

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390343 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.15(22) Дата подачи заявки
2021.07.16(51) Int. Cl. C07C 229/24 (2006.01)
C07C 233/36 (2006.01)
C07C 237/06 (2006.01)
A61K 47/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

(54) КАТИОННЫЕ ЛИПИДЫ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ

(31) 63/052,815; 63/188,996

(32) 2020.07.16; 2021.05.14

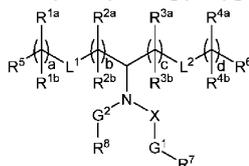
(33) US

(86) PCT/US2021/042007

(87) WO 2022/016070 2022.01.20

(71) Заявитель:
ЭКВИТАС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(CA)(72) Изобретатель:
Гатеньо Джулия, Ду Синяо (CA)(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Представлены соединения, имеющие следующую структуру:



или их фармацевтически приемлемые соли, таутомеры или стереоизомеры, где a, b, c, d, G¹, G², L¹, L², R^{1a}, R^{1b}, R^{2a}, R^{2b}, R^{3a}, R^{3b}, R^{4a}, R^{4b}, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ и X имеют значения, указанные в настоящей заявке. Также представлены применение соединений в качестве компонента композиций липидных наночастиц для доставки терапевтического агента, наночастицы, включающие соединения, и способы их применения и получения.

A1

202390343

202390343

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577071EA/025

КАТИОННЫЕ ЛИПИДЫ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ

Предпосылки создания изобретения

Область техники

Настоящее изобретение в целом относится к новым катионным липидам, которые можно использовать в комбинации с другими липидными компонентами, такими как нейтральные липиды, холестерин и конъюгированные с полимерами липиды, для формирования липидных наночастиц для облегчения внутриклеточной доставки терапевтических агентов, таких как нуклеиновые кислоты (например, олигонуклеотиды, матричная РНК), как *in vitro*, так и *in vivo*.

Описание предшествующего уровня техники

Есть много проблем, связанных с доставкой нуклеиновых кислот, чтобы вызвать желаемый ответ в биологической системе. Терапевтические средства на основе нуклеиновых кислот обладают огромным потенциалом, но остается потребность в более эффективной доставке нуклеиновых кислот в соответствующие места внутри клетки или организма для реализации этого потенциала. Терапевтические нуклеиновые кислоты включают, например, матричную РНК (мРНК), антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы, ДНКзимы, плазмиды, иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты, антагомир, антимири, миметик, супермир и аптамеры. Некоторые нуклеиновые кислоты, такие как мРНК или плазмиды, можно использовать для экспрессии специфических клеточных продуктов, что может быть полезно при лечении, например, заболеваний, связанных с дефицитом белка или фермента. Терапевтические применения доставки транслируемых нуклеотидов чрезвычайно широки, поскольку конструкции могут быть синтезированы для продуцирования любой выбранной последовательности белка, вне зависимости от того, является ли она естественной для системы или нет. Продукты экспрессии нуклеиновой кислоты могут увеличивать существующие уровни белка, заменять отсутствующие или нефункциональные версии белка или вводить новый белок и связанную с ним функциональность в клетку или организм.

Некоторые нуклеиновые кислоты, такие как ингибиторы микроРНК, можно использовать для экспрессии специфических клеточных продуктов, которые регулируются микроРНК, что может быть полезно при лечении, например, заболеваний, связанных с дефицитом белка или фермента. Терапевтические применения ингибирования микроРНК чрезвычайно широки, поскольку могут быть синтезированы конструкции для ингибирования одной или нескольких микроРНК, которые, в свою очередь, регулировали бы экспрессию продуктов мРНК. Ингибирование эндогенной микроРНК может усиливать экспрессию нижестоящего эндогенного белка-мишени и восстанавливать правильную функцию в клетке или организме в качестве средства для лечения заболевания, связанного со специфической микроРНК или группой микроРНК.

Другие нуклеиновые кислоты могут подавлять внутриклеточные уровни специфической мРНК и, как следствие, подавлять синтез соответствующих белков посредством таких процессов, как РНК-интерференция (РНКи) или комплементарное связывание антисмысловой РНК. Терапевтические применения антисмысловых олигонуклеотидов и РНКи также чрезвычайно широки, поскольку олигонуклеотидные конструкции могут быть синтезированы с любой нуклеотидной последовательностью, направленной против мРНК-мишени. Мишени могут включать мРНК из нормальных клеток, мРНК, связанные с болезненными состояниями, такими как рак, и мРНК инфекционных агентов, таких как вирусы. На сегодняшний день антисмысловые олигонуклеотидные конструкции продемонстрировали способность специфически подавлять целевые белки посредством деградации родственной мРНК как в моделях *in vitro*, так и *in vivo*. Кроме того, в настоящее время антисмысловые олигонуклеотидные конструкции оцениваются в клинических исследованиях.

Однако в настоящее время при использовании олигонуклеотидов в терапевтических контекстах сталкиваются с двумя проблемами. Во-первых, свободные РНК чувствительны к расщеплению нуклеазами в плазме. Во-вторых, свободные РНК имеют ограниченную способность получать доступ к внутриклеточному компартменту, где находится соответствующий механизм трансляции. Липидные наночастицы, образованные из катионных липидов с другими липидными компонентами, такими как нейтральные липиды, холестерин, ПЭГ, пегилированные липиды и олигонуклеотиды, используются для блокирования деградации РНК в плазме и облегчения поглощения олигонуклеотидов клетками.

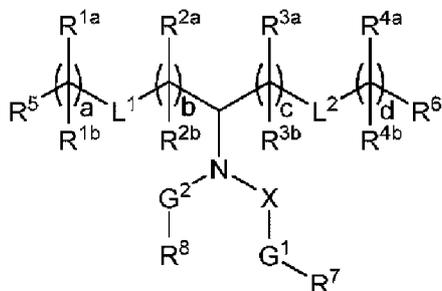
Остается потребность в улучшенных катионных липидах и липидных наночастицах для доставки олигонуклеотидов. Предпочтительно, чтобы эти липидные наночастицы обеспечивали оптимальное соотношение лекарственное средство:липид, защищали нуклеиновую кислоту от деградации и клиренса в сыворотке, подходили для системной или местной доставки и обеспечивали внутриклеточную доставку нуклеиновой кислоты. Кроме того, эти частицы липид-нуклеиновая кислота должны хорошо переноситься и обеспечивать адекватный терапевтический индекс, чтобы лечение пациента при эффективной дозе нуклеиновой кислоты не ассоциировалось с неприемлемой токсичностью и/или риском для пациента. Настоящее изобретение обеспечивает эти и связанные с ними преимущества.

Сущность изобретения

Вкратце, настоящее изобретение обеспечивает липидные соединения, включая их стереоизомеры, фармацевтически приемлемые соли или таутомеры, которые можно использовать отдельно или в сочетании с другими липидными компонентами, такими как нейтральные липиды, заряженные липиды, стероиды (включая, например, все стеролы) и/или их аналоги, и/или конъюгированные с полимерами липиды с образованием липидных наночастиц для доставки терапевтических агентов. В некоторых случаях липидные наночастицы используют для доставки нуклеиновых кислот, таких как антисмысловая

и/или матричная РНК. Также предложены способы применения таких липидных наночастиц для лечения или профилактики (например, вакцинации) различных заболеваний или состояний, например, вызываемых инфекционными агентами и/или дефицитом белка.

В одном варианте осуществления представлены соединения, имеющие следующую структуру (I):



(I)

или их фармацевтически приемлемые соли, таутомеры или стереоизомеры, где a, b, c, d, G¹, G², L¹, L², R^{1a}, R^{1b}, R^{2a}, R^{2b}, R^{3a}, R^{3b}, R^{4a}, R^{4b}, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ и X имеют значения, указанные в настоящей заявке.

Также представлены липидные наночастицы (LNP), включающие одно или несколько соединений структуры (I) и терапевтический агент, и включающие их фармацевтические композиции. В некоторых вариантах осуществления наночастицы дополнительно включают один или несколько компонентов, выбранных из нейтральных липидов, заряженных липидов, стероидов и конъюгированных с полимерами липидов. Такие LNP полезны для доставки терапевтического агента, например, для лечения заболевания или вакцинации против вирусного патогена.

Эти и другие аспекты изобретения станут очевидными при обращении к представленному ниже подробному описанию.

Подробное описание изобретения

В представленном далее описании изложены некоторые конкретные детали, чтобы обеспечить полное понимание различных вариантов осуществления изобретения. Однако специалист в данной области техники поймет, что изобретение можно осуществить на практике без этих деталей.

Настоящее изобретение частично основано на открытии новых катионных (амино)липидов, которые обеспечивают преимущества при использовании в липидных наночастицах для доставки *in vivo* активного или терапевтического агента, такого как нуклеиновая кислота, в клетку млекопитающего. В частности, варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают композиции наночастиц нуклеиновая кислота-липид, включающие один или несколько новых катионных липидов, описанных в настоящей заявке, которые обеспечивают повышенную активность нуклеиновой кислоты и улучшенную переносимость композиций *in vivo*, что приводит к значительному

увеличению терапевтического индекса по сравнению с композициями наночастиц нуклеиновая кислота-липид, описанными ранее. В других вариантах осуществления раскрытые липиды и включающие их липидные наночастицы обладают повышенной безопасностью и/или переносимостью при использовании для доставки активных агентов, таких как нуклеиновые кислоты.

В конкретных вариантах осуществления настоящее раскрытие обеспечивает новые катионные липиды, которые обеспечивают возможность получения улучшенных композиций для доставки мРНК и/или других олигонуклеотидов *in vitro* и *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления эти улучшенные композиции липидных наночастиц полезны для экспрессии белка, кодируемого мРНК. В других вариантах осуществления эти улучшенные композиции липидных наночастиц полезны для повышения экспрессии эндогенного белка путем доставки ингибиторов микроРНК, нацеленных на одну конкретную микроРНК или группу микроРНК, регулирующих одну мРНК-мишень или несколько мРНК. В других вариантах осуществления эти улучшенные композиции липидных наночастиц полезны для понижающей регуляции (например, подавления) уровней белка и/или уровней мРНК генов-мишеней. В некоторых других вариантах осуществления липидные наночастицы также полезны для доставки мРНК и плазмид для экспрессии трансгенов. В некоторых других вариантах осуществления композиции липидных наночастиц полезны для индуцирования фармакологического эффекта, возникающего в результате экспрессии белка, например, повышения продукции эритроцитов посредством доставки подходящей мРНК эритропоэтина или защиты от инфекции посредством доставки мРНК, кодирующей подходящий антиген или антитело.

Липидные наночастицы и композиции вариантов осуществления настоящего изобретения можно использовать для различных целей, включая доставку инкапсулированных или связанных (например, связанных в комплекс) терапевтических агентов, таких как нуклеиновые кислоты, в клетки как *in vitro*, так и *in vivo*. Соответственно, варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают способы лечения или профилактики заболеваний или расстройств у субъекта, нуждающегося в этом, путем контактирования субъекта с липидной наночастицей, которая инкапсулирует подходящий терапевтический агент или связана с ним, при этом липидная наночастица включает один или несколько новых катионных липидов, описанных в настоящей заявке.

Как описано в настоящей заявке, варианты осуществления липидных наночастиц по настоящему раскрытию особенно полезны для доставки нуклеиновых кислот, включая, например, мРНК, антисмысловой олигонуклеотид, плазмидную ДНК, микроРНК (миРНК), ингибиторы микроРНК (антагомиры/антимирны), матричная РНК-интерферирующую комплементарную РНК (микРНК), ДНК, поливалентную РНК, РНК субст дайсера, комплементарную ДНК (кДНК) и т.д. Таким образом, липидные наночастицы и композиции некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения можно использовать для индукции экспрессии желаемого белка как *in vitro*, так и *in vivo* путем контактирования клеток с липидной наночастицей, включающей один или несколько новых

катионных липидов, описанных в настоящей заявке, где липидная наночастица инкапсулирует нуклеиновую кислоту или связана с нуклеиновой кислотой, которая экспрессируется для образования желаемого белка (например, матричная РНК или плазида, кодирующая желаемый белок) или ингибирования процессов, прекращающих экспрессию мРНК (например, ингибиторы микроРНК). В некоторых вариантах осуществления белок, экспрессируемый нуклеиновой кислотой, представляет собой антиген, и, таким образом, LNP индуцируют иммунный ответ (например, вакцинация). Альтернативно, липидные наночастицы и композиции вариантов осуществления настоящего изобретения можно использовать для снижения экспрессии генов-мишеней и белков как *in vitro*, так и *in vivo* путем контактирования клеток с липидной наночастицей, включающей один или несколько новых катионных липидов, описанных в настоящей заявке, где липидная наночастица инкапсулирует нуклеиновую кислоту или связана с нуклеиновой кислотой, которая снижает экспрессию гена-мишени (например, антисмысловым олигонуклеотидом или малой интерферирующей РНК (миРНК)). Липидные наночастицы и композиции вариантов осуществления настоящего изобретения также можно использовать для совместной доставки различных нуклеиновых кислот (например, мРНК и плазмидной ДНК) по отдельности или в комбинации, что может быть полезно для обеспечения эффекта, требующего совместной локализации различных нуклеиновых кислот (например, мРНК, кодирующей подходящий ген-модифицирующий фермент, и сегмента(сегментов) ДНК для встраивания в геном хозяина).

Нуклеиновые кислоты для использования в вариантах осуществления настоящего изобретения можно получить любым доступным способом. Для мРНК основным способом получения является, помимо прочего, ферментативный синтез (также называемый транскрипцией *in vitro*), который в настоящее время представляет собой наиболее эффективный способ получения мРНК, специфичной для длинных последовательностей. Транскрипция *in vitro* описывает процесс матрица-направленного синтеза молекул РНК из сконструированной ДНК-матрицы, состоящей из расположенной выше по ходу транскрипции промоторной последовательности бактериофага (например, включая, но не ограничиваясь этим, последовательность из колифага Т7, Т3 и SP6), связанной с расположенной ниже последовательностью, кодирующей интересующий ген. ДНК-матрицу можно получить для транскрипции *in vitro* из ряда источников с использованием соответствующих методов, которые хорошо известны в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, плазмидную ДНК и амплификацию с использованием полимеразной цепной реакции (см. Linpinsel, J.L and Conn, G.L., General protocols for preparation of plasmid DNA template and Bowman, J.C., Azizi, B., Lenz, T.K., Ray, P., and Williams, L.D. in RNA *in vitro* transcription and RNA purification by denaturing PAGE in Recombinant and *in vitro* RNA syntheses Methods v. 941 Conn G.L. (ed), New York, N.Y. Humana Press, 2012).

Транскрипция РНК происходит *in vitro* с использованием линеаризованной ДНК-матрицы в присутствии соответствующей РНК-полимеразы и аденозин-, гуанозин-, уридин- и цитидин-рибонуклеозидтрифосфатов (rNTP) в условиях, которые поддерживают

активность полимеразы, минимизируя потенциальную деградацию полученных мРНК транскриптов. Транскрипцию *in vitro* можно осуществить с использованием различных коммерчески доступных наборов, включая, но не ограничиваясь этим, крупномасштабную систему получения РНК RiboMax (Promega), наборы для транскрипции MegaScript (Life Technologies), а также с использованием коммерчески доступных реагентов, включая РНК-полимеразы и гНТФ. Методология транскрипции мРНК *in vitro* хорошо известна в данной области. (см., например, Losick, R., 1972, *In vitro* transcription, *Ann Rev Biochem* v.41 409-46; Kamakaka, R. T. and Kraus, W. L. 2001. *In Vitro* Transcription. *Current Protocols in Cell Biology*. 2:11.6:11.6.1-11.6.17; Beckert, B. And Masquida, B.,(2010) *Synthesis of RNA by In Vitro Transcription in RNA in Methods in Molecular Biology* v. 703 (Neilson, H. Ed), New York, N.Y. Humana Press, 2010; Brunelle, J.L. and Green, R., 2013, Chapter Five - *In vitro* transcription from plasmid or PCR-amplified DNA, *Methods in Enzymology* v. 530, 101-114; все они включены в настоящую заявку посредством ссылки).

Желаемую мРНК, транскрибируемую *in vitro*, затем очищают от нежелательных компонентов транскрипции или связанных реакций (включая неинкорпорированные гНТФ, белковый фермент, соли, короткие РНК-олигонуклеотиды и т.д.). Методы выделения транскриптов мРНК хорошо известны в данной области. Хорошо известные процедуры включают экстракцию фенолом/хлороформом или осаждение спиртом (этанолом, изопропанолом) в присутствии одновалентных катионов или хлорида лития. Дополнительные, не ограничивающие примеры процедур очистки, которые можно использовать, включают эксклюзионную хроматографию (Lukavsky, P.J. and Puglisi, J.D., 2004, *Large-scale preparation and purification of polyacrylamide-free RNA oligonucleotides*, *RNA* v.10, 889-893), аффинную хроматографию на основе диоксида кремния и электрофорез в полиакриламидном геле (Bowman, J.C., Azizi, B., Lenz, T.K., Ray, P., and Williams, L.D. in *RNA in vitro transcription and RNA purification by denaturing PAGE in Recombinant and in vitro RNA syntheses Methods* v. 941 Conn G.L. (ed), New York, N.Y. Humana Press, 2012). Очистку можно осуществить с использованием различных коммерчески доступных наборов, включая, но не ограничиваясь этим, SV Total Isolation System (Promega) и *In vitro* Transcription Cleanup and Concentration Kit (Norgen Biotek).

