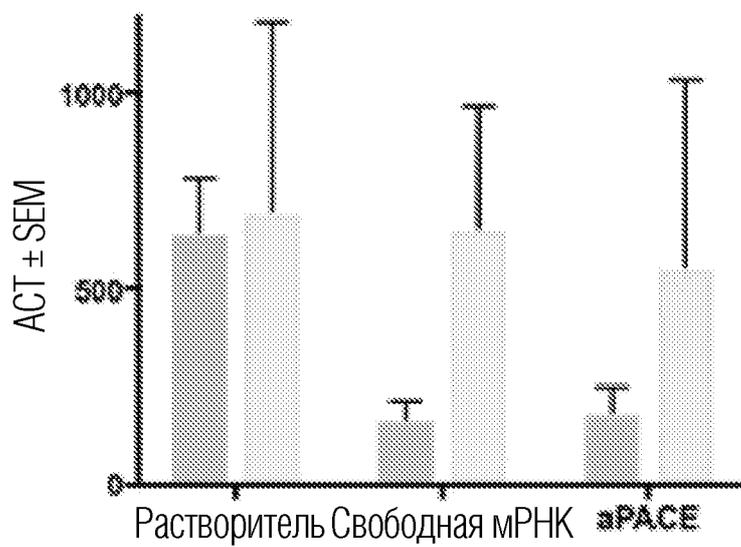
ФИГ. 5D



ФИГ. 6А

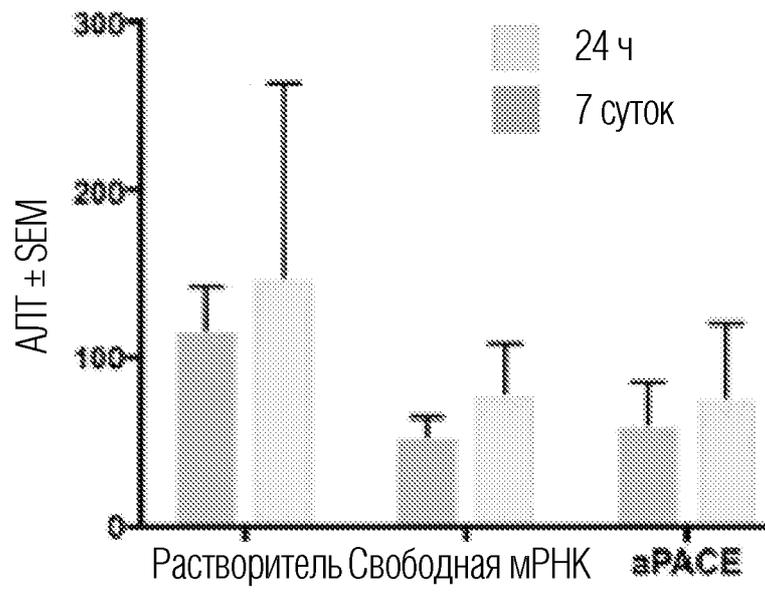


ФИГ. 6В

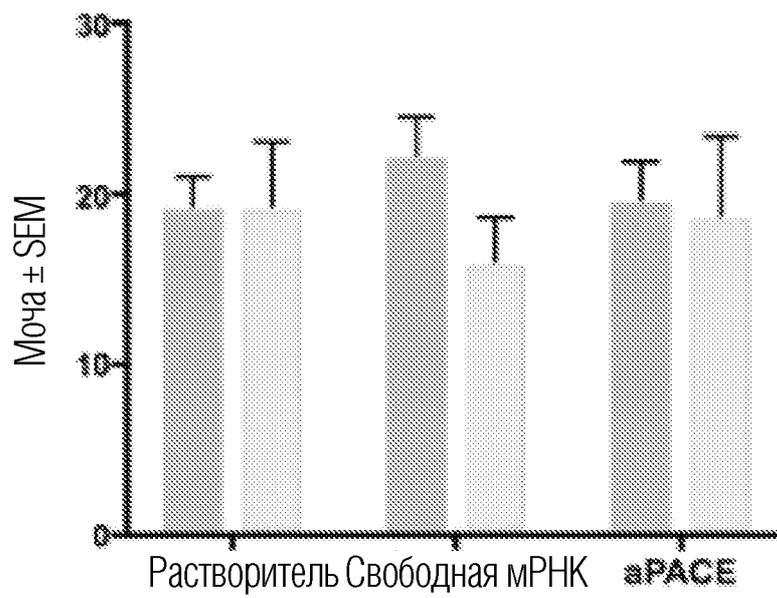


ФИГ. 6С

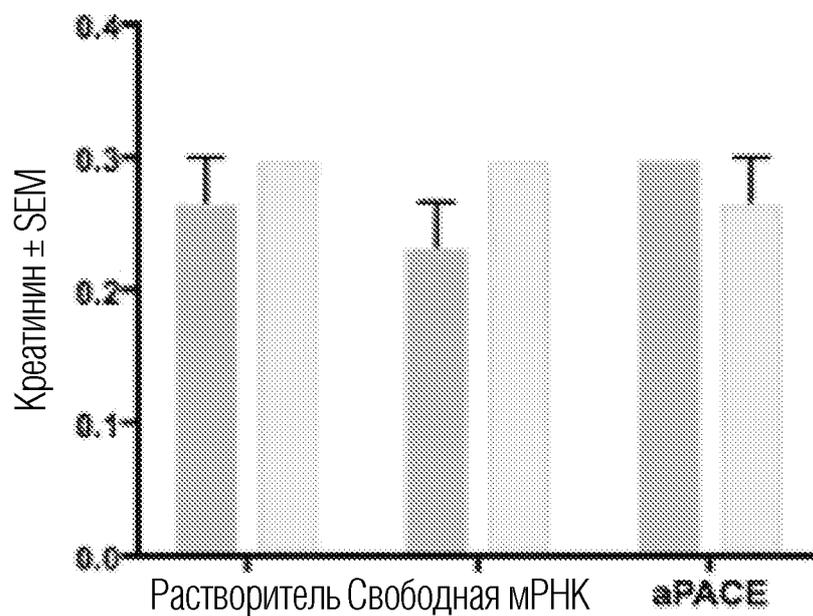
9/19



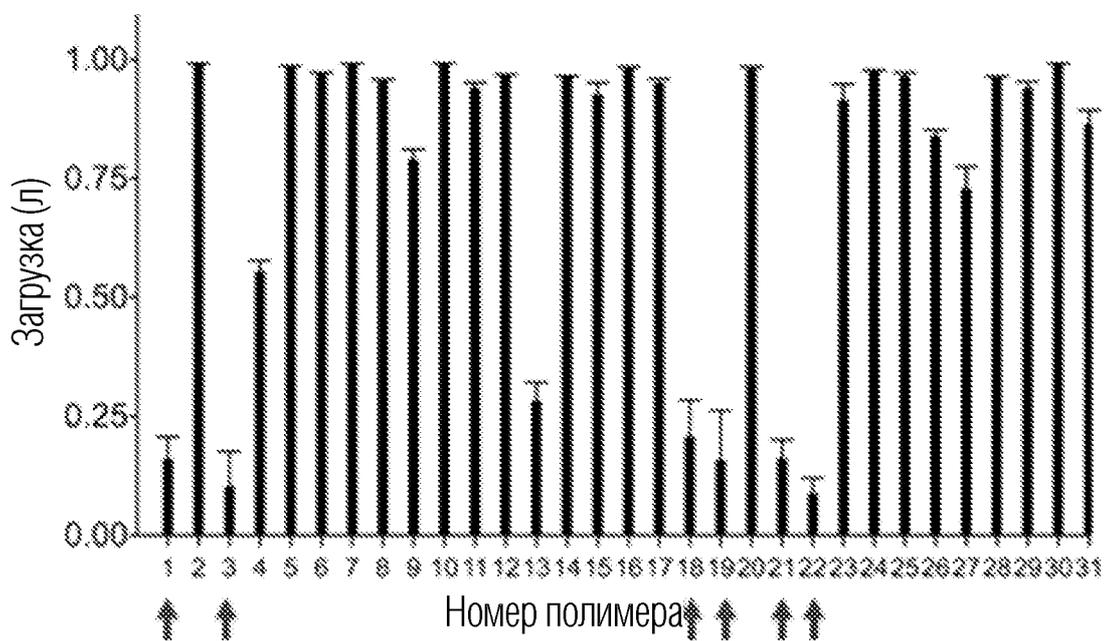
ФИГ. 6D



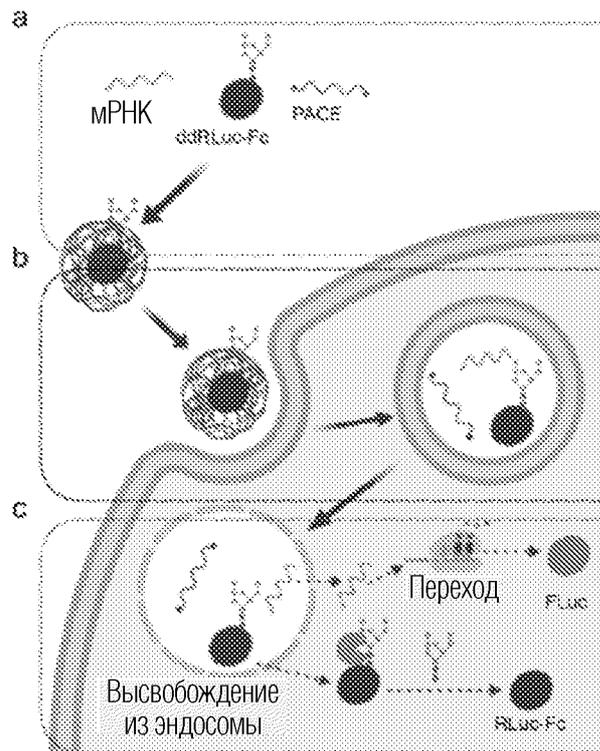
ФИГ. 6E