Кроме того, хотя обратная транскрипция может давать большие количества мРНК, продукты могут содержать ряд aberrantных РНК примесей, связанных с нежелательной полимеразной активностью, которые, возможно, потребуется удалить из препарата полноразмерной мРНК. К ним относятся короткие РНК, которые возникают в результате abortивной инициации транскрипции, а также двухцепочечные РНК (дцРНК), генерируемые РНК-зависимой РНК-полимеразной активностью, РНК-примированной транскрипцией с РНК-матриц и самокомплементарным 3'-удлинением. Было продемонстрировано, что эти примеси со структурами дцРНК могут приводить к нежелательной иммуностимулирующей активности посредством взаимодействия с различными сенсорами врожденного иммунитета в эукариотических клетках, которые функционируют, распознавая специфические структуры нуклеиновых кислот и индуцируя

сильные иммунные ответы. Это, в свою очередь, может резко снизить трансляцию мРНК, поскольку синтез белка снижается во время врожденного клеточного иммунного ответа. Таким образом, были разработаны и известны в данной области дополнительные методы удаления этих дцРНК примесей, включая, но не ограничиваясь этим, масштабируемую ВЭЖХ очистку (см., например, Kariko, K., Muramatsu, H., Ludwig, J. And Weissman, D., 2011, Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA, Nucl Acid Res, v. 39 e142; Weissman, D., Pardi, N., Muramatsu, H., и Kariko, K., HPLC Purification of in vitro transcribed long RNA in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation in Methods in Molecular Biology v.969 (Rabinovich, P.H. Ed), 2013). Сообщалось о том, что мРНК, очищенная методом ВЭЖХ, транслируется на гораздо более высоких уровнях, особенно в первичных клетках и *in vivo*.

В данной области описано значительное разнообразие модификаций, которые используются для изменения специфических свойств транскрибируемой *in vitro* мРНК и улучшения ее полезных свойств. Они включают, но не ограничиваются этим, модификации 5' и 3' концов мРНК. Эндогенная эукариотическая мРНК обычно содержит кэп-структуру на 5'-конце зрелой молекулы, которая играет важную роль в опосредовании связывания мРНК кэп-связывающего белка (СВР), который в свою очередь, отвечает за повышение стабильности мРНК в клетке и эффективность трансляции мРНК. Поэтому самые высокие уровни экспрессии белка достигаются при использовании кэпированных транскриптов мРНК. 5'-кэп содержит 5'-5'-трифосфатную связь между самым 5'-концевым нуклеотидом и гуаниновым нуклеотидом. Конъюгированный гуаниновый нуклеотид метилирован в положении N7. Дополнительные модификации включают метилирование последних и предпоследних 5'-нуклеотидов по 2'-гидроксильной группе.

Для создания 5'-кэпа транскрибируемой *in vitro* синтетической мРНК можно использовать множество различных кэп-структур. 5'-кэпирование синтетической мРНК может быть осуществлено ко-транскрипционно с использованием химических аналогов кэпа (т.е. кэпирование во время транскрипции *in vitro*). Например, кэп Anti-Reverse Cap Analog (ARCA) содержит 5'-5'-трифосфатную связь гуанин-гуанин, где один гуанин содержит N7 метильную группу, а также 3'-О-метильную группу. Однако до 20% транскриптов остаются некэпированными во время этого ко-транскрипционного процесса, а синтетический аналог кэпа не идентичен структуре 5'-кэпа аутентичной клеточной мРНК, что потенциально снижает способность к трансляции и клеточную стабильность. Альтернативно, синтетические молекулы мРНК также могут быть ферментативно кэпированы посттранскрипционно. Они могут генерировать более аутентичную структуру 5'-кэпа, которая более точно имитирует, структурно или функционально, эндогенный 5'-кэп, которая имеет повышенное связывание кэп-связывающих белков, увеличенный период полужизни и пониженную чувствительность к 5'-эндонуклеазам и/или уменьшенное 5'-декэпирование. В данной области техники были разработаны многочисленные синтетические аналоги 5'-кэпа, которые, как известно, повышают стабильность и

трансляционную способность мРНК (см., например, Grudzien-Nogalska, E., Kowalska, J., Su, W., Kuhn, A.N., Slepenny, S.V., Darynkiewicz, E., Sahin, U., Jemielity, J., and Rhoads, R.E., Synthetic mRNAs with superior translation and stability properties in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation in Methods in Molecular Biology v.969 (Rabinovich, P.H. Ed), 2013).

На 3'-конце длинная цепь адениновых нуклеотидов (поли-А-хвост) обычно добавляется к молекулам мРНК во время процессинга РНК. Сразу после транскрипции 3'-конец транскрипта расщепляется, освобождая 3'-гидроксил, к которому поли-А-полимераза добавляет цепь адениновых нуклеотидов к РНК в процессе, называемом полиаденилированием. Было показано, что поли-А-хвост повышает как эффективность трансляции, так и стабильность мРНК (см. Bernstein, P. and Ross, J., 1989, Poly (A), poly (A) binding protein and the regulation of mRNA stability, Trends Bio Sci v. 14 373-377; Guhaniyogi, J. And Brewer, G., 2001, Regulation of mRNA stability in mammalian cells, Gene, v. 265, 11-23; Dreyfus, M. And Regnier, P., 2002, The poly (A) tail of mRNAs: Bodyguard in eukaryotes, scavenger in bacteria, Cell, v.111, 611-613).

Полиаденилирование транскрибируемой *in vitro* мРНК может достигаться с использованием различных подходов, включая, но не ограничиваясь этим, клонирование поли(Т)-тракта в ДНК матрицу, или путем посттранскрипционного добавления с использованием поли(А)-полимеразы. Первый случай обеспечивает возможность *in vitro* транскрипции мРНК с поли(А)-хвостами определенной длины, в зависимости от размера поли(Т)-тракта, но требует дополнительных манипуляций с матрицей. Последний случай включает ферментативное добавление поли(А)-хвоста к транскрибируемой *in vitro* мРНК с использованием поли(А)-полимеразы, которая катализирует включение адениновых остатков на 3'-концах РНК, не требуя дополнительных манипуляций с ДНК-матрицей, но приводит к мРНК с поли(А)-хвостами гетерогенной длины. 5'-кэпирование и 3'-полиаденилирование можно осуществить с использованием различных коммерчески доступных наборов, включая, но не ограничиваясь этим, набор Poly (A) Polymerase Tailing Kit (EpiCenter), набор mMESSAGING mMACHINE T7 Ultra Kit и набор Poly (A) Tailing Kit (Life Technologies), а также с использованием коммерчески доступных реагентов, различных кэпов ARCA, поли(А)полимеразы и т.д.

Помимо 5'-кэпа и 3'-полиаденилирования были описаны другие модификации транскриптов *in vitro* для обеспечения преимуществ, связанных с эффективностью трансляции и стабильностью. В данной области техники хорошо известно, что патогенные ДНК и РНК могут распознаваться различными сенсорами эукариот и запускать мощные врожденные иммунные ответы. Было показано, что способность распознавать патогенную и собственную ДНК и РНК основана, по меньшей мере частично, на модификациях структуры и нуклеозидов, поскольку большинство нуклеиновых кислот из природных источников содержат модифицированные нуклеозиды. Напротив, в РНК, синтезированной *in vitro*, эти модификации отсутствуют, что делает ее иммуностимулирующей, что, в свою очередь, может ингибировать эффективную трансляцию мРНК, как указано выше.

Введение модифицированных нуклеозидов в транскрибируемую *in vitro* мРНК можно использовать для предотвращения распознавания и активации РНК-сенсоров, тем самым ослабляя эту нежелательную иммуностимулирующую активность и повышая способность к трансляции (см., например, Kariko, K. And Weissman, D. 2007, Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA: implication for therapeutic RNA development, *Curr Opin Drug Discov Devel*, v.10 523-532; Pardi, N., Muramatsu, H., Weissman, D., Kariko, K., *In vitro* transcription of long RNA containing modified nucleosides in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation in *Methods in Molecular Biology* v.969 (Rabinovich, P.H. Ed), 2013; Kariko, K., Muramatsu, H., Welsh, F.A., Ludwig, J., Kato, H., Akira, S., Weissman, D., 2008, Incorporation of Pseudouridine Into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector With Increased Translational Capacity and Biological Stability, *Mol Ther* v.16, 1833-1840). Для получения, контроля и применения модифицированных нуклеозидов и нуклеотидов, используемых в синтезе модифицированных РНК, можно использовать общие способы и процедуры, известные в данной области. Известно множество различных модификаций нуклеозидов, которые могут быть включены отдельно или в комбинации с другими модифицированными нуклеозидами в некоторой степени в транскрибируемую *in vitro* мРНК (см., например, US 2012/0251618). Сообщалось о том, что синтез нуклеозид-модифицированной мРНК *in vitro* снижает способность активировать иммунные сенсоры с одновременным повышением трансляционной способности.

Другие компоненты мРНК, которые можно модифицировать для обеспечения преимуществ, связанных с трансляционной способностью и стабильностью, включают 5'- и 3'-нетранслируемые области (UTR). Было показано, что оптимизация UTR (предпочтительные 5'- и 3'-UTR могут быть получены из клеточных или вирусных РНК), либо обе вместе, либо независимо друг от друга, повышает стабильность мРНК и эффективность трансляции транскрибируемой *in vitro* мРНК (см., например, Pardi, N., Muramatsu, H., Weissman, D., Kariko, K., *In vitro* transcription of long RNA containing modified nucleosides in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation in *Methods in Molecular Biology* v.969 (Rabinovich, P.H. Ed), 2013).

В дополнение к мРНК можно использовать другие полезные нуклеиновокислотные нагрузки для настоящего изобретения. Что касается олигонуклеотидов, способы получения включают, но не ограничиваются этим, химический синтез и ферментативное, химическое расщепление более длинного предшественника, транскрипцию *in vitro*, как описано выше, и т.д. Способы синтеза нуклеотидов ДНК и РНК широко используются и хорошо известны в данной области техники (см., например, Gait, M. J. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: a practical approach*, Oxford [Oxfordshire], Washington, D.C.: IRL Press, 1984; и Herdewijn, P. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: methods and applications*, *Methods in Molecular Biology*, v. 288 (Clifton, N.J.) Totowa, N.J.: Humana Press, 2005; оба документа включены в настоящую заявку посредством ссылки).

Что касается плазмидной ДНК, в получении для применения с вариантами

осуществления настоящего изобретения обычно используют, но ограничиваясь этим, экспансию и выделение плазмидной ДНК *in vitro* в жидкой культуре бактерий, содержащей представляющую интерес плазмиду. Присутствие в представляющей интерес плазмиде гена, кодирующего резистентность к определенному антибиотику (пенициллину, канамицину и т. д.), позволяет бактериям, содержащим представляющую интерес плазмиду, селективно расти в культурах, содержащих антибиотик. Способы выделения плазмидной ДНК широко используются и хорошо известны в данной области (см., например, Heilig, J., Elbing, K. L. and Brent, R., (2001), Large-Scale Preparation of Plasmid DNA, Current Protocols in Molecular Biology, 41:II:1.7:1.7.1-1.7.16; Rozkov, A., Larsson, B., Gillström, S., Björnstedt, R. and Schmidt, S. R., (2008), Large-scale production of endotoxin-free plasmids for transient экспрессии in mammalian cell culture, Biotechnol. Bioeng., 99: 557-566; и US 6,197,553 B1). Выделение плазмиды можно осуществить с использованием различных коммерчески доступных наборов, включая, но не ограничиваясь этим, наборы Plasmid Plus (Qiagen), GenJET plasmid MaxiPrep (Thermo) и PureYield MaxiPrep (Promega), а также с использованием коммерчески доступных реагентов.

Ниже более подробно описаны различные иллюстративные варианты осуществления катионных липидов по настоящему изобретению, липидных наночастиц и включающих их композиций, а также их применение для доставки активных (например, терапевтических агентов), таких как нуклеиновые кислоты, для модуляции экспрессии генов и белков.

При использовании в настоящей заявке следующие термины имеют присвоенные им значения, если не указано иное.

Если контекст не требует иного, в настоящем описании и формуле изобретения слово “включают” и его варианты, такие как, “включает” и “включающий”, следует толковать в открытом и всеобъемлющем смысле, то есть как “включая, но не ограничиваясь этим”.

Ссылка в данном описании на “один вариант осуществления” или “вариант осуществления” означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описанные в связи с вариантом осуществления, включены по меньшей мере в один вариант осуществления настоящего изобретения. Таким образом, фразы “в одном варианте осуществления” или “в варианте осуществления” в различных местах данного описания не обязательно все относятся к одному и тому же варианту осуществления. Кроме того, конкретные признаки, структуры или характеристики могут быть объединены любым подходящим образом в одном или нескольких вариантах осуществления.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Используемые в описании и формуле изобретения формы единственного числа “a”, “an” и “the” включают ссылки во множественном числе, если из контекста явно не следует иное.

Фраза “индуцировать экспрессию желаемого белка” относится к способности

нуклеиновой кислоты повышать экспрессию желаемого белка. Для анализа степени экспрессии белка испытываемый образец (например, образец клеток в культуре, экспрессирующих желаемый белок) или используемую для испытаний модель млекопитающего (например, млекопитающего, такого как человек или животное), такую как модель грызуна (например, мыши) или примата, отличного от человека (например, обезьяны), подвергают контактированию с нуклеиновой кислотой (например, нуклеиновой кислотой в комбинации с липидом по настоящему раскрытию). Экспрессию желаемого белка в испытываемом образце или у испытываемого животного сравнивают с экспрессией желаемого белка в контрольном образце (например, образце клеток в культуре, экспрессирующих желаемый белок) или модели контрольного млекопитающего (например, млекопитающего, такого как человек или животное), например модели грызуна (например, мыши) или примата, отличного от человека (например, обезьяны), которые не контактировали с нуклеиновой кислотой или которым не вводили нуклеиновую кислоту. Когда желаемый белок присутствует в контрольном образце или у контрольного млекопитающего, экспрессии желаемого белка в контрольном образце или у контрольного млекопитающего можно присвоить значение 1,0. В конкретных вариантах осуществления индукция экспрессии желаемого белка достигается, когда отношение экспрессии желаемого белка в испытываемом образце или у испытываемого млекопитающего к уровню экспрессии желаемого белка в контрольном образце или у контрольного млекопитающего составляет более 1, например, около 1,1, 1,5, 2,0, 5,0 или 10,0. Когда желаемый белок отсутствует в контрольном образце или у контрольного млекопитающего, индукция экспрессии желаемого белка достигается при обнаружении любого измеримого уровня желаемого белка в испытываемом образце или у испытываемого млекопитающего. Специалистам в данной области техники будут понятны соответствующие анализы для определения уровня экспрессии белка в образце, например, дот-блоты, нозерн-блоты, гибридизация *in situ*, ELISA, иммунопреципитация, функция фермента и фенотипические анализы, или анализы на основе репортерных белков, которые могут генерировать флуоресценцию или люминесценцию при соответствующих условиях.

Фраза “ингибирование экспрессии гена-мишени” относится к способности нуклеиновой кислоты подавлять, снижать или ингибировать экспрессию гена-мишени. Для анализа степени подавления гена испытываемый образец (например, образец клеток в культуре, экспрессирующих ген-мишень) или используемую для испытаний модель млекопитающего (например, млекопитающего, такого как человек или животное), такую как модель грызуна (например, мыши) или примата, отличного от человека (например, обезьяны), подвергают контактированию с нуклеиновой кислотой, которая подавляет, снижает или ингибирует экспрессию гена-мишени. Экспрессию гена-мишени в испытываемом образце или у испытываемого животного сравнивают с экспрессией гена-мишени в контрольном образце (например, образце клеток в культуре, экспрессирующих ген-мишень) или модели контрольного млекопитающего (например, млекопитающего, такого как человек или животное), например модели грызуна (например, мыши) или

примата, отличного от человека (например, обезьяны), которые не контактировали с нуклеиновой кислотой или которым не вводили нуклеиновую кислоту. Экспрессии гена-мишени в контрольном образце или у контрольного млекопитающего может быть присвоено значение 100%. В конкретных вариантах осуществления подавление, ингибирование или снижение экспрессии гена-мишени достигается, когда уровень экспрессии гена-мишени в испытываемом образце или у испытуемого млекопитающего относительно уровня экспрессии гена-мишени в контрольном образце или у контрольного млекопитающего составляет около 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 0%. Другими словами, нуклеиновые кислоты способны подавлять, снижать или ингибировать экспрессию гена-мишени по меньшей мере примерно на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% в испытываемом образце или у испытуемого млекопитающего по сравнению с уровнем экспрессии гена-мишени в контрольном образце, не контактировавшем с нуклеиновой кислотой, или у контрольного млекопитающего, которому не вводили нуклеиновую кислоту. Подходящие анализы для определения уровня экспрессии гена-мишени включают, без ограничения, анализ уровней белка или мРНК с использованием методов, известных специалистам в данной области, таких как, например, дот-блоты, нозерн-блоты, гибридизация *in situ*, ELISA, иммунопреципитация, функция фермента, а также фенотипические анализы, известные специалистам в данной области.

“Эффективное количество” или “терапевтически эффективное количество” активного агента или терапевтического агента, такого как терапевтическая нуклеиновая кислота, представляет собой количество, достаточное для получения желаемого эффекта, например, повышения или ингибирования экспрессии последовательности-мишени по сравнению с нормальным уровнем экспрессии, обнаруженным в отсутствие нуклеиновой кислоты. Повышение экспрессии последовательности-мишени достигается при обнаружении любого измеримого уровня в случае продукта экспрессии, который не присутствует в отсутствие нуклеиновой кислоты. В случае, когда продукт экспрессии присутствует на некотором уровне до контактирования с нуклеиновой кислотой, повышение экспрессии достигается, когда кратное увеличение значения, полученного с нуклеиновой кислотой, такой как мРНК, по сравнению с контролем составляет около 1,05, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,75, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000, 5000, 10000 или больше. Ингибирование экспрессии гена-мишени или последовательности-мишени достигается, когда значение, полученное с нуклеиновой кислотой, такой как антисмысловой олигонуклеотид, относительно контроля составляет около 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 0%. Подходящие анализы для измерения экспрессии гена-мишени или последовательности-мишени включают, например, анализы уровней белка или РНК с использованием методов, известных специалистам в данной области, таких как дот-блоты, нозерн-блоты, гибридизация *in situ*, ELISA, иммунопреципитация, функция фермента, флуоресценция или люминесценция подходящих репортерных белков, а также

фенотипические анализы, известные специалистам в данной области.