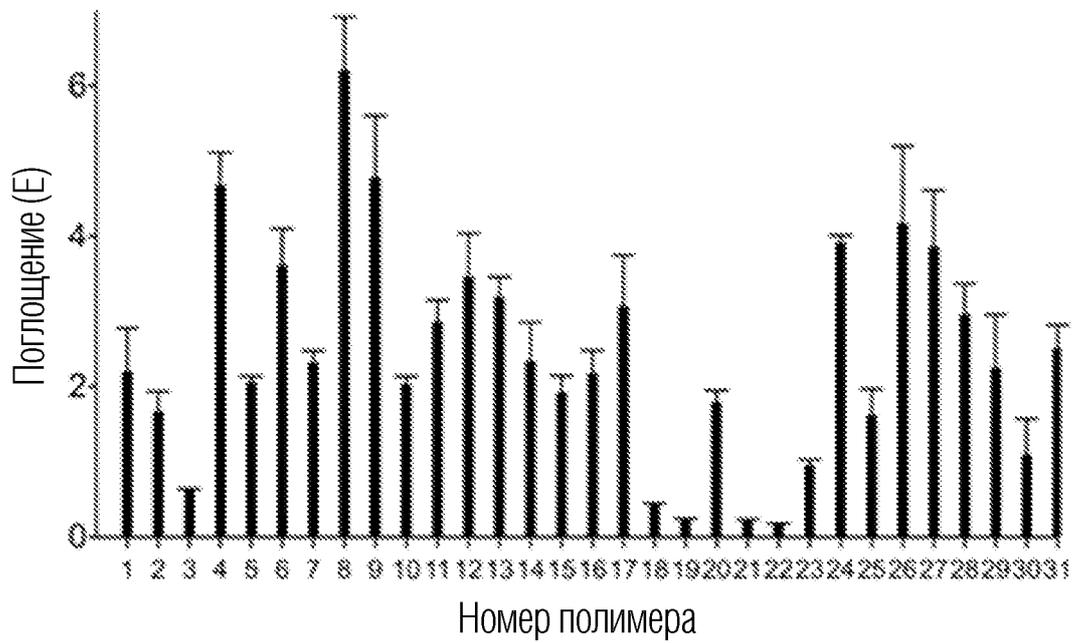
ФИГ. 6F



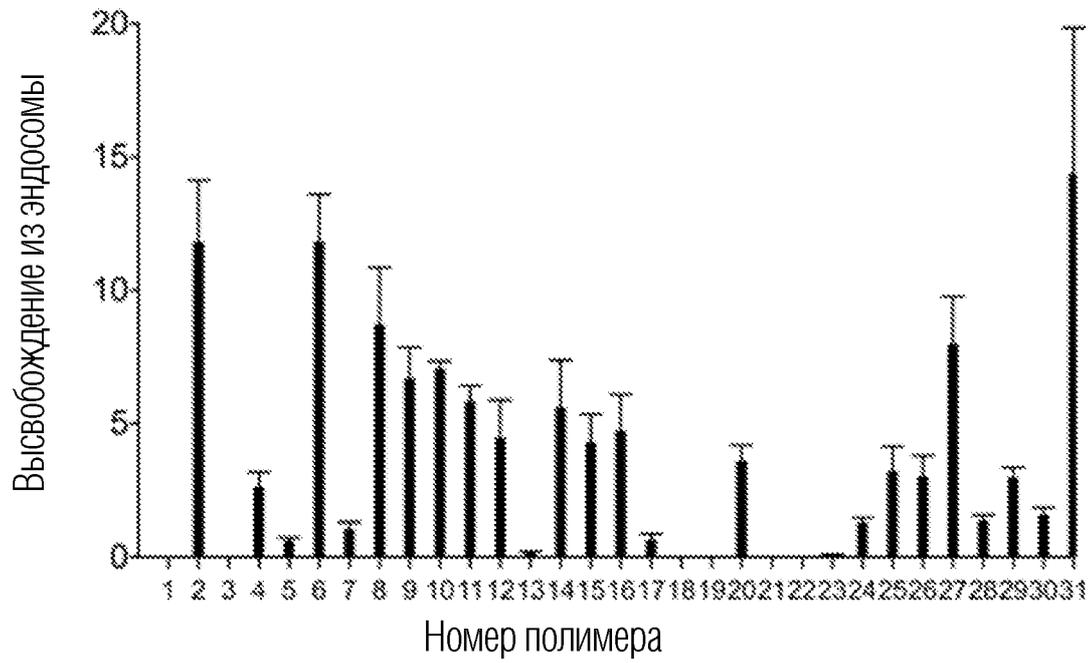
ФИГ. 7



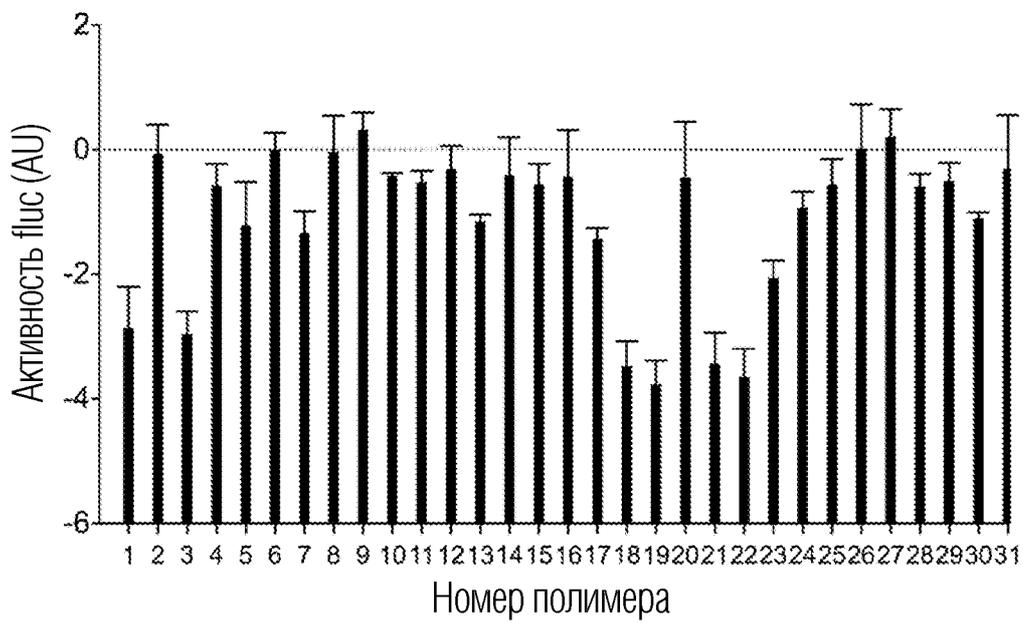
ФИГ. 8А



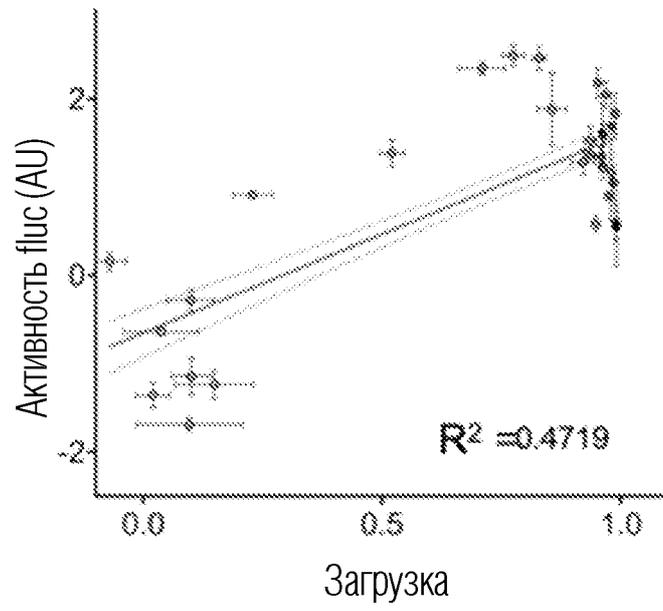
ФИГ. 8В



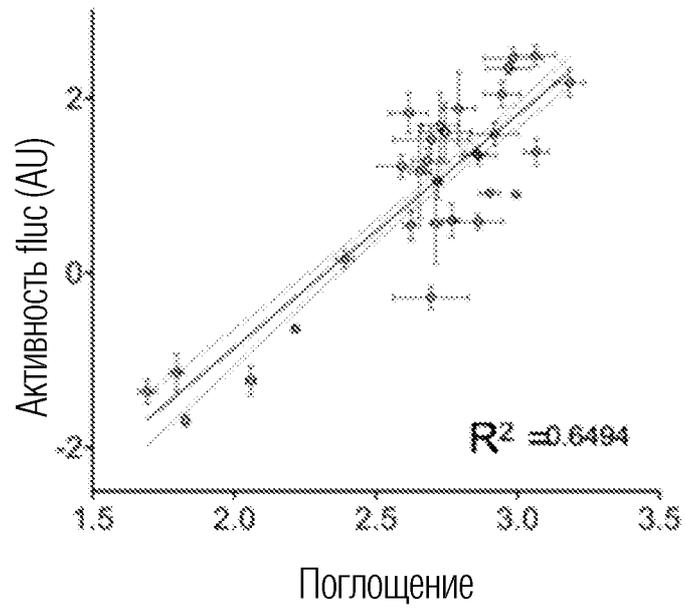
ФИГ. 8С



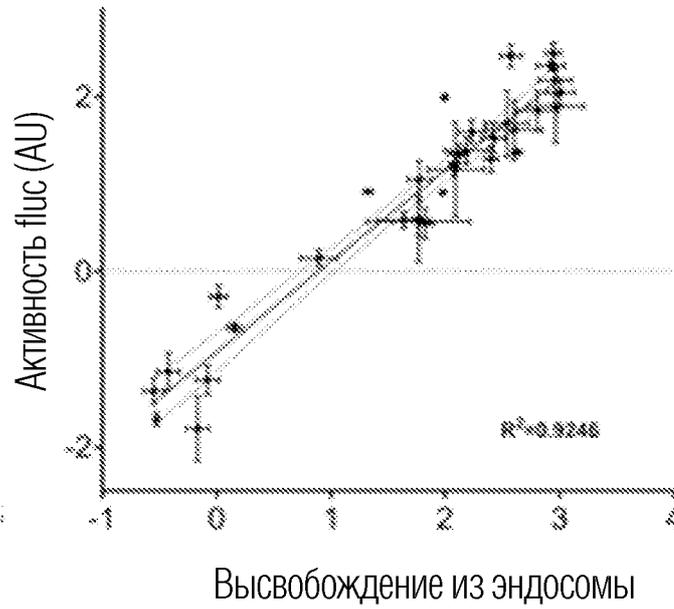
ФИГ. 8D