Термин “нуклеиновая кислота” в контексте настоящей заявки относится к полимеру, содержащему по меньшей мере два дезоксирибонуклеотида или рибонуклеотида либо в одноцепочечной, либо в двухцепочечной форме, и включает ДНК, РНК и их гибриды. ДНК может быть в форме антисмысловых молекул, плазмидной ДНК, кДНК, продуктов ПЦР или векторов. РНК может быть в форме малой шпилечной РНК (мшРНК), матричной РНК (мРНК), антисмысловой РНК, микроРНК, микРНК, мультивалентной РНК, РНК - субстрата дайсера или вирусной РНК (вРНК) и их комбинаций. Нуклеиновые кислоты включают нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги нуклеотидов или модифицированные остатки скелета или связи, которые являются синтетическими, природными и не встречающимися в природе, и которые обладают такими же связывающими свойствами, что и эталонная нуклеиновая кислота. Примеры таких аналогов включают, без ограничения, фосфоротиоаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2'-О-метилрибонуклеотиды и пептид-нуклеиновые кислоты (ПНК). Если не указано иное, этот термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, обладающие такими же связывающими свойствами, как эталонная нуклеиновая кислота. Если не указано иное, подразумевается, что конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также охватывает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов), аллели, ортологи, однонуклеотидные полиморфизмы и комплементарные последовательности, а также явно указанную последовательность. В частности, замены вырожденных кодонов можно осуществить путем создания последовательностей, в которых третье положение одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов заменено смешанным основанием и/или дезоксиинозиновыми остатками (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.*, 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.*, 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98 (1994)). “Нуклеотиды” содержат сахар дезоксирибозу (ДНК) или рибозу (РНК), основание и фосфатную группу. Нуклеотиды связаны друг с другом через фосфатные группы. “Основания” включают пурины и пиримидины, которые также включают природные соединения аденин, тимин, гуанин, цитозин, урацил, инозин и природные аналоги, а также синтетические производные пуринов и пиримидинов, которые включают, но не ограничиваются этим, модификации, которые вводят новые реакционноспособные группы, такие как, но не ограничиваясь этим, амины, спирты, тиолы, карбоксилаты и алкилгалогениды.

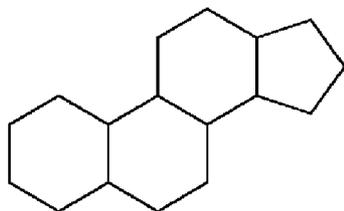
Термин “ген” относится к последовательности нуклеиновой кислоты (например, ДНК или РНК), которая включает кодирующие последовательности частичной или полной длины, необходимые для продукции полипептида или предшественника полипептида.

“Генный продукт” в контексте настоящей заявки относится к продукту гена, такому как РНК-транскрипт или полипептид.

Термин “липид” относится к группе органических соединений, которые включают, но не ограничиваются этим, сложные эфиры жирных кислот и обычно характеризуются

плохой растворимостью в воде, но растворимы во многих органических растворителях. Они обычно подразделяются по меньшей мере на три класса: (1) “простые липиды”, которые включают жиры и масла, а также воски; (2) “сложные липиды”, которые включают фосфолипиды и гликолипиды; и (3) “производные липиды” такие как стероиды.

“Стероид” представляет собой соединение, содержащее следующий углеродный скелет:



Неограничивающие примеры стероидов включают холестерин и т.п.

“Катионный липид” относится к липиду, способному быть положительно заряженным. Иллюстративные катионные липиды включают одну или несколько аминогрупп, которые несут положительный заряд. Предпочтительные катионные липиды являются ионизируемыми, так что они могут существовать в положительно заряженной или нейтральной форме в зависимости от pH. Ионизация катионного липида влияет на поверхностный заряд липидной наночастицы при различных условиях pH. Это заряженное состояние может влиять на абсорбцию белков плазмы, элиминацию из крови и распределение в тканях (Semple, S.C., et al., *Adv. Drug Deliv Rev* 32:3-17 (1998)), а также на способность образовывать эндосомолитические небислоиные структуры (Hafez, I.M., et al., *Gene Ther* 8:1188-1196 (2001)), критически важные для внутриклеточной доставки нуклеиновых кислот.

Термин “конъюгированный с полимером липид” относится к молекуле, включающей как липидную часть, так и полимерную часть. Примером конъюгированного с полимером липида является пегилированный липид. Термин “пегилированный липид” относится к молекуле, включающей как липидную часть, так и полиэтиленгликолевую часть. Пегилированные липиды известны в данной области и включают 1-(монометокси-полиэтиленгликоль)-2,3-димиристоилглицерин (PEG-DMG) и т.п.

Термин “нейтральный липид” относится к любому из ряда разновидностей липидов, которые существуют либо в незаряженной, либо в нейтральной цвиттер-ионной форме при выбранном pH. При физиологическом pH такие липиды включают, но не ограничиваются этим, фосфотидилхолины, такие как 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DMPC), 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (POPC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC), фосфатидилэтаноламины, такие как 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE), сфингомиелины (SM), церамиды, стероиды, такие как стеролы и их производные. Нейтральные липиды могут быть синтетическими или природными.

Термин “заряженный липид” относится к любому из ряда разновидностей липидов, которые существуют либо в положительно заряженной, либо в отрицательно заряженной форме, независимо от pH в полезном физиологическом диапазоне, например, от pH от ~3 до pH ~9. Заряженные липиды могут быть синтетическими или природными. Примеры заряженных липидов включают фосфатидилсерины, фосфатидные кислоты, фосфатидилглицерины, фосфатидилинозитолы, гемисукцинаты стерола, диалкилтриметиламмоний-пропаны (например, DOTAP, DOTMA), диалкилдиметиламинопропаны, этилфосфохолины, диметиламиноэтанкарбамоилстеролы (например, DC-Chol).

Термин “липидная наночастица” относится к частицам с размером, по меньшей мере в одном измерении, в нанометровом диапазоне (например, 1-1000 нм), которые включают одно или несколько соединений структуры (I) или другие определенные катионные липиды. В некоторых вариантах осуществления липидные наночастицы, содержащие описанные катионные липиды (например, соединения структуры (I)) включены в композицию, которую можно использовать для доставки активного агента или терапевтического агента, такого как нуклеиновая кислота (например, мРНК), к представляющему интерес участку-мишени (например, клетка, ткань, орган, опухоль и т.п.). В некоторых вариантах осуществления липидные наночастицы включают соединение структуры (I) и нуклеиновую кислоту. Такие липидные наночастицы обычно включают соединение структуры (I) и один или несколько эксципиентов, выбранных из нейтральных липидов, заряженных липидов, стероидов и конъюгированных с полимерами липидов. В некоторых вариантах осуществления активный агент или терапевтический агент, такой как нуклеиновая кислота, может быть инкапсулирован в липидную часть липидной наночастицы или в водное пространство, окруженное некоторой или всей липидной частью липидной наночастицы, с обеспечением, таким образом, его защиты от ферментативного расщепления или других нежелательных эффектов, вызываемых механизмами организма-хозяина или клеток, например неблагоприятного иммунного ответа.

В различных вариантах осуществления липидные наночастицы имеют средний диаметр от около 30 нм до около 150 нм, от около 40 нм до около 150 нм, от около 50 нм до около 150 нм, от около 60 нм до около 130 нм, от около 70 нм до около 110 нм, от около 70 нм до около 100 нм, от около 80 нм до около 100 нм, от около 90 нм до около 100 нм, от около 70 до около 90 нм, от около 80 нм до около 90 нм, от около 70 нм до около 80 нм, или около 30 нм, 35 нм, 40 нм, 45 нм, 50 нм, 55 нм, 60 нм, 65 нм, 70 нм, 75 нм, 80 нм, 85 нм, 90 нм, 95 нм, 100 нм, 105 нм, 110 нм, 115 нм, 120 нм, 125 нм, 130 нм, 135 нм, 140 нм, 145 нм или 150 нм. В некоторых вариантах осуществления липидные наночастицы практически нетоксичны. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, если они присутствуют в липидных наночастицах, устойчивы в водном растворе к расщеплению нуклеазой. Липидные наночастицы, включающие нуклеиновые кислоты, и способ их получения описаны, например, в публикациях патентов США №№ 2004/0142025, 2007/0042031 и Публикациях PCT WO 2013/016058 и WO 2013/086373, полное раскрытие

которых включено в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте для всех целей.

В контексте настоящей заявки “липид-инкапсулированный” относится к липидной наночастице, которая обеспечивает активный агент или терапевтический агент, такой как нуклеиновая кислота (например, мРНК), с полной инкапсуляцией, частичной инкапсуляцией или с тем и другим. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота (например, мРНК) полностью инкапсулирована в липидную наночастицу.

В контексте настоящей заявки термин “водный раствор” относится к композиции, включающей воду.

“Стабильность в сыворотке” в отношении наночастиц нуклеиновая кислота-липид означает, что нуклеотид по существу не расщепляется после нахождения в условиях сывороточного или нуклеазного анализа, которые могут значительно расщепить свободную ДНК или РНК. Подходящие анализы включают, например, стандартный сывороточный анализ, анализ ДНКазы или анализ РНКазы.

“Системная доставка” в контексте настоящей заявки относится к доставке терапевтического продукта, которая может привести к широкому воздействию активного агента в организме. Некоторые методы введения могут привести к системной доставке одних агентов, но не других. Системная доставка означает, что полезное, предпочтительно терапевтическое, количество агента воздействует на большинство частей организма. Системная доставка липидных наночастиц может осуществляться любым способом, известным в данной области, включая, например, внутривенную, внутриартериальную, подкожную и интраперитонеальную доставку. В некоторых вариантах осуществления системная доставка липидных наночастиц осуществляется внутривенно.

“Местная доставка” в контексте настоящей заявки относится к доставке активного агента непосредственно к целевому участку в организме. Например, агент может быть доставлен местно путем прямой инъекции в пораженный участок, такой как опухоль, другой участок-мишень, такой как участок воспаления, или орган-мишень, такой как печень, сердце, поджелудочная железа, почка и т.п. Местная доставка также может включать местное нанесение или локальные инъекции, такие как внутримышечная, подкожная или внутрикожная инъекция. Местная доставка не исключает системного фармакологического эффекта.

“Алкил” относится к углеводородному радикалу с прямой или разветвленной цепью, состоящему исключительно из атомов углерода и водорода, который является насыщенным и имеет, например, от одного до двадцати четырех атомов углерода (C_1 - C_{24} алкил), от четырех до двадцати атомов углерода (C_4 - C_{20} алкил), от шести до шестнадцати атомов углерода (C_6 - C_{16} алкил), от шести до девяти атомов углерода (C_6 - C_9 алкил), от одного до пятнадцати атомов углерода (C_1 - C_{15} алкил), от одного до двенадцати атомов углерода (C_1 - C_{12} алкил), от одного до восьми атомов углерода (C_1 - C_8 алкил) или от одного до шести атомов углерода (C_1 - C_6 алкил), и который присоединен к остальной части молекулы посредством простой связи, например, метил, этил, *n*-пропил, 1-метилэтил (изопропил), *n*-бутил, *n*-пентил, 1,1-диметилэтил (*трет*-бутил), 3-метилгексил, 2-метилгексил и т.п. Если

в описании конкретно не указано иное, алкильная группа является замещенной или незамещенной.

“Алкилен” относится к прямой или разветвленной двухвалентной углеводородной цепи, связывающей остальную часть молекулы с радикальной группой, состоящей исключительно из углерода и водорода, которая является насыщенной и имеет, например, от одного до двадцати четырех атомов углерода (C_1 - C_{24} алкилен), от одного до пятнадцати атомов углерода (C_1 - C_{15} алкилен), от одного до двенадцати атомов углерода (C_1 - C_{12} алкилен), от одного до восьми атомов углерода (C_1 - C_8 алкилен), от одного до шести атомов углерода (C_1 - C_6 алкилен), от двух до четырех атомов углерода (C_2 - C_4 алкилен), от одного до двух атомов углерода (C_1 - C_2 алкилен), например, метилен, этилен, пропилен, *n*-бутилен и т.п. Алкиленовая цепь присоединена к остальной части молекулы через простую связь и к радикальной группе через простую связь. Точки присоединения алкиленовой цепи к остальной части молекулы и к радикальной группе могут проходить через один углерод или любые два атома углерода в цепи. Если в описании конкретно не указано иное, алкиленовая цепь является замещенной или незамещенной.

“Алкен” и “алкенилен” относятся к алкилу и алкилену, соответственно, включающим по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь. Алкены и алкенилены включают такое же количество атомов углерода, как алкил и алкилен, определенные выше, за исключением того, что алкены и алкенилены должны включать по меньшей мере два атома углерода. Если в описании конкретно не указано иное, алкены и алкенилены являются замещенными или незамещенными.

Термин “замещенный”, используемый в настоящей заявке, означает любую из вышеуказанных групп (например, алкильную или алкиленовую), в которой по меньшей мере один атом водорода заменен связью с неводородным атомом, таким как, но не ограничиваясь этим: атом галогена, такой как F, Cl, Br, или I; оксо группы ($=O$); гидроксильные группы ($-OH$); карбоксильные группы ($-CO_2H$); C_1 - C_{12} алкильные группы; $-(C=O)OR'$; $-O(C=O)R'$; $-C(=O)R'$; $-OR'$; $-S(O)_xR'$; $-S-SR'$; $-C(=O)SR'$; $-SC(=O)R'$; $-NR'R'$; $-NR'C(=O)R'$; $-C(=O)NR'R'$; $-NR'C(=O)NR'R'$; $-OC(=O)NR'R'$; $-NR'C(=O)OR'$; $-NR'S(O)_xNR'R'$; $-NR'S(O)_xR'$; и $-S(O)_xNR'R'$, где: R' в каждом случае независимо представляет собой H или C_1 - C_{15} алкил и x имеет значение 0, 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления заместитель представляет собой C_1 - C_{12} алкильную группу. В других вариантах осуществления заместитель представляет собой галогеновую группу, такую как фтор. В других вариантах осуществления заместитель представляет собой оксо группу. В других вариантах осуществления заместитель представляет собой гидроксильную группу. В других вариантах осуществления заместитель представляет собой алкокси группу ($-OR'$). В других вариантах осуществления заместитель представляет собой карбоксильную группу. В других вариантах осуществления заместитель представляет собой аминовую группу ($-NR'R'$).

“Необязательный” или “необязательно” (например, необязательно замещенный) означает, что описанное впоследствии событие или обстоятельство может произойти или

не произойти, и что описание включает случаи, когда указанное событие или обстоятельство имеет место, и случаи, когда они не происходят. Например, “необязательно замещенный алкил” означает, что алкильный радикал может быть или не быть замещенным, и что описание включает как замещенные алкильные радикалы, так и алкильные радикалы, не имеющие замещения.

Изобретение, раскрытое в настоящей заявке, также предназначено для охвата всех фармацевтически приемлемых соединений соединения структуры (I), являющихся изотопно-меченными за счет замены одного или нескольких атомов атомом, имеющим другую атомную массу или массовое число. Примеры изотопов, которые могут быть включены в раскрытые соединения, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, фтора, хлора и йода, такие как ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{123}I и ^{125}I , соответственно. Эти радиоактивно меченные соединения могут быть полезны для определения или измерения эффективности соединений, характеризуя, например, места или способ действия или аффинность связывания с фармакологически важным местом действия. Некоторые изотопно-меченные соединения структуры (I), (IA) или (IB), например соединения, включающие радиоактивный изотоп, полезны в исследованиях распределения лекарственного средства и/или субстрата в тканях. Радиоактивные изотопы тритий, т.е. ^3H , и углерод-14, т.е. ^{14}C , особенно полезны для этой цели ввиду легкости их введения и простых средств детекции.

Замещение более тяжелыми изотопами, такими как дейтерий, т.е. ^2H , может обеспечить определенные терапевтические преимущества, обусловленные большей метаболической стабильностью, например, увеличенным периодом полувыведения *in vivo* или уменьшенными требованиями к дозировке, и, следовательно, может быть предпочтительным в некоторых обстоятельствах.

Замещение позитрон-излучающими изотопами, такими как ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O и ^{13}N , может быть полезно в исследованиях с использованием позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) для определения занятости рецепторов субстратом. Изотопно-меченные соединения структуры (I), как правило, могут быть получены обычными методами, известными специалистам в данной области, или способами, аналогичными тем, которые описаны в разделе Получения и Примеры, представленном ниже, с использованием соответствующего изотопно-меченного реагента вместо ранее использовавшегося немеченого реагента.

“Стабильное соединение” и “стабильная структура” предназначены для обозначения соединения, которое является достаточно устойчивым, чтобы выдержать выделение до приемлемой степени чистоты из реакционной смеси и формулирование в эффективное терапевтическое средство.

“Млекопитающее” включает людей и как домашних животных, таких как лабораторные животные и домашние животные (например, кошки, собаки, свиньи, крупный рогатый скот, овцы, козы, лошади, кролики), так и не домашних животных, таких как дикие животные и т.п.

“Фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент” включает

без ограничения любой адъювант, носитель, эксципиент, глидант, подсластитель, разбавитель, консервант, красящее вещество/краситель, усилитель вкуса, поверхностно-активное вещество, смачивающий агент, диспергирующий агент, суспендирующий агент, стабилизатор, изотонический агент, растворитель или эмульгатор, которые были одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США как приемлемые для применения для людей или домашних животных.

“Фармацевтически приемлемая соль” включает как кислотно-аддитивные, так и основно-аддитивные соли.