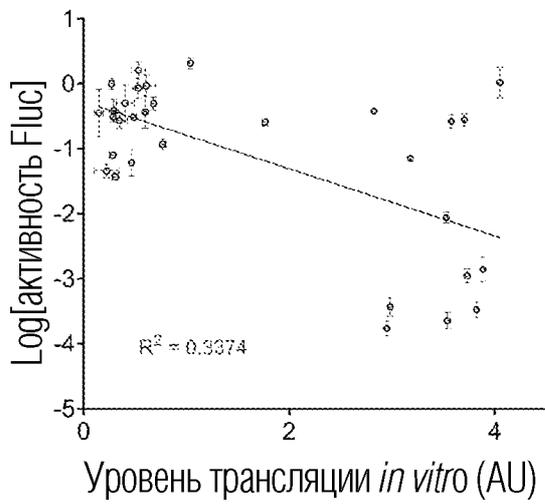
ФИГ. 9А



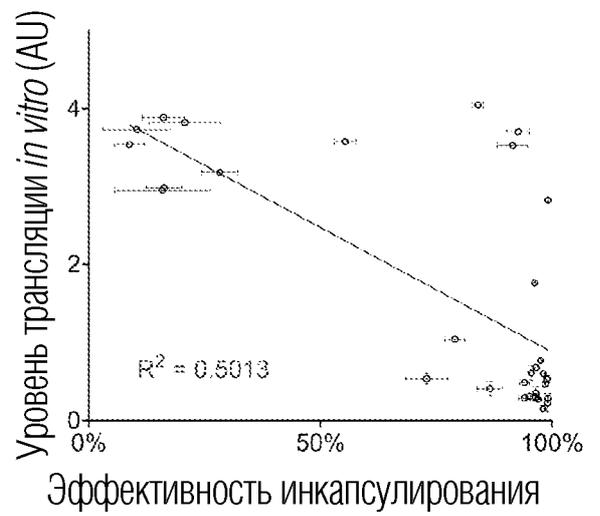
ФИГ. 9В



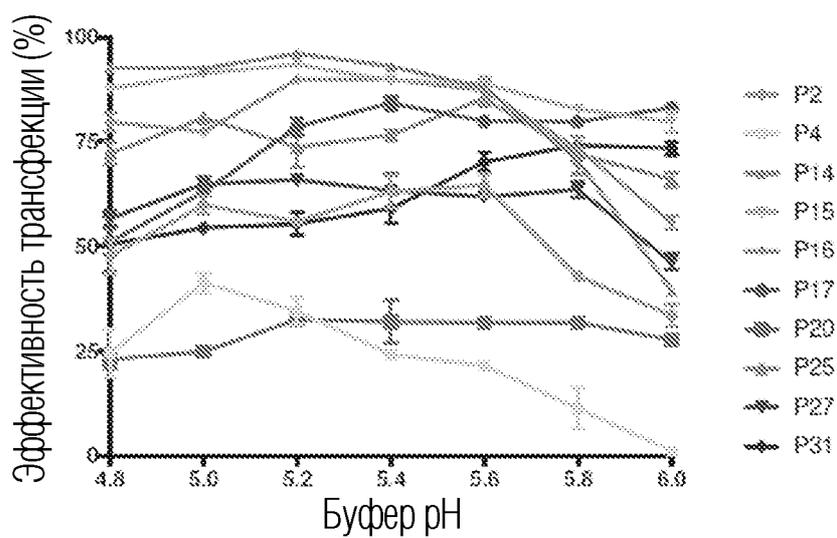
ФИГ. 9С



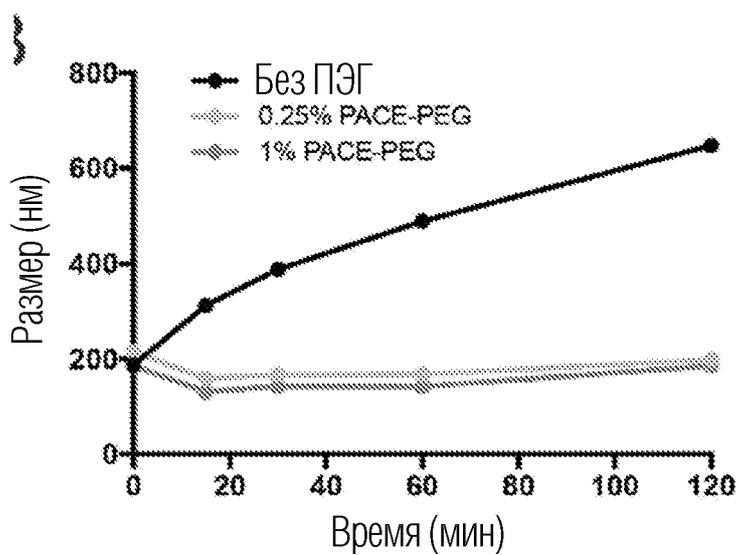