“Фармацевтически приемлемая кислотно-аддитивная соль” относится к тем солям, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства свободных оснований, которые не являются нежелательными с биологической или иной точки зрения и которые образуются с неорганическими кислотами, такими как, но не ограничиваясь этим, хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота и т.п., и органическими кислотами, такими как, но не ограничиваясь этим, уксусная кислота, 2,2-дихлоруксусная кислота, адипиновая кислота, альгиновая кислота, аскорбиновая кислота, аспарагиновая кислота, бензолсульфоновая кислота, бензойная кислота, 4-ацетамидобензойная кислота, камфорная кислота, камфор-10-сульфоновая кислота, каприновая кислота, капроновая кислота, каприловая кислота, угольная кислота, коричная кислота, лимонная кислота, цикламовая кислота, додецилсерная кислота, этан-1,2-дисульфоновая кислота, этансульфоновая кислота, 2-гидроксиэтансульфоновая кислота, муравьиная кислота, фумаровая кислота, галактаровая кислота, гентизиновая кислота, глюкогептоновая кислота, глюконовая кислота, глюкуроновая кислота, глутаминовая кислота, глутаровая кислота, 2-оксоглутаровая кислота, глицерофосфорная кислота, гликолевая кислота, гиппуровая кислота, изомаляновая кислота, молочная кислота, лактобионовая кислота, лауриновая кислота, малеиновая кислота, яблочная кислота, малоновая кислота, миндальная кислота, метансульфоновая кислота, муциновая кислота, нафталин-1,5-дисульфоновая кислота, нафталин-2-сульфоновая кислота, 1-гидрокси-2-нафтойная кислота, никотиновая кислота, олеиновая кислота, оротовая кислота, щавелевая кислота, пальмитиновая кислота, палмовая кислота, пропионовая кислота, пироглутаминовая кислота, пирувиновая кислота, салициловая кислота, 4-аминосалициловая кислота, себациновая кислота, стеариновая кислота, янтарная кислота, винная кислота, тиоциановая кислота, п-толуолсульфоновая кислота, трифторуксусная кислота, ундециленовая кислота и т.п.

“Фармацевтически приемлемая основно-аддитивная соль” относится к тем солям, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства свободных кислот, которые не являются биологически или иным образом нежелательными. Эти соли получают добавлением неорганического основания или органического основания к свободной кислоте. Соли, полученные из неорганических оснований, включают, но не ограничиваются этим, соли натрия, калия, лития, аммония, кальция, магния, железа, цинка, меди, марганца, алюминия и т.п. Предпочтительными неорганическими солями являются соли аммония,

натрия, калия, кальция и магния. Соли, полученные из органических оснований, включают, но не ограничиваются этим, соли первичных, вторичных и третичных аминов, замещенных аминов, включая встречающиеся в природе замещенные амины, циклические амины и основные ионообменные смолы, такие как аммиак, изопропиламин, триметиламин, диэтиламин, триэтиламин, трипропиламин, диэтанолламин, этанолламин, деанол, 2-диметиламиноэтанол, 2-диэтиламиноэтанол, дициклогексиламин, лизин, аргинин, гистидин, кофеин, прокаин, гидрабамин, холин, бетаин, бенетамин, бензатин, этилендиамин, глюкозамин, метилглюкамин, теобромин, триэтанолламин, трометамин, пурины, пиперазин, пиперидин, N-этилпиперидин, полиаминовые смолы и т.п. Особенно предпочтительными органическими основаниями являются изопропиламин, диэтиламин, этанолламин, триметиламин, дициклогексиламин, холин и кофеин.

Часто в результате кристаллизации образуется сольват соединения по настоящему изобретению (т.е. соединения структуры (I)). В контексте настоящей заявки термин “сольват” относится к агрегату, который включает одну или несколько молекул соединения по настоящему изобретению с одной или несколькими молекулами растворителя. Растворителем может быть вода, и в этом случае сольват может быть гидратом. Альтернативно, растворитель может быть органическим растворителем. Таким образом, соединения по настоящему изобретению могут существовать в виде гидратов, включая моногидрат, дигидрат, полугидрат, полуторагидрат, тригидрат, тетрагидрат и т.п., а также соответствующих сольватированных форм. Сольваты соединения по настоящему изобретению могут быть истинными сольватами, в то время как в других случаях соединение по настоящему изобретению может просто удерживать постороннюю воду или представлять собой смесь воды и некоторого постороннего растворителя.

“Фармацевтическая композиция” относится к композиции соединения по настоящему изобретению и среды, общепринятой в данной области техники для доставки биологически активного соединения млекопитающим, например людям. Такая среда включает все фармацевтически приемлемые носители, разбавители или эксципиенты для этого.

“Эффективное количество” или “терапевтически эффективное количество” относится к такому количеству соединения по настоящему изобретению, которое при введении млекопитающему, предпочтительно человеку, является достаточным для осуществления лечения млекопитающего, предпочтительно человека. Количество липидной наночастицы по настоящему изобретению, которое составляет “терапевтически эффективное количество”, будет варьироваться в зависимости от соединения, состояния и его тяжести, способа введения и возраста млекопитающего, подлежащего лечению, но может быть определено обычным образом специалистом в данной области на основании его собственных знаний и данного раскрытия.

“Лечащий” или “лечение” в контексте настоящей заявки охватывает лечение представляющего интерес заболевания или состояния у млекопитающего, предпочтительно у человека, страдающего представляющим интерес заболеванием или патологическим

состоянием, и включает:

(i) предотвращение возникновения заболевания или состояния у млекопитающего, в частности, когда такое млекопитающее предрасположено к состоянию, но у него оно еще не диагностировано;

(ii) ингибирование заболевания или состояния, т.е. подавление его развития;

(iii) облегчение заболевания или состояния, т.е. индукцию регрессии заболевания или состояния; или

(iv) облегчение симптомов, возникающих в результате заболевания или состояния, т.е. облегчение боли без воздействия на основное заболевание или состояние. В контексте настоящей заявки термины “заболевание” и “состояние” можно использовать взаимозаменяемо или они могут различаться тем, что конкретное заболевание или состояние может не иметь известного причинного фактора (поэтому этиология еще не выяснена), и поэтому еще не признано заболеванием, а только нежелательным состоянием или синдромом, при котором клиницистами идентифицирован более или менее специфический набор симптомов.

Соединения по настоящему изобретению или их фармацевтически приемлемые соли могут содержать один или несколько стереоцентров и, таким образом, могут давать энантиомеры, диастереомеры и другие стереоизомерные формы, которые могут быть определены с точки зрения абсолютной стереохимии как (R) или (S), или как (D) или (L) для аминокислот. Предполагается, что настоящее раскрытие включает все такие возможные изомеры, а также их рацемические и оптически чистые формы. Оптически активные (+) и (-), (R) и (S) или (D) и (L) изомеры могут быть получены с использованием хиральных синтонов или хиральных реагентов, или их можно разделить с использованием обычных методов, например, хроматографии и фракционной кристаллизации. Обычные методы получения/выделения индивидуальных энантиомеров включают хиральный синтез из подходящего оптически чистого предшественника или разделение рацемата (или рацемата соли или производного) с использованием, например, хиральной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Когда соединения, описанные в настоящей заявке, содержат олефиновые двойные связи или другие центры геометрической асимметрии, и если не указано иное, подразумевается, что соединения включают оба геометрических изомера E и Z. Точно так же предполагается, что включены все таутомерные формы.

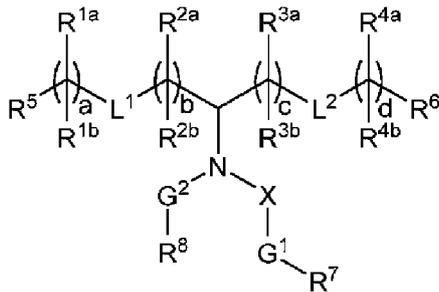
“Стереоизомер” относится к соединению, состоящему из одинаковых атомов, связанных теми же самыми связями, но имеющему различные трехмерные структуры, которые не являются взаимозаменяемыми. Настоящее раскрытие рассматривает различные стереоизомеры и их смеси и включает “энантиомеры”, которые относятся к двум стереоизомерам, молекулы которых являются несовместимыми зеркальными отображениями друг друга.

“Таутомер” относится к сдвигу протона от одного атома молекулы к другому атому той же молекулы. Настоящее раскрытие включает таутомеры любых указанных соединений.

Соединения

В одном аспекте изобретение обеспечивает новые липидные соединения, которые способны объединяться с другими липидными компонентами, такими как нейтральные липиды, заряженные липиды, стероиды и/или полимер-конъюгированные липиды, с образованием липидных наночастиц с терапевтическими агентами, такими как олигонуклеотиды. Без ограничения какой-либо теорией, считается, что эти липидные наночастицы защищают терапевтический агент от разложения в сыворотке и обеспечивают эффективную доставку терапевтического агента в клетки *in vitro* и *in vivo*.

В одном варианте осуществления соединения имеют следующую структуру (I):



(I)

или фармацевтически приемлемая соль, таутомер или стереоизомер такого соединения, где:

G^1 и G^2 , каждый независимо, представляют собой C_1 - C_6 алкилен;

L^1 и L^2 , каждый независимо, представляют собой $-O(C=O)-$ или $-(C=O)O-$;

R^{1a} и R^{1b} в каждом случае независимо представляют собой либо: (a) H или C_1 - C_{12} алкил; либо (b) R^{1a} представляет собой H или C_1 - C_{12} алкил, а R^{1b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, взятый вместе со смежным R^{1b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь;

R^{2a} и R^{2b} в каждом случае независимо представляют собой либо: (a) H или C_1 - C_{12} алкил; либо (b) R^{2a} представляет собой H или C_1 - C_{12} алкил, а R^{2b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, взятый вместе со смежным R^{2b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь;

R^{3a} и R^{3b} в каждом случае независимо представляют собой либо (a): H или C_1 - C_{12} алкил; либо (b) R^{3a} представляет собой H или C_1 - C_{12} алкил, а R^{3b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, взятый вместе со смежным R^{3b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь;

R^{4a} и R^{4b} в каждом случае независимо представляют собой либо: (a) H или C_1 - C_{12} алкил; либо (b) R^{4a} представляет собой H или C_1 - C_{12} алкил, а R^{4b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, взятый вместе со смежным R^{4b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь;

R^5 и R^6 , каждый независимо, представляют собой H или метил;

R^7 представляет собой $-O(C=O)R^{10}$, $-(C=O)OR^{10}$, $-NR^9(C=O)R^{10}$ или $-(C=O)NR^9R^{10}$;

R^8 представляет собой OH, $-N(R^{11})(C=O)R^{12}$, $-(C=O)NR^{11}R^{12}$, $-NR^{11}R^{12}$, $-(C=O)OR^{12}$

или $-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{R}^{12}$;

R^9 представляет собой H или $\text{C}_1\text{-C}_{15}$ алкил;

R^{10} представляет собой $\text{C}_1\text{-C}_{15}$ алкил;

R^{11} представляет собой H или $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкил;

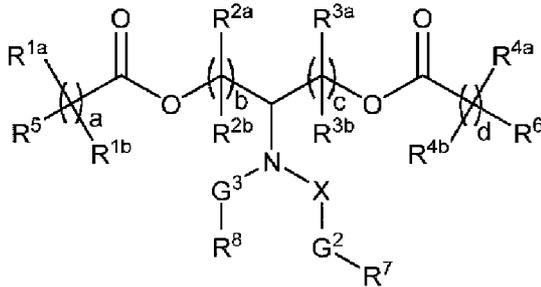
R^{12} представляет собой $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкил;

X представляет собой $-(\text{C}=\text{O})-$ или прямую связь; и

a, b, c и d, каждый независимо, представляют собой целое число от 1 до 24;

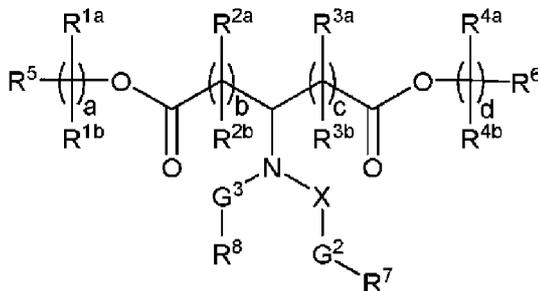
где каждый алкил и алкилен независимо необязательно замещены.

В других вариантах осуществления соединение имеет одну из следующих структур (IA) или (IB):



(IA)

или



(IB)

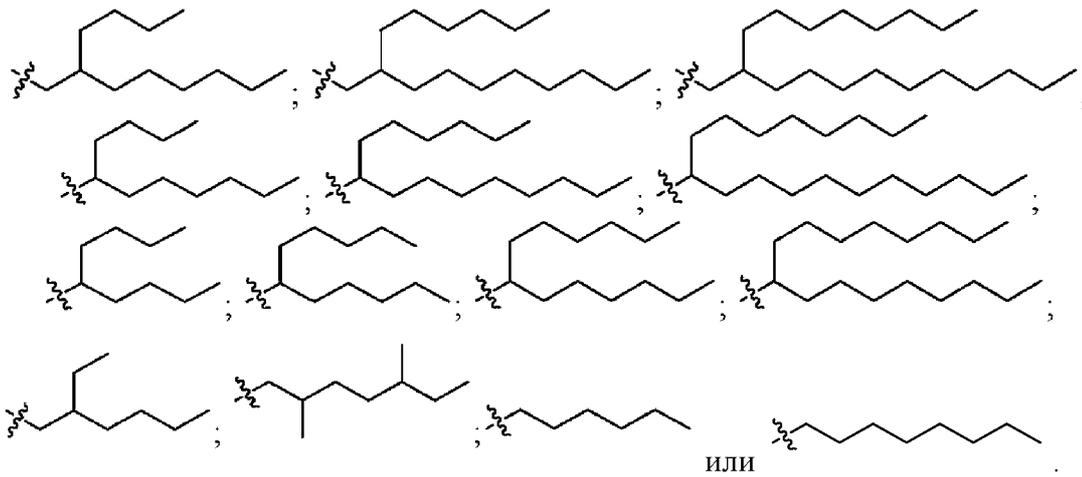
или фармацевтически приемлемая соль, таутомер или стереоизомер такого соединения.

В некоторых вариантах осуществления G^1 представляет собой $\text{C}_2\text{-C}_3$ алкилен. В других вариантах осуществления G^1 представляет собой $\text{C}_4\text{-C}_6$ алкилен. Например, в различных вариантах осуществления G^1 представляет собой C_2 , C_3 , C_4 , C_5 или C_6 алкилен.

В других вариантах осуществления G^2 представляет собой $\text{C}_2\text{-C}_4$ алкилен, например $\text{C}_2\text{-C}_3$ алкилен или $\text{C}_3\text{-C}_4$ алкилен. В некоторых вариантах осуществления G^2 представляет собой C_2 , C_3 или C_4 алкилен.

В различных других вариантах осуществления X представляет собой $-(\text{C}=\text{O})-$, в то время как в других вариантах осуществления X представляет собой прямую связь.

В любом из приведенных выше вариантов осуществления R^7 представляет собой -



В других вариантах осуществления a, b, c и d, каждый независимо, представляют собой целое число от 2 до 12. В других вариантах осуществления a, b, c и d, каждый независимо, представляют собой целое число от 4 до 10, от 5 до 10, от 6 до 10, от 4 до 9, от 5 до 9 или от 6 до 9. В других вариантах осуществления b и c независимо представляют собой 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

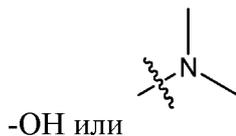
В некоторых вариантах осуществления один из R^5 или R^6 представляет собой метил. В других вариантах осуществления каждый из R^5 и R^6 представляет собой метил.

В некоторых вариантах осуществления R^8 представляет собой OH.

В других вариантах осуществления R^8 представляет собой $-N(R^{11})(C=O)R^{12}$. В других вариантах осуществления R^8 представляет собой $-(C=O)NR^{11}R^{12}$. В некоторых других вариантах осуществления R^8 представляет собой $-NR^{11}R^{12}$. В некоторых из этих вышеизложенных вариантов осуществления R^{11} и R^{12} , каждый независимо, представляют собой H или C_1 - C_8 алкил. В других из этих вариантов осуществления R^{11} и R^{12} , каждый независимо, представляют собой H или C_1 - C_3 алкил. Например, в некоторых вариантах осуществления C_1 - C_8 алкил или C_1 - C_3 алкил является незамещенным или замещен гидроксиллом. В других таких вариантах осуществления R^{11} и R^{12} , каждый, представляют собой метил.

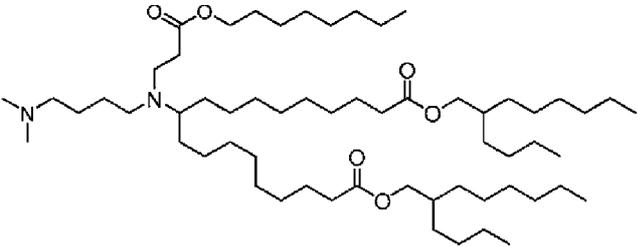
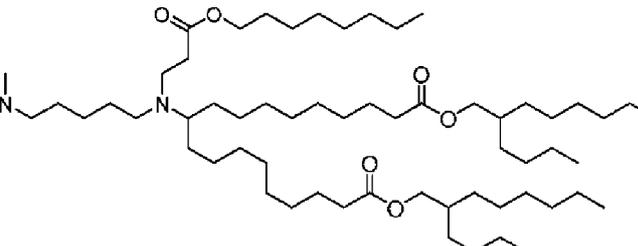
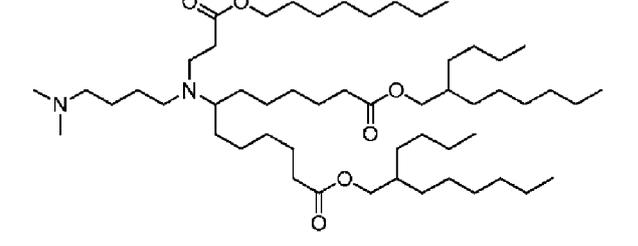
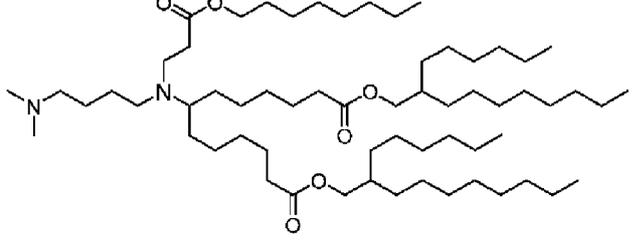
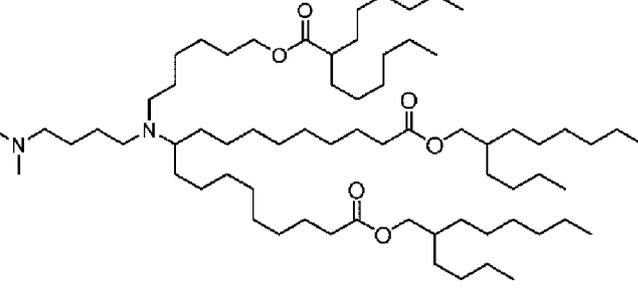
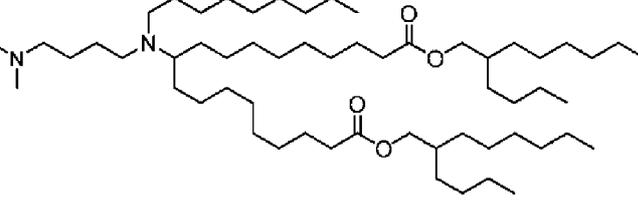
В других вариантах осуществления соединения структуры (I) R^8 представляет собой $-(C=O)OR^{12}$, тогда как в других вариантах осуществления R^8 представляет собой $-O(C=O)R^{12}$.

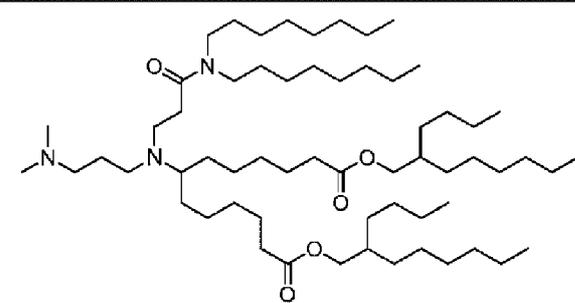
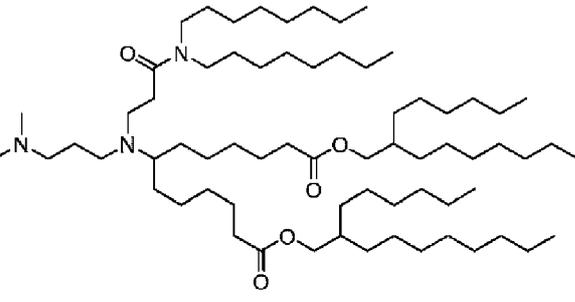
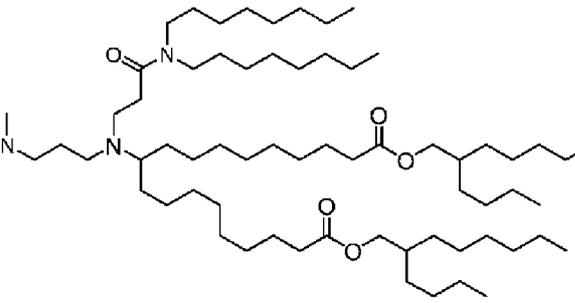
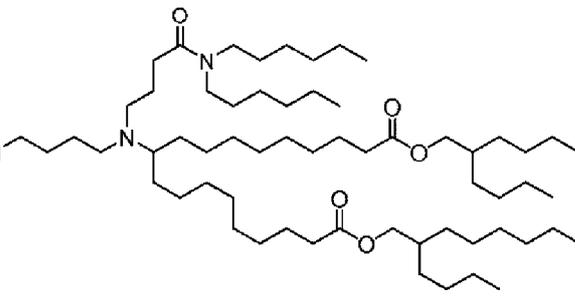
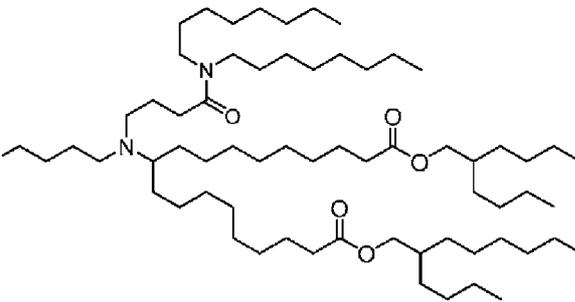
В конкретных вариантах осуществления любого из вышеуказанных соединений R^8 имеет одну из следующих структур:

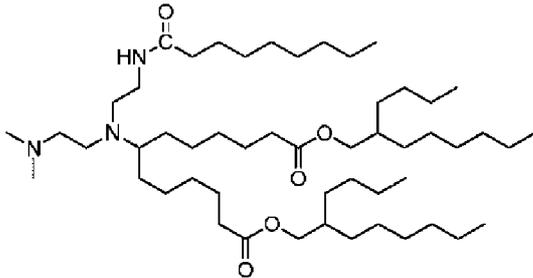
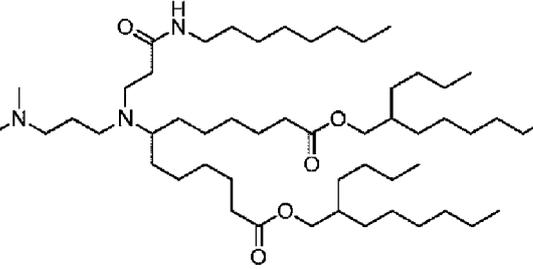
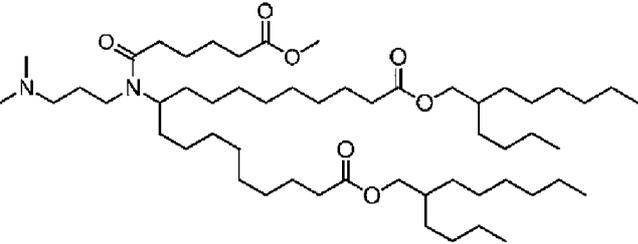
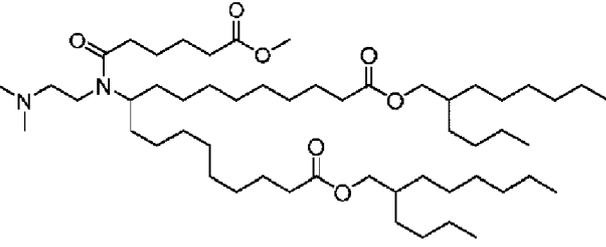
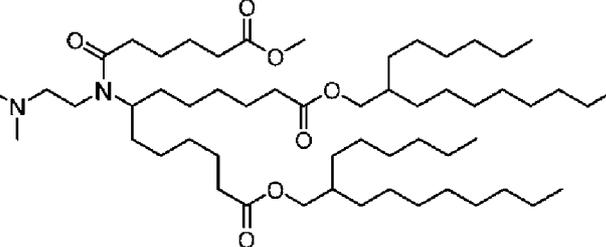


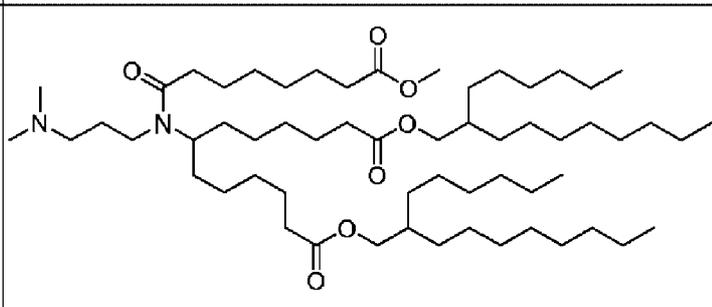
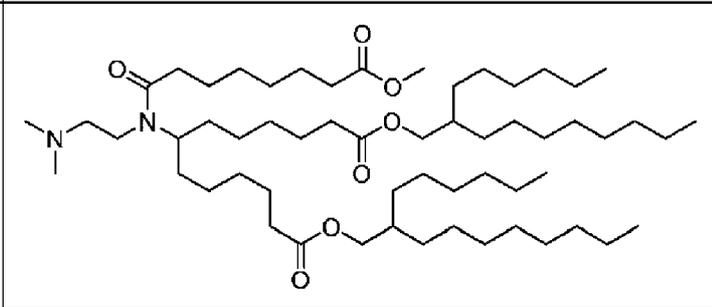
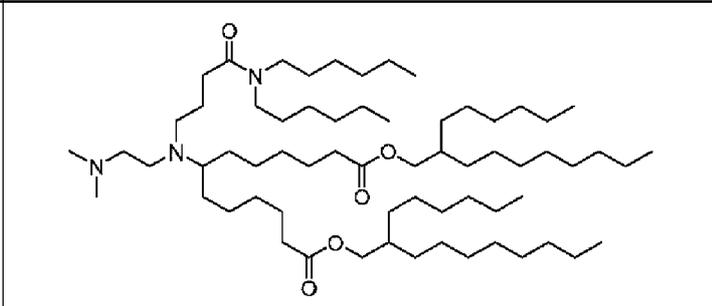
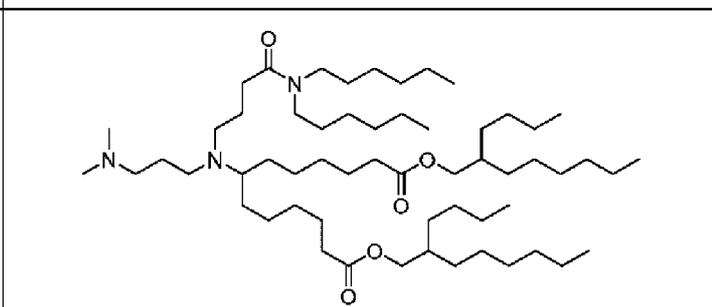
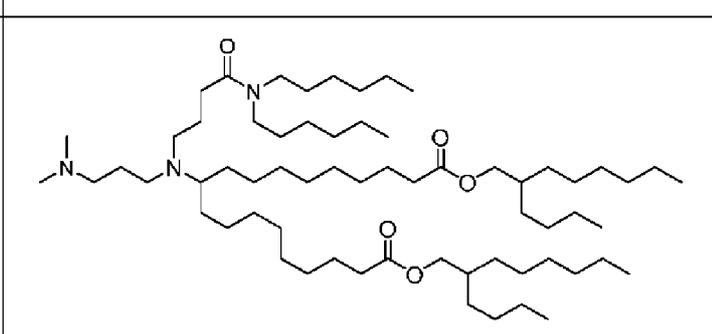
В других различных вариантах осуществления изобретение обеспечивает соединение, имеющее одну из структур, представленных в Таблице 1 ниже, или его фармацевтически приемлемую соль или таутомер.

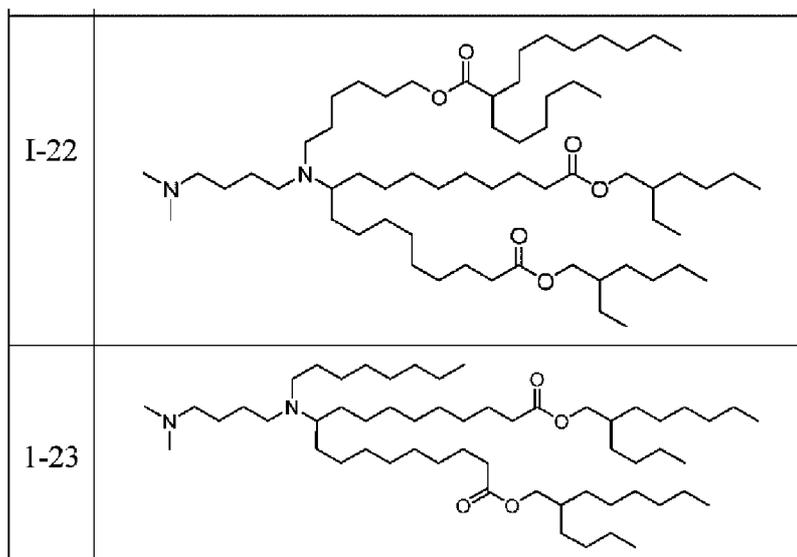
Репрезентативные соединения

| № | Структура |
|-----|--|
| I-1 |  |
| I-2 |  |
| I-3 |  |
| I-4 |  |
| I-5 |  |
| I-6 |  |

| | |
|------|--|
| I-7 |  |
| I-8 |  |
| I-9 |  |
| I-10 |  |
| I-11 |  |

| | |
|------|--|
| I-12 |  <p>Chemical structure I-12: A complex molecule featuring a central nitrogen atom bonded to a dimethylamino group, a long alkyl chain, and a side chain containing a secondary amide and two ester groups.</p> |
| I-13 |  <p>Chemical structure I-13: Similar to I-12, but with a primary amide group instead of a secondary amide.</p> |
| I-14 |  <p>Chemical structure I-14: Similar to I-12, but with a methyl ester group on the side chain.</p> |
| I-15 |  <p>Chemical structure I-15: Similar to I-14, but with a different ester group.</p> |
| I-16 |  <p>Chemical structure I-16: Similar to I-14, but with a different ester group.</p> |

| | |
|------|--|
| I-17 |  |
| I-18 |  |
| I-19 |  |
| I-20 |  |
| I-21 |  |



Должно быть понятно, что любой вариант осуществления соединений структуры (I), описанный выше, и любой конкретный заместитель и/или переменная в соединении структуры (I), описанные выше, могут быть независимо объединены с другими вариантами осуществления и/или заместителями и/или переменными соединений структуры (I) для формирования вариантов осуществления настоящего изобретения, конкретно не изложенных выше. Кроме того, в случае, если перечень заместителей и/или переменных указан для какой-либо конкретной R группы, G группы, L группы или переменной a, b, c, d или n в конкретном варианте осуществления и/или формуле изобретения, подразумевается, что каждый отдельный заместитель и/или переменная могут быть исключены из конкретного варианта осуществления и/или пункта формулы изобретения, и что оставшийся перечень заместителей и/или переменных будет считаться входящим в объем настоящего изобретения.

Должно быть понятно, что в настоящем описании комбинации заместителей и/или переменных представленных формул допустимы только в том случае, если это приводит к получению стабильных соединений.

В некоторых вариантах осуществления представлены липидные наночастицы, включающие соединение структуры (I). Липидные наночастицы необязательно включают эксципиенты, выбранные из нейтрального липида, стероида и конъюгированного с полимером липида.

В некоторых вариантах осуществления представлены композиции, включающие любое одно или несколько соединений структуры (I) и терапевтический агент. Например, в некоторых вариантах осуществления композиции включают любые из соединений структуры (I) и терапевтический агент и один или несколько эксципиентов, выбранных из нейтральных липидов, стероидов и конъюгированных с полимерами липидов. Другие фармацевтически приемлемые эксципиенты и/или носители также включены в различные варианты осуществления композиций.

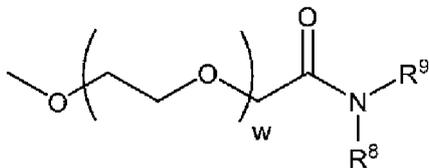
В некоторых вариантах осуществления нейтральный липид выбран из DSPC, DPPC, DMPC, DOPC, POPC, DOPE и SM. В некоторых вариантах осуществления нейтральный

липид представляет собой DSPC. В различных вариантах осуществления молярное отношение соединения к нейтральному липиду находится в диапазоне от около 2:1 до около 8:1.

В различных вариантах осуществления композиции дополнительно включают стероид или аналог стероида. В некоторых вариантах осуществления стероид или аналог стероида представляет собой холестерин. В некоторых из этих вариантов осуществления молярное отношение соединения к холестерину находится в диапазоне от около 5:1 до 1:1.

В различных вариантах осуществления конъюгированный с полимером липид представляет собой пегилированный липид. Например, некоторые варианты осуществления включают пегилированный диацилглицерин (PEG-DAG), такой как 1-(монометоксиполиэтиленгликоль)-2,3-димиристоилглицерин (PEG-DMG), пегилированный фосфатидилэтаноламин (PEG-PE), PEG-сукцинатдиацилглицерин (PEG-S-DAG), такой как 4-O-(2',3'-ди(тетрадеканоксипропил)-1-O-(ω -метокси(полиэтокси)этил)бутандиоат (PEG-S-DMG), пегилированный церамид (PEG-cer), или PEG диалкоксипропилкарбамат, такой как ω -метокси(полиэтокси)этил-N-(2,3-ди(тетрадеканокси)пропил)карбамат или 2,3-ди(тетрадеканокси)пропил-N-(ω -метокси(полиэтокси)этил)карбамат. В различных вариантах осуществления молярное отношение соединения к пегилированному липиду находится в диапазоне от около 100:1 до около 20:1.

В некоторых вариантах осуществления композиция включает пегилированный липид, имеющий следующую структуру (II):



(II)

или его фармацевтически приемлемую соль, таутомер или стереоизомер, где:

R⁸ и R⁹, каждый независимо, представляют собой прямую или разветвленную, насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, содержащую от 10 до 30 атомов углерода, где алкильная цепь необязательно прерывается одной или несколькими сложноэфирными связями; и

w имеет среднее значение в диапазоне от 30 до 60.

В некоторых вариантах осуществления R⁸ и R⁹, каждый независимо, представляют собой прямые насыщенные алкильные цепи, содержащие от 12 до 16 атомов углерода. В других вариантах осуществления среднее значение w находится в диапазоне от около 42 до 55, например около 49.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанной композиции терапевтический агент включает нуклеиновую кислоту. Например, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота выбрана из антисмысловой и матричной РНК. В

некоторых из вышеуказанных вариантов осуществления композиция включает липидную наночастицу.

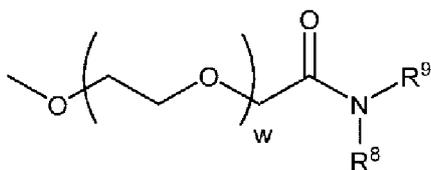
Некоторые подобные варианты осуществления обеспечивают липидную наночастицу, включающую соединение в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления (например, соединение структуры (I)). В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица также включает терапевтический агент (например, нуклеиновую кислоту, такую как антисмысловая и матричная РНК).

В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица дополнительно включает один или несколько эксципиентов, выбранных из нейтральных липидов, стероидов и конъюгированных с полимерами липидов. В некоторых вариантах осуществления нейтральные липиды выбраны из DSPC, DPPC, DMPC, DOPC, POPC, DOPE и SM. В более конкретных вариантах осуществления нейтральный липид представляет собой DSPC.