ФИГ. 10А



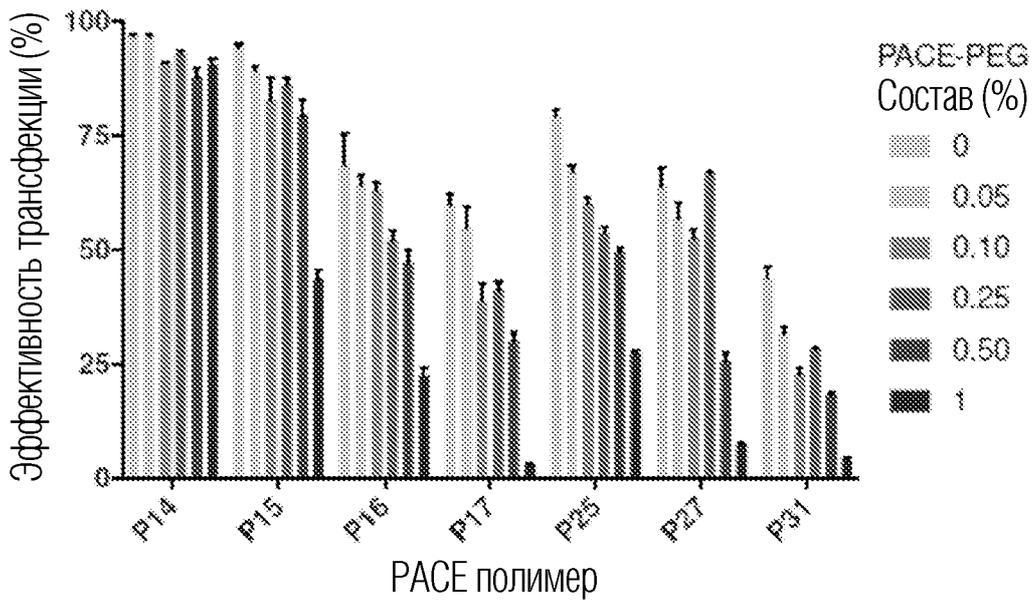
ФИГ. 10В



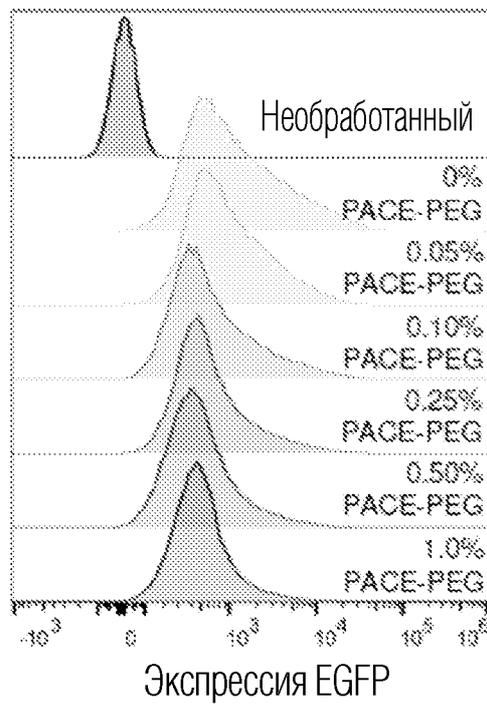
ФИГ. 11



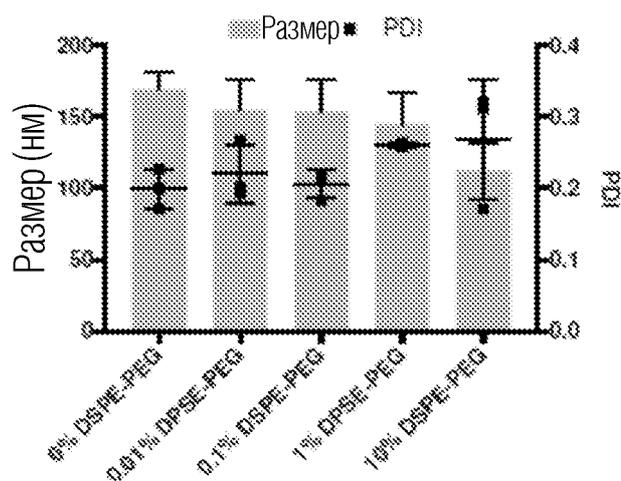