В некоторых более конкретных вариантах осуществления молярное отношение соединения к нейтральному липиду находится в диапазоне от около 2:1 до около 8:1. В некоторых вариантах осуществления стероид представляет собой холестерин. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение соединения к холестерину находится в диапазоне от 5:1 до 1:1.

В некоторых вариантах осуществления конъюгированный с полимером липид представляет собой пегилированный липид. В некоторых более конкретных вариантах осуществления молярное отношение соединения к пегилированному липиду находится в диапазоне от около 100:1 до около 20:1.

В некоторых вариантах осуществления пегилированный липид представляет собой PEG-DAG, PEG-PE, PEG-S-DAG, PEG-сег или PEG диалкилоксипропилкарбамат. В других вариантах осуществления представлен пегилированный липид, имеющий следующую структуру (II):



(II)

или его фармацевтически приемлемая соль, таутомер или стереоизомер, где:

R⁸ и R⁹, каждый независимо, представляют собой прямую или разветвленную, насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, содержащую от 10 до 30 атомов углерода, где алкильная цепь необязательно прерывается одной или несколькими сложноэфирными связями; и

w имеет среднее значение в диапазоне от 30 до 60.

В некоторых более конкретных вариантах осуществления структуры (II) R⁸ и R⁹, каждый независимо, представляют собой прямые насыщенные алкильные цепи,

содержащие от 12 до 16 атомов углерода. В более конкретных вариантах осуществления среднее значение w составляет около 49.

В других различных вариантах осуществления изобретение относится к способу введения терапевтического агента нуждающемуся в этом пациенту, при этом способ включает получение или обеспечение любой из вышеуказанных композиций и введение композиции пациенту.

Для целей введения варианты осуществления соединений по настоящему изобретению (обычно в форме липидных наночастиц в комбинации с терапевтическим агентом) можно вводить в виде необработанного химического вещества или их можно сформулировать в виде фармацевтических композиций. Фармацевтические композиции вариантов осуществления настоящего изобретения включают соединение структуры (I) и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов. В некоторых вариантах осуществления соединение структуры (I) присутствует в композиции в количестве, эффективном для образования липидной наночастицы и доставки терапевтического агента, например, для лечения конкретного представляющего интерес заболевания или состояния. Подходящие концентрации и дозировки могут быть легко определены специалистом в данной области.

Введение композиций вариантов осуществления изобретения может осуществляться любым из принятых способов введения агентов для выполнения аналогичных функций. Фармацевтические композиции вариантов осуществления настоящего изобретения можно сформулировать в виде препаратов в твердой, полутвердой, жидкой или газообразной формах, таких как таблетки, капсулы, порошки, гранулы, мази, растворы, суспензии, суппозитории, инъекционные формы, ингалянты, гели, микросферы, и аэрозоли. Типичные пути введения таких фармацевтических композиций включают, без ограничения, пероральный, местный, чрескожный, ингаляционный, парентеральный, подъязычный, трансбуккальный, ректальный, вагинальный и интраназальный. Термин парентеральный в контексте настоящей заявки включает подкожные инъекции, внутривенные, внутримышечные, внутрикожные, интратеральные инъекции или инфузии. Фармацевтические композиции вариантов осуществления настоящего изобретения формулируют таким образом, чтобы активные ингредиенты, содержащиеся в них, были биодоступными при введении композиции пациенту. Композиции для введения субъекту или пациенту в некоторых вариантах осуществления имеют форму одной или нескольких единиц дозирования, где, например, таблетка может представлять собой одну единицу дозирования, а контейнер с соединением согласно вариантам осуществления изобретения в форме аэрозоля может содержать множество единиц дозирования. Конкретные способы получения таких лекарственных форм известны или будут очевидны специалистам в данной области; например, см. *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000). В некоторых вариантах осуществления композиция для введения в любом случае будет содержать терапевтически эффективное количество соединения по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой

соли для лечения представляющего интерес заболевания или состояния в соответствии с указаниями настоящего раскрытия.

Фармацевтическая композиция вариантов осуществления настоящего изобретения может быть в твердой или жидкой форме. В одном аспекте носители находятся в форме частиц, таким образом, композиции находятся, например, в форме таблеток или порошков. Носитель(носители) может быть жидким, при этом композиции могут быть, например, в форме сиропа для перорального применения, жидкости для инъекций или аэрозоля, который удобен, например, для ингаляционного введения.

Когда она предназначена для перорального введения, фармацевтическая композиция в соответствии с некоторыми вариантами осуществления предпочтительно находится либо в твердой, либо в жидкой форме, где полутвердая, полужидкая, суспензионная и гелевая формы включены в формы, рассматриваемые в настоящей заявке как твердые или жидкие.

В качестве твердой композиции для перорального введения фармацевтическая композиция согласно некоторым вариантам осуществления может быть сформулирована в виде порошка, гранулы, прессованной таблетки, пилюли, капсулы, жевательной резинки, облатки или подобной формы. Такая твердая композиция обычно будет содержать один или несколько инертных разбавителей или съедобных носителей. Кроме того, могут присутствовать одно или несколько из следующих веществ: связующие вещества, такие как карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза, микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; эксципиенты, такие как крахмал, лактоза или декстрины, разрыхлители, такие как альгиновая кислота, альгинат натрия, Primogel, кукурузный крахмал и т.п.; смазывающие вещества, такие как стеарат магния или Sterotex; глиданты, такие как коллоидный диоксид кремния; подсластители, такие как сахароза или сахарин; ароматизатор, такой как мята перечная, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор; и краситель.

Когда фармацевтическая композиция в соответствии с некоторыми вариантами осуществления находится в форме капсулы, например, желатиновой капсулы, она может содержать, помимо веществ вышеуказанного типа, жидкий носитель, такой как полиэтиленгликоль или масло.

Фармацевтическая композиция в соответствии с некоторыми вариантами осуществления может быть в форме жидкости, например эликсира, сиропа, раствора, эмульсии или суспензии. Жидкость может быть предназначена для перорального введения или для доставки путем инъекции, в качестве двух примеров. Когда она предназначена для перорального введения, предпочтительная композиция содержит в дополнение к соединению структуры (I) один или несколько подсластителей, консервантов, красящих веществ/красителей и усилителей вкуса. В композицию, предназначенную для введения путем инъекции, могут быть включены одно или более из поверхностно-активного вещества, консерванта, смачивающего агента, диспергирующего агента, суспендирующего агента, буфера, стабилизатора и изотонического агента.

Жидкие фармацевтические композиции в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, будь то растворы, суспензии или другая подобная форма, могут включать один или несколько из следующих адъювантов: стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, солевой раствор, предпочтительно физиологический раствор, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия, нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды, которые могут служить растворителем или суспендирующей средой, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза; агенты, действующие как криопротекторы, такие как сахароза или трегалоза. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы из стекла или пластика. Предпочтительным адъювантом является физиологический раствор. Фармацевтическая композиция для инъекций предпочтительно является стерильной.

Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения может быть предназначена для местного введения, и в этом случае носитель может подходящим образом включать основу для получения растворов, эмульсий, мазей или гелей. Основа, например, может включать одно или несколько из следующих веществ: вазелин, ланолин, полиэтиленгликоли, пчелиный воск, минеральное масло, разбавители, такие как вода и спирт, а также эмульгаторы и стабилизаторы. Загустители могут присутствовать в фармацевтической композиции для местного применения. Если композиция предназначена для чрескожного введения, она может включать трансдермальный пластырь или устройство для ионофореза.

Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения может включать различные вещества, которые модифицируют физическую форму твердой или жидкой дозированной формы. Например, композиция может включать вещества, которые образуют покрывающую оболочку вокруг активных ингредиентов. Вещества, которые образуют покрывающую оболочку, обычно инертны и могут быть выбраны, например, из сахара, шеллака и других энтеросолюбильных агентов покрытия. Альтернативно, активные ингредиенты могут быть заключены в желатиновую капсулу.

Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения в твердой или жидкой форме может включать агент, который связывается с соединением по настоящему изобретению и тем самым способствует доставке LNP. Подходящие агенты, которые могут действовать в этом качестве, включают моноклональное или поликлональное антитело или белок.

Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения может состоять из единиц дозирования, которые можно вводить в

виде аэрозоля. Термин аэрозоль используют для обозначения различных систем, от систем коллоидной природы до систем, состоящих из упаковок под давлением. Доставка может осуществляться при помощи сжиженного или сжатого газа или подходящей насосной системы, которая дозирует активные ингредиенты. Аэрозоли LNP согласно вариантам осуществления настоящего изобретения могут доставляться в однофазной, двухфазной или трехфазной системах для доставки активного ингредиента(ингредиентов). Доставка аэрозоля включает в себя необходимый контейнер, активаторы, клапаны, подконтейнеры и т.п., которые вместе могут образовывать набор. Специалист в данной области без излишнего экспериментирования может определить предпочтительные аэрозоли.

Фармацевтические композиции вариантов осуществления настоящего изобретения можно получить по методологии, хорошо известной в области фармацевтики. Например, фармацевтическая композиция, предназначенная для введения путем инъекции, может быть получена путем объединения липидных наночастиц по настоящему изобретению со стерильной дистиллированной водой или другим носителем с образованием раствора. Поверхностно-активное вещество может быть добавлено для облегчения образования гомогенного раствора или суспензии. Поверхностно-активные вещества представляют собой соединения, которые нековалентно взаимодействуют с соединением по настоящему изобретению, способствуя растворению или образованию гомогенной суспензии соединения в водной системе доставки.

Композиции вариантов осуществления настоящего изобретения, или их фармацевтически приемлемые соли, вводят в терапевтически эффективном количестве, которое будет варьироваться в зависимости от множества факторов, включая активность конкретного используемого терапевтического агента; метаболическую стабильность и продолжительность действия терапевтического агента; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и режим питания пациента; способ и время введения; скорость выведения; комбинацию лекарственных средств; тяжесть конкретного расстройства или состояния; и субъекта, проходящего лечение.

Композиции вариантов осуществления настоящего изобретения также можно вводить одновременно с введением, до или после введения одного или нескольких других терапевтических агентов. Такая комбинированная терапия включает введение одной лекарственной формы композиции вариантов осуществления настоящего изобретения и одного или нескольких дополнительных активных агентов, а также введение композиции вариантов осуществления настоящего изобретения и каждого активного агента в виде отдельной лекарственной формы. Например, композицию вариантов осуществления настоящего изобретения и другой активный агент можно вводить пациенту вместе в виде единичной пероральной лекарственной формы, такой как таблетка или капсула, или каждый агент вводят в виде отдельных пероральных лекарственных формах. Когда используются отдельные лекарственные формы, соединения в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения и один или несколько дополнительных активных агентов можно вводить по существу в одно и то же время, т.е. одновременно, или отдельно

с временными интервалами, т.е. последовательно; комбинированная терапия подразумевает все эти схемы.

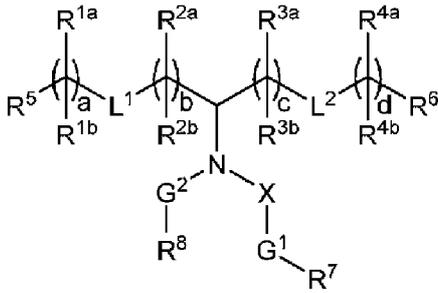
Способы получения вышеуказанных соединений и композиций описаны ниже и/или известны в данной области техники.

Специалистам в данной области должно быть понятно, что в описанном в настоящей заявке способе функциональные группы промежуточных соединений могут нуждаться в защите подходящими защитными группами. Такие функциональные группы включают гидроксильные, амино-, меркапто- и карбоновую кислоту. Подходящие защитные группы для гидроксильных включают триалкилсилил или диарилалкилсилил (например, трет-бутилдиметилсилил, трет-бутилдифенилсилил или триметилсилил), тетрагидропиранил, бензил и т.п. Подходящие защитные группы для амино-, амидино- и гуанидино- групп включают трет-бутоксикарбонил, бензилоксикарбонил и т.п. Подходящие защитные группы для меркапто- групп включают $-C(O)-R''$ (где R'' представляет собой алкил, арил или арилалкил), *n*-метоксибензил, тритил и т.п. Подходящие защитные группы для карбоновой кислоты включают алкиловые, ариловые или арилалкиловые сложные эфиры. Защитные группы можно добавлять или удалять в соответствии со стандартными способами, известными специалистам в данной области, и способами, описанными в настоящей заявке. Использование защитных групп подробно описано в Green, T.W. and P.G.M. Wutz, *Protective Groups in Organic Synthesis* (1999), 3rd Ed., Wiley. Как должно быть понятно специалистам в данной области техники, защитная группа может также представлять собой полимерную смолу, такую как смола Ванга, смола Ринка или 2-хлортритилхлоридная смола.

Специалистам в данной области также будет понятно, что, хотя такие защищенные производные соединений по настоящему изобретению могут не обладать фармакологической активностью как таковые, их можно вводить млекопитающим, после чего они метаболизируются в организме с образованием соединений по настоящему изобретению, которые фармакологически активны. Следовательно, такие производные могут быть описаны как “пролекарства”. Все пролекарства соединений по настоящему изобретению включены в объем настоящего изобретения.

Кроме того, соединения вариантов осуществления настоящего изобретения, которые существуют в форме свободного основания или кислоты, могут быть преобразованы в их фармацевтически приемлемые соли путем обработки соответствующим неорганическим или органическим основанием или кислотой способами, известными специалистам в данной области. Соли соединений вариантов осуществления настоящего изобретения можно преобразовать в форму их свободного основания или кислоты стандартными способами.

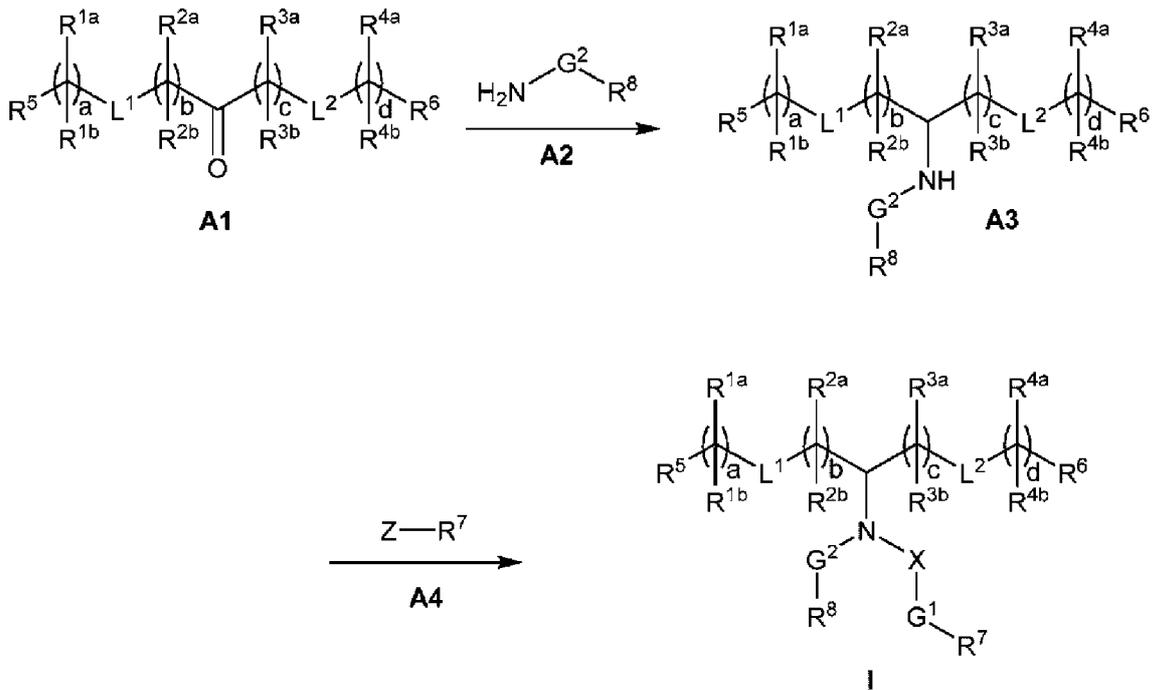
Следующая Общая схема реакций 1 иллюстрирует типичные способы получения соединений по настоящему изобретению, т.е. соединений структуры (I):



(I)

или их фармацевтически приемлемых солей, таутомеров или стереоизомеров, где a, b, c, d, G¹, G², L¹, L², R^{1a}, R^{1b}, R^{2a}, R^{2b}, R^{3a}, R^{3b}, R^{4a}, R^{4b}, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ и X имеют значения, указанные в настоящей заявке. Предполагается, что специалист в данной области может получить эти соединения аналогичными способами, или комбинируя другие способы, известные специалистам в данной области. Также предполагается, что специалист в данной области техники сможет получить аналогичным образом, как описано ниже, другие соединения структуры (I), конкретно не проиллюстрированные ниже, путем использования соответствующих исходных компонентов и модификации параметров синтеза по мере необходимости. Как правило, исходные компоненты можно получить из таких источников, как Sigma Aldrich, Lancaster Synthesis, Inc., Maybridge, Matrix Scientific, TCI и Fluorochem USA и т.д., или синтезировать в соответствии с источниками, известными специалистам в данной области (см., например, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 5th edition (Wiley, December 2000)), или получить, как описано в данном раскрытии.

ОБЩАЯ СХЕМА РЕАКЦИЙ 1



Общая схема реакций I представляет иллюстративный способ получения

соединения структуры (I) (т.е. A5). a, b, c, d, G², L¹, L², R^{1a}, R^{1b}, R^{2a}, R^{2b}, R^{3a}, R^{3b}, R^{4a}, R^{4b}, R⁵, R⁶, R⁸, R⁹ и R¹⁰ в Общей схеме реакций 1 имеют значения, указанные в настоящей заявке, и Z представляет собой активированный аналог G¹, достаточный для образования связи с NH-группой A3 (например, алкен или алкилен, приводящий к альдегиду, галогенангидриду, акрилату и т.д.). Промежуточные соединения и реагенты (например, A1 и A2), необходимые для получения соединений в соответствии с Общей схемой реакции I, можно приобрести или получить в соответствии с приведенными ниже примерами или способами, известными специалистам в данной области.

Следует отметить, что специалистам в данной области доступны различные альтернативные способы получения соединений структуры (I). Например, другие соединения структуры (I) могут быть получены аналогичными способами с использованием соответствующего исходного вещества. Использование защитных групп по мере необходимости и другие модификации вышеприведенной общей схемы реакции должны очевидны для специалистов в данной области.

Следующие примеры приведены для иллюстрации, а не для ограничения.

ПРИМЕР 1

Анализ мРНК люциферазы *in vivo* с использованием композиции липидных наночастиц

Липидные наночастицы получали и испытывали в соответствии с общими процедурами, описанными в публикациях PCT WO 2015/199952 и WO 2017/004143, полное раскрытие которых включено в настоящую заявку посредством ссылки. Вкратце, катионный липид, DSPC, холестерин и PEG-липид солибилизировали в этаноле при молярном соотношении около 50:10:38,5:1,5 или около 47,5:10:40,8:1,7. Липидные наночастицы (LNP) получали при массовом отношении общего количества липидов к мРНК примерно от 10:1 до 30:1. мРНК разводили до 0,2 мг/мл в 10-50 мМ цитратном или ацетатном буфере, pH 4. Шприцевые насосы использовали для смешивания этанольного раствора липидов с водным раствором мРНК в соотношении примерно от 1:5 до 1:3 (об/об) при общей скорости потока выше 15 мл/мин. Затем этанол удаляли, а внешний буфер заменяли на PBS путем диализа. В завершение, липидные наночастицы фильтровали через стерильный фильтр с размером пор 0,2 мкм. Размер частиц липидных наночастиц составлял приблизительно 55-95 нм в диаметре, а в некоторых случаях приблизительно 70-90 нм в диаметре, как определено методом квазиупругого светорассеяния с использованием Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK).

Исследования осуществляли на 6-8-недельных самках мышей C57BL/6 (Charles River) или 8-10-недельных мышках CD-1 (Harlan) (Charles River) в соответствии с рекомендациями, установленными Институциональным комитетом по содержанию животных (ACC) и Канадским Советом по уходу за животными (CCAC). Различные дозы мРНК-липидных наночастиц системно вводили путем инъекции в хвостовую вену и животных подвергали эвтаназии в определенный момент времени (например, через 4 часа) после введения. Печень и селезенку собирали в предварительно взвешенные пробирки,

определяли массу, немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до обработки для анализа.

Что касается печени, приблизительно 50 мг иссекали для анализов и помещали в 2-мл пробирки FastPrep (MP Biomedicals, Solon OH). В каждую пробирку добавляли керамическую сферу размером $\frac{1}{4}$ " (MP Biomedicals) и к ткани печени добавляли 500 мкл Glo лизисного буфера (GLB) (Promega, Madison WI), уравновешенного до комнатной температуры. Ткани печени гомогенизировали на приборе FastPrep24 (MP Biomedicals) при скорости $2 \times 6,0$ м/сек в течение 15 секунд. Гомогенат инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут перед разведением 1:4 в GLB и оценивали с использованием системы для анализа люциферазы SteadyGlo (Promega). В частности, осуществляли взаимодействие 50 мкл разбавленного гомогената ткани с 50 мкл субстрата SteadyGlo, встряхивали в течение 10 секунд с последующей 5-минутной инкубацией, а затем выполняли количественный анализ с использованием люминометра CentroXS³ LB 960 (Berthold Technologies, Germany). Количество анализируемого белка определяли с использованием набора для анализа белка BCA (Pierce, Rockford IL). Относительные единицы люминесценции (RLU) затем нормализовали к общему количеству анализируемого белка в мкг. Для преобразования RLU в нг люциферазы строили стандартную кривую с использованием рекомбинантной люциферазы QuantiLum (Promega).

FLuc мРНК (L-6107 или L-7202) от Trilink Biotechnologies будет экспрессировать белок люциферазу, первоначально выделенный из светлячка *photinus pyralis*. FLuc обычно используют в культуре клеток млекопитающих для измерения как экспрессии генов, так и жизнеспособности клеток. Он испускает биолюминесценцию в присутствии субстрата - люциферина. Эта кэпированная и полиаденилированная мРНК была полностью замещена, что касается нуклеозидов уридина и/или цитидина.

ПРИМЕР 2

Определение pK_a сформулированных липидов

Как описано в другом месте настоящей заявки, pK_a сформулированных катионных липидов коррелирует с эффективностью LNP для доставки нуклеиновых кислот (см. Jayaraman et al, *Angewandte Chemie*, International Edition (2012), 51(34), 8529-8533; Semple et al, *Nature Biotechnology* 28, 172-176 (2010)). Предпочтительный диапазон pK_a составляет от ~ 5 до ~ 7 . pK_a каждого катионного липида определяли в липидных наночастицах с использованием анализа, основанного на флуоресценции 2-(п-толуидино)-6-нафталинсульфоновой кислоты (TNS). Липидные наночастицы, включающие катионный липид/DSPC/холестерин/PEG-липид (50/10/38,5/1,5 моль%) в PBS при концентрации 0,4 мМ общего количества липидов, получали с использованием автоматического процесса, как описано в Примере 1. TNS получали в виде 100 мкМ исходного раствора в дистиллированной воде. Везикулы разбавляли до 24 мкМ липида в 2 мл забуференных растворов, содержащих 10 мМ HEPES, 10 мМ MES, 10 мМ ацетата аммония, 130 мМ NaCl, где pH составлял от 2,5 до 11. Добавляли аликвоту TNS раствора, чтобы получить конечную

концентрацию 1 мкМ, и после вихревого перемешивания измеряли интенсивность флуоресценции при комнатной температуре на люминесцентном спектрофотометре SLM Aminco Series 2 с использованием длин волн возбуждения и эмиссии 321 нм и 445 нм. К данным флуоресценции применяли анализ сигмоидальной кривой наилучшего соответствия, и pK_a измеряли как pH , дающий полумаксимальную интенсивность флуоресценции.

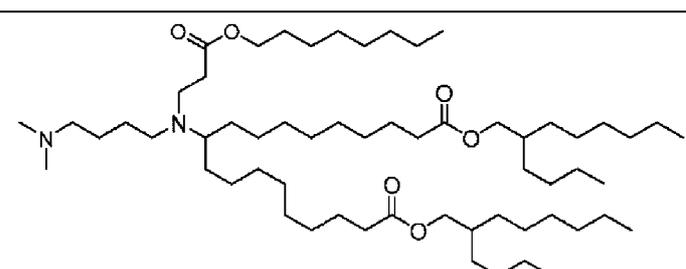
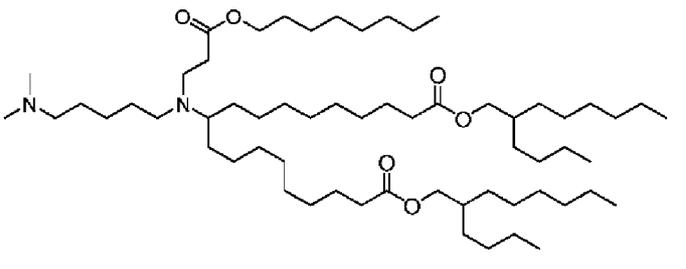
ПРИМЕР 3

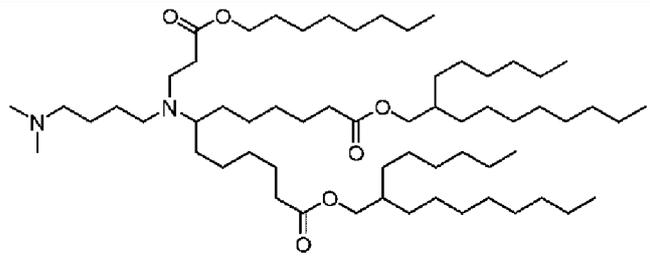
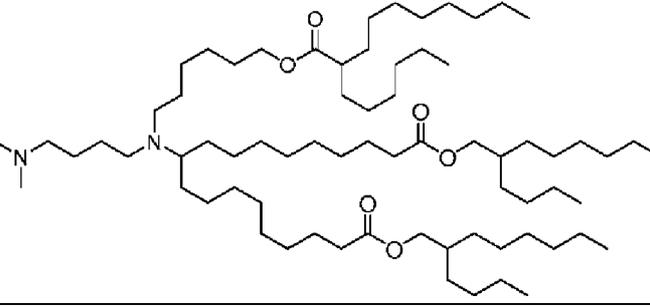
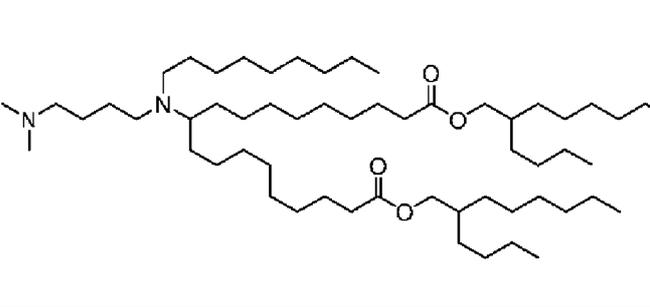
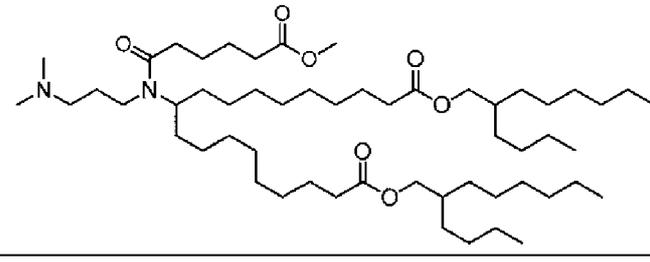
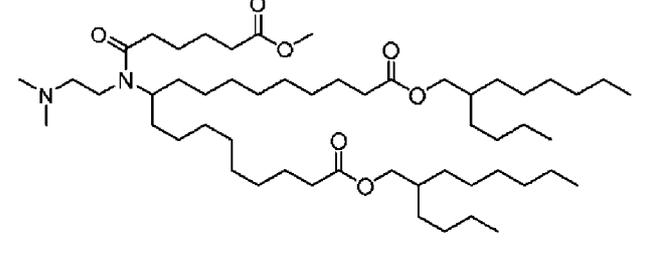
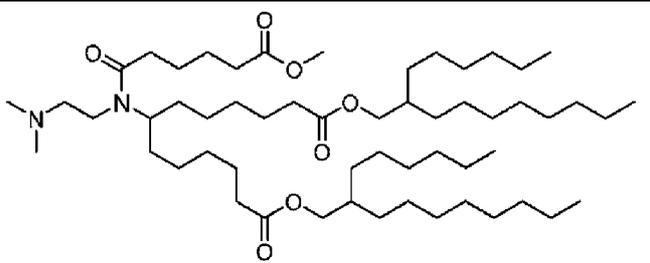
Определение эффективности композиций липидных наночастиц, содержащих различные катионные липиды, с использованием модели экспрессии *in vivo* мРНК люциферазы на грызунах

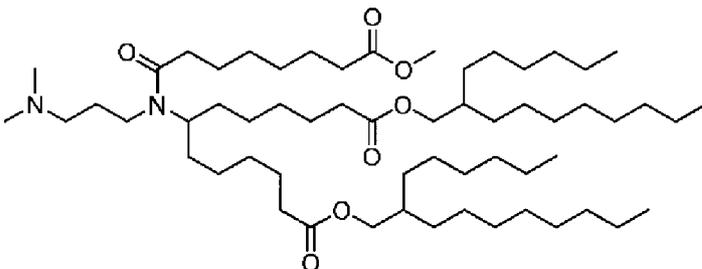
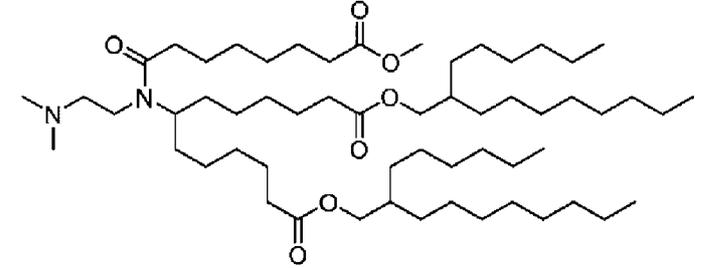
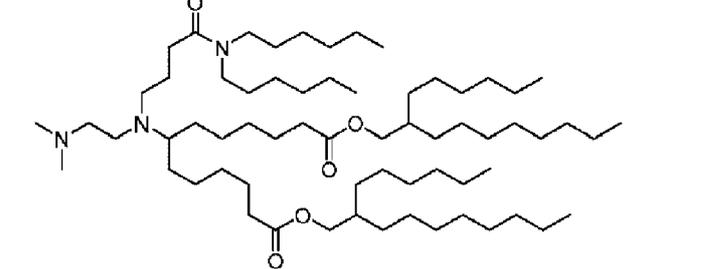
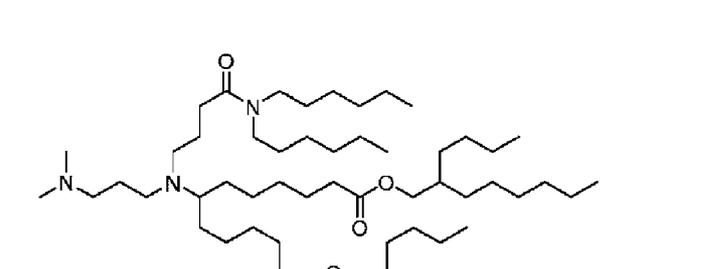
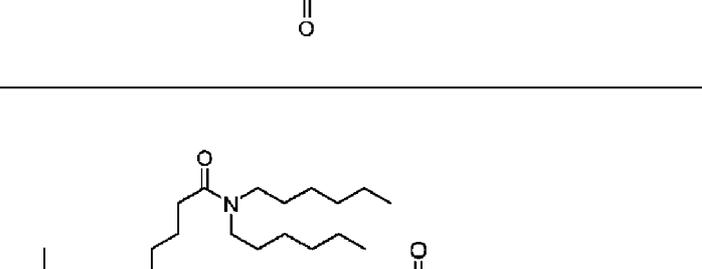
Репрезентативные соединения по настоящему изобретению, показанные в Таблице 2, формулировали в композицию с использованием следующего молярного соотношения: 50% катионного липида/10% дистеароилфосфатидилхолина (DSPC)/38,5% Холестерина/1,5% PEG липида 2-[2-(ω -метокси(полиэтиленгликоль₂₀₀₀)этокси]-N, N-дитетрадецилацетамид) или 47,5% катионного липида/10% DSPC/40,7% Холестерина/1,8% PEG липида. Относительную активность определяли путем измерения экспрессии люциферазы в печени через 4 часа после введения путем инъекции в хвостовую вену, как описано в Примере 1. Активность, измеренную через 4 часа после введения, как описано в Примере 1, сравнивали при дозе 1,0 или 0,5 мг мРНК/кг и выражали как нг люциферазы/г печени. Номера соединений в Таблице 2 относятся к номерам соединений в Таблице 1.

Таблица 2

Новые катионные липиды и соответственная активность

| Соед. № | pK_a | Люцифераза в печени @ 1,0 мг/кг (нг люциферазы/г печени) | Структура |
|---------|--------|---|--|
| I-1 | 6,11 | 24031 \pm 4777 |  |
| I-2 | 6,67 | 122 \pm 18* * определено при 0,3 мг/кг 682 \pm 147** ** определено при 1,0 мг/кг |  |