ФИГ. 12А



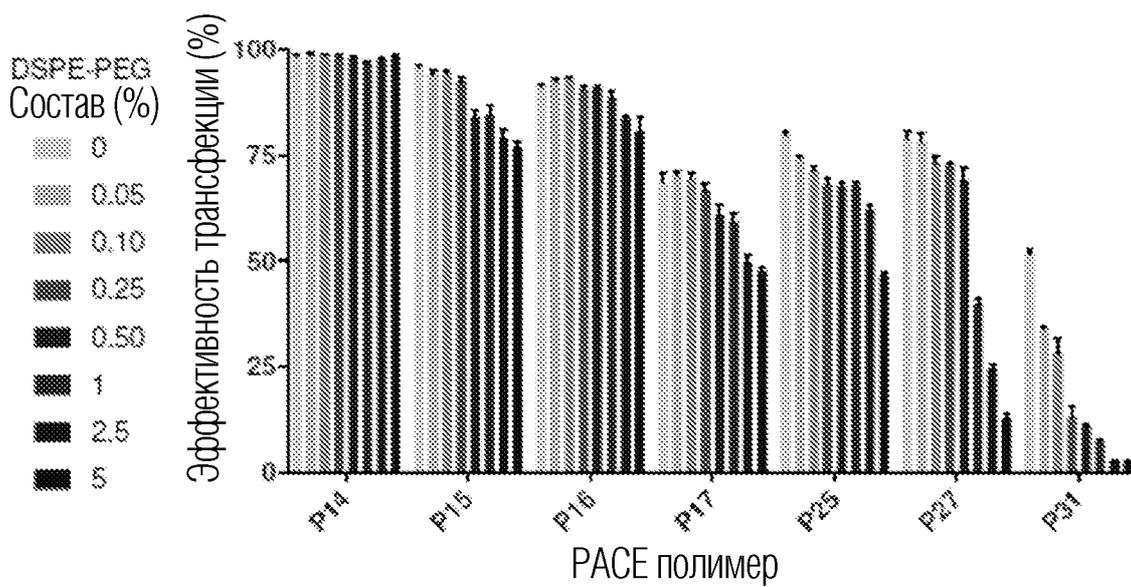
ФИГ. 12В



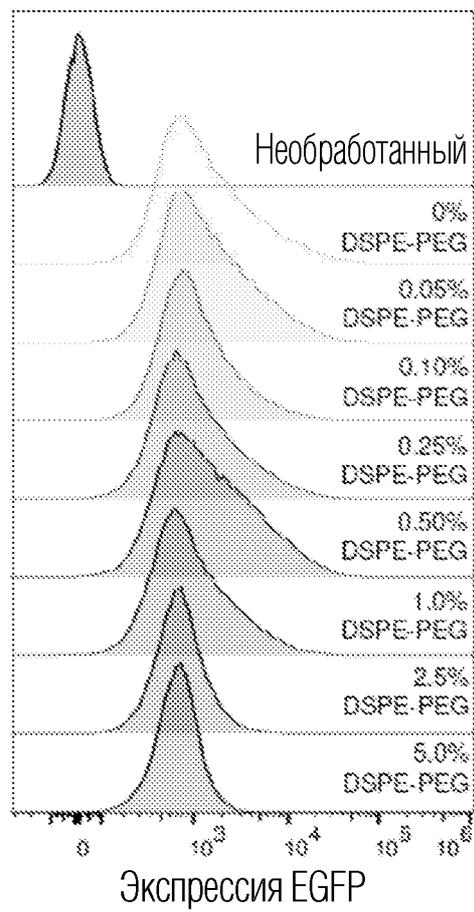
ФИГ. 12С



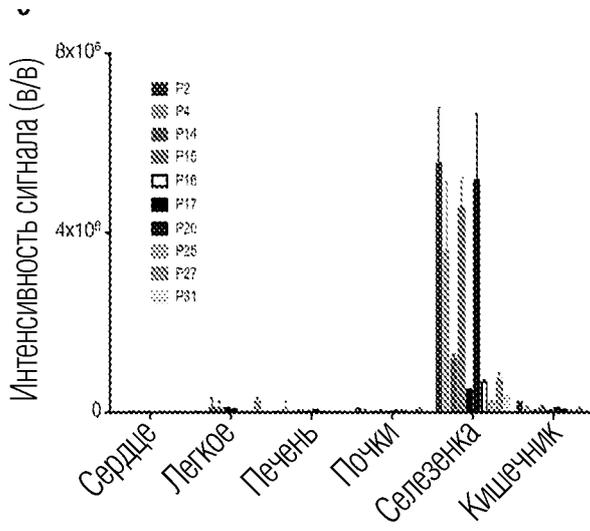
ФИГ. 13А



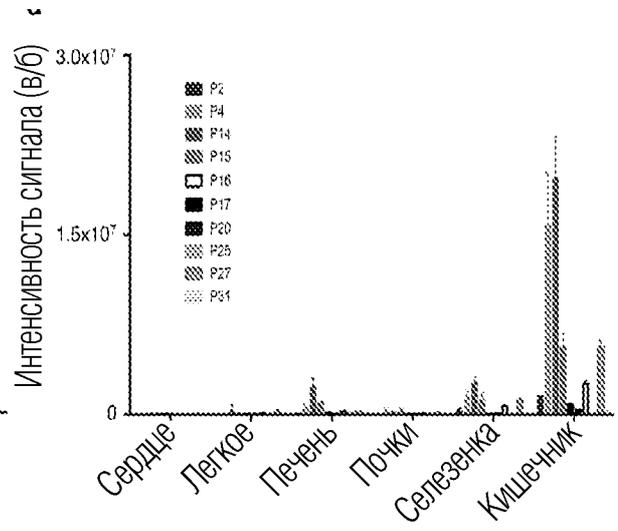
ФИГ. 13В



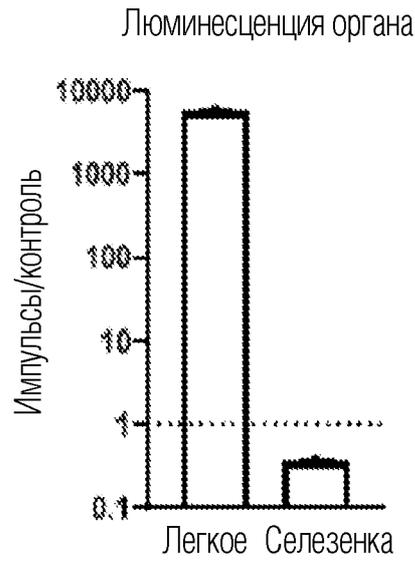
ФИГ. 13С



ФИГ. 14А



ФИГ. 14В



ФИГ. 15