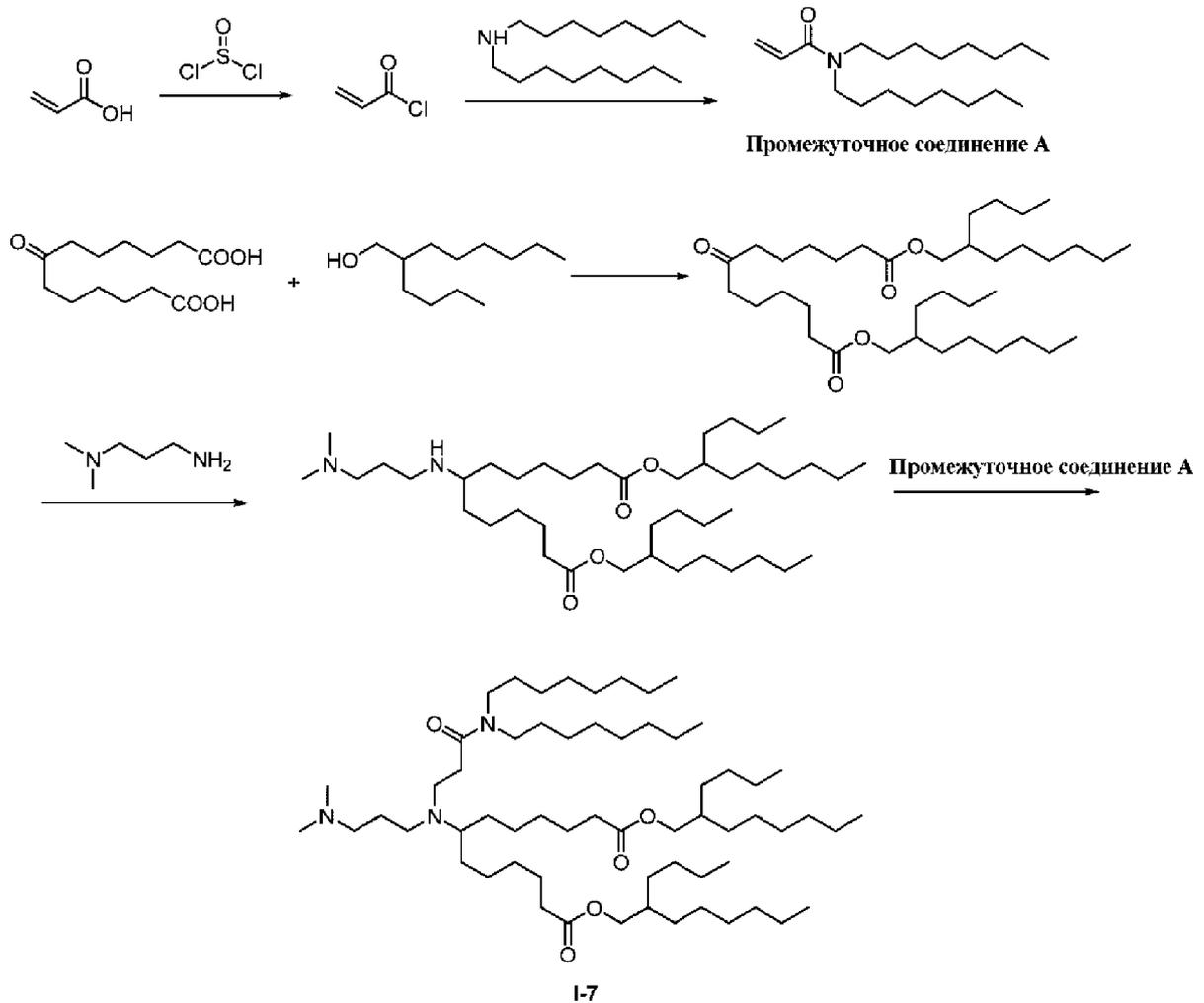
| | | | |
|------|------|---|--|
| I-4 | 6,17 | 46932 ± 17399 |  |
| I-5 | 6,08 | 11720 ± 2439 |  |
| I-6 | 6,22 | 4093 ± 1036* * определено при 0,3 мг/кг 11290 ± 6455** ** определено при 1,0 мг/кг |  |
| I-14 | 6,80 | 669±575 * * определено при 0,5 мг/кг |  |
| I-15 | 5,96 | 21357 ± 15325 |  |
| I-16 | 6,25 | 66763 ± 15823 |  |

| | | | |
|------|------|---|--|
| I-17 | 6,78 | 26691 ± 13186 |  |
| I-18 | 6,02 | 40650 ± 11479 |  |
| I-19 | 5,95 | 32706 ± 4621 |  |
| I-20 | 6,48 | 4140 ± 1117* * определено при 0,3 мг/кг 17095 ± 8181** ** определено при 1,0 мг/кг |  |
| I-21 | 6,40 | 7723 ± 1714* * определено при 0,3 мг/кг 20223 ± 5982** ** определено при 1,0 мг/кг |  |

| | | | |
|------|------|---|--|
| I-22 | 6,28 | $5291 \pm 1348^*$ * определено при 0,3 мг/кг $17654 \pm 8167^{**}$ ** определено при 1,0 мг/кг | |
| I-23 | 6,33 | $553 \pm 153^*$ * определено при 0,5 мг/кг | |

ПРИМЕР 4

Синтез бис(2-бутилоктил) 7-((3-(диметиламино)пропил)(3-(диоктиламино)-3-оксопропил)амино)тридекандиоата (Соединение I-7)



Синтез акрилоилхлорида

Акриловую кислоту (1,20 г, 16,65 ммоль) растворяли в 20 мл безводного

дихлорметана. Добавляли по каплям тионилхлорид (1,98 г, 16,65 ммоль) при перемешивании в атмосфере азота и реакционную смесь нагревали до температуры кипения с обратным холодильником в течение 4 часов. После завершения реакции неочищенный продукт концентрировали с получением бледно-желтой жидкости, которую использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Синтез N, N-диоктилакриламида (Промежуточное соединение A)

Акрилоилхлорид (1,12 г, 12,37 ммоль) добавляли к охлажденному раствору (0°C) диоктиламина в дихлорметане с триэтиламино (1 экв.) в качестве основания. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 часа и еще 1 час при комнатной температуре. Реакционную смесь фильтровали и полученный раствор промывали хлористоводородной кислотой (1N HCl), затем насыщенным раствором NaHCO₃ и насыщенным соевым раствором. Растворитель выпаривали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта (бесцветная жидкость), который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Синтез бис(2-бутилоктил) 7-оксотридекандиоата

К раствору 2-бутилоктан-1-ола (3,85 г, 20,66 ммоль), 7- оксотридекандиовой кислоты (1,34 г, 5,17 ммоль) и 4-диметиламинопиридина (DMAP) (1,9 г, 15,55 ммоль) в безводном DCM добавляли DCC (4,27 г, 20,69 ммоль). Полученной смеси давали возможность перемешиваться в течение ночи при комнатной температуре. Твердое вещество (DCU) затем фильтровали и промывали DCM. Фильтрат концентрировали. Остаток (масло/твердое вещество) очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-5% этилацетата в гексане). Целевой продукт получали в виде бесцветного масла (2,55 г, 42,86 ммоль, 83%).

Синтез бис(2-бутилоктил) 7-((3-(диметиламино)пропил)амино)тридекандиоата

Раствор 3-(диметиламино)-1-пропиламина (0,09 г, 0,88 ммоль) и бис(2-бутилоктил) 7-оксотридекандиоата (0,37 г, 0,63 ммоль) в DCE обрабатывали триацетоксиборогидридом натрия (0,20 г, 0,94 ммоль) и AcOH (55 мкл, 0,98 ммоль) в течение ночи. Раствор промывали разбавленным водным раствором гидроксида натрия (1 N NaOH). Органическую фазу промывали насыщенным соевым раствором, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и удаляли растворитель. Остаток пропускали через небольшой слой силикагеля, промывали смесью DCM/MeOH/Et₃N (85:15:1). Фильтрат концентрировали с получением целевого продукта в виде слегка желтоватого масла (240 мг, 0,35 ммоль, 56%).

Синтез I-7

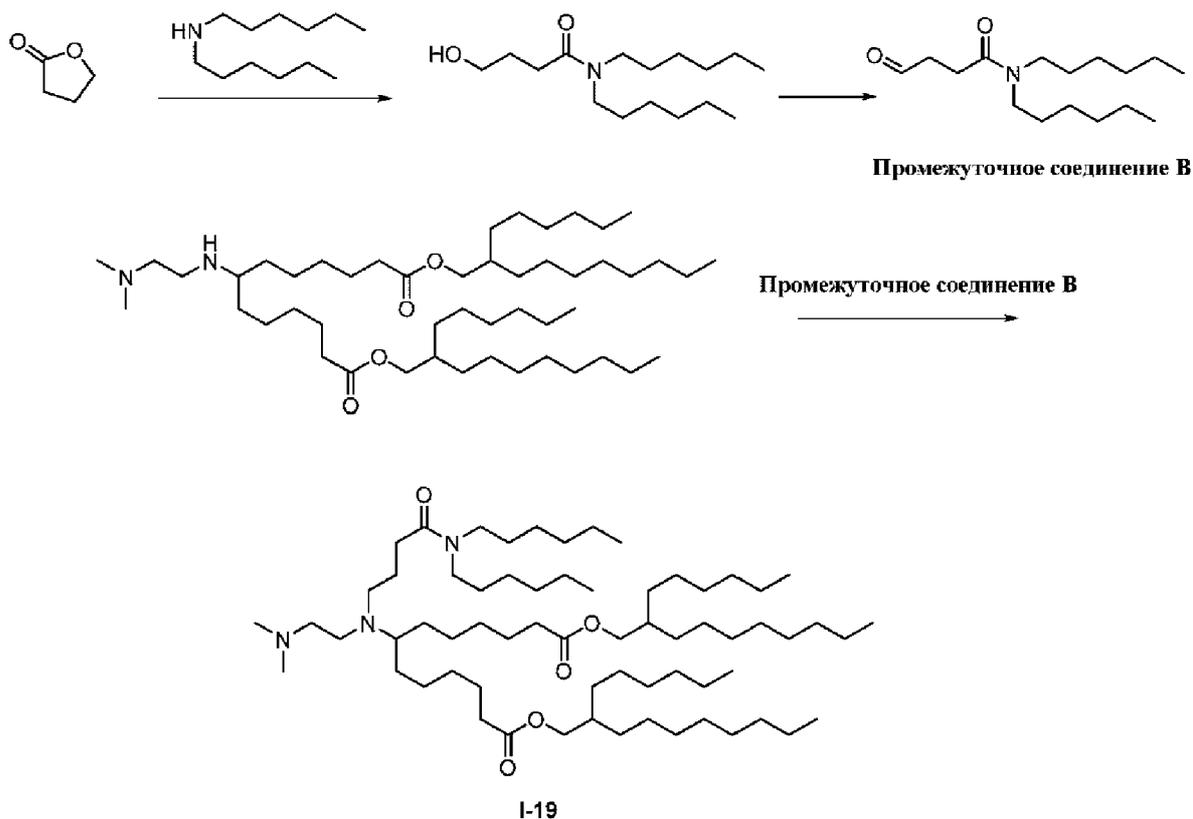
Раствор бис(2-бутилоктил)7-((3-(диметиламино)пропил)амино)тридекандиоата (210 мг, 0,30 ммоль) и N, N-диоктилакриламида (1,5 экв. 136 мг, 0,46 ммоль) в EtOH (10 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 7 дней. По окончании реакции растворитель удаляли. Остаток растворяли в смеси гексанов и EtOAc (19:1) и промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия и насыщенным соевым раствором. Экстракт сушили над сульфатом натрия. Высушенный экстракт фильтровали через слой силикагеля. Слой промывали

смесью гексан/этилацетат/триэтиламин (80:20:1). Промывку концентрировали, получая неочищенный желаемый продукт.

Неочищенный продукт затем очищали колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (MeOH в хлороформе, от 0 до 5%). Это дало желаемый продукт в виде бесцветного масла (30 мг, 0,03 ммоль, 10%). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ: 3,96 (д, 5,8 Гц, 4H), 3,30-3,16 (м, 4H), 2,74 (т, 7,2 Гц, 2H), 2,65-2,24 (м, 17H), 1,80-1,44 (м, 12H), 1,43-1,15 (64H), 0,93-0,82 (м, 18H).

ПРИМЕР 5

Синтез бис(2-гексилдецил) 7-((4-(дигексиламино)-4-оксобутил)(2-(диметиламино)этил)амино)тридекандиоат (Соединение I-19)



Синтез N, N-дигексил-4-оксобутанамида (Промежуточное соединение В)

Бутиролактон (2,51 г, 29,15 ммоль) и дигексиламин (5,40 г, 29,13 ммоль) нагревали в течение 4 дней в колбе под давлением при 61°C. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0% - 5% MeOH в DCM) с получением N, N-дигексил-4-гидроксибутанамида в виде масла слегка желтого цвета (6,30 г, 79%).

N, N-дигексил-4-гидроксибутанамида (3,00 г, 11,05 ммоль) растворяли в DCM и обрабатывали хлорхроматом пиридиния (2,38 г, 11,05 ммоль) в течение двух часов. Добавляли диэтиловый эфир и супернатант фильтровали через слой силикагеля. Растворитель удаляли из фильтрата и полученное масло растворяли в гексане. Суспензию фильтровали через слой силикагеля и удаляли растворитель. Неочищенный продукт (бесцветная жидкость) использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Синтез I-19

Раствор N, N-дигексил-4-оксобутанамида (0,56 г, 1,97 ммоль) и бис(2-гексилдецил) 7-((2-(диметиламино)этил)амино)тридекандиоата (0,44 г, 0,56 ммоль, получали согласно процедурам Примера 4) в 1,2-дихлорэтане (10 мл) перемешивали в течение 15 минут, затем одной порцией добавляли триацетоксиборогидрид натрия (0,41 г, 1,97 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре еще в течение 16 часов. Смесь концентрировали. Остаток растворяли в смеси гексана и этилацетата (96:4) и промывали насыщенным водным раствором NaHCO_3 и насыщенным соевым раствором. Органический слой отделяли, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением бесцветного масла. Неочищенный продукт очищали колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (MeOH в хлороформе, 0-5%), получая желаемый продукт в виде бесцветного масла (260 мг, 0,25 ммоль, 45%). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ : 3,96 (д, 5,8 Гц, 4H), 3,28 (т-подобный, 7,7 Гц, 2H), 3,20 (т-подобный, 7,7 Гц, 2H), 2,56-2,47 (м, 2H), 2,44 (т, 6,8 Гц, 2H), 2,39-2,20 (м, 15H), 1,74-1,45 (м, 12H), 1,42-1,15 (72H), 0,93-0,84 (м, 18H).

ПРИМЕР 6

Синтез бис(2-бутилоктил) 10-((4-(дигексиламино)-4-оксобутил)(3-(диметиламино)пропил)амино)нонадекандиоата (Соединение I-21)

Соединение I-21 получали в соответствии с общими процедурами Примера 5 с получением 0,05 г бесцветного масла, 0,03 ммоль, 32%. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ : 3,97 (д, 5,8 Гц, 4H), 3,28 (т-подобный, 7,6 Гц, 2H), 3,20 (т-подобный, 7,6 Гц, 2H), 2,43-2,23 (м, 13H), 2,20 (с, 6H), 1,75-1,45 (м, 14H), 1,40-1,12 (м, 68H), 0,93-0,84 (м, 18H).

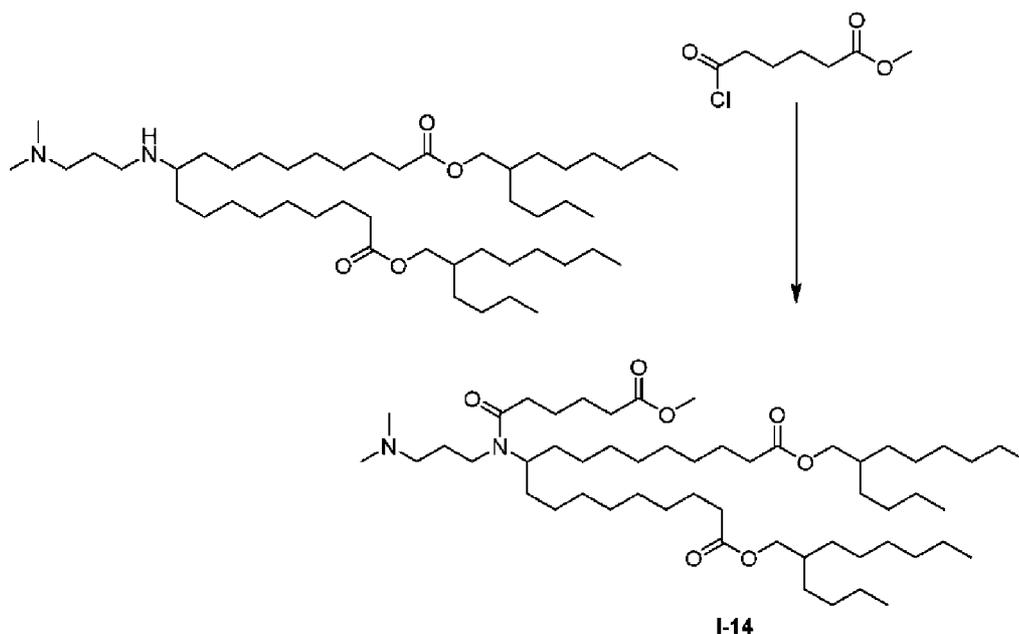
ПРИМЕР 7

Синтез бис(2-бутилоктил) 7-((4-(дигексиламино)-4-оксобутил)(3-(диметиламино)пропил)амино)тридекандиоата (Соединение I-20)

Соединение I-20 получали в соответствии с общими процедурами Примера 5 с получением 0,06 г бесцветного масла, 0,06 ммоль, 41%. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ : 3,96 (д, 5,8 Гц, 4H), 3,27 (т-подобный, 7,6 Гц, 2H), 3,19 (т-подобный, 7,6 Гц, 2H), 2,62-2,17 (м, 19H), 1,79-1,43 (м, 14H), 1,42-1,10 (м, 56H), 0,95-0,81 (м, 18H).

ПРИМЕР 8

Синтез бис(2-бутилоктил) 10-(N-(3-(диметиламино)пропил)-6-метокси-6-оксогексанамидо)нонадекандиоата (Соединение I-14)



Адилоилхлорид (0,12 г, 0,68 ммоль) в безводном бензоле (5 мл) добавляли при помощи шприца к раствору бис(2-бутилоктил) 10-((3-(диметиламино)пропил)амино)нонадекандиоата (0,26 г, 0,34 ммоль, полученный в соответствии с Примером 4), триэтиламина (0,3 мл, 2,5 ммоль) и DMAP (5 мг) в бензоле (10 мл) при комнатной температуре в течение 5 мин. Смесь перемешивали в течение 2 часов, а затем добавляли метанол (0,5 мл) для удаления избытка ацилхлорида. Полученную смесь перемешивали еще в течение часа, а затем фильтровали через слой силикагеля, промывали смесью гексан/EtOAc/Et₃N (70:30:1) и концентрировали. Остаток пропускали через колонку с силикагелем (градиент 0-4% MeOH в DCM), получая соединение **I-14** в виде бесцветного масла (0,28 г, 0,30 ммоль, 89%). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ: 4,52-4,29 (шир., предположительно 0,3H, из-за медленной изомеризации вокруг амидной связи), 3,96 (д, 5,8 Гц, 4H), 3,65 (с, 3H), 3,59 (квинтет-подобный, 7,0 Гц, 0,7H), 3,14-3,05 (м, 2H), 2,37-2,24 (м, 10H), 2,23-2,18 (м, 6H), 1,73-1,54 (м, 12H), 1,48-1,37 (м, 4H), 1,34-1,14 (м, 52H), 0,93-0,83 (м, 12H).

ПРИМЕР 9

Синтез бис(2-бутилоктил) 10-(N-(2-(диметиламино)этил)-6-метокси-6-оксогексанамидо)нонадекандиоата (Соединение I-15)

Соединение I-15 получали в соответствии с общими процедурами Примера 8 с получением 0,18 г бесцветного масла, 0,20 ммоль, 85%. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ: 4,53-4,30 (шир., 0,3H, из-за медленной изомеризации вокруг амидной связи), 3,96 (д, 5,8 Гц, 4H), 3,65 (с, 3H), 3,58 (квинтет-подобный, 7 Гц, 0,7H), 3,27-3,15 (м, 2H), 2,46-2,22 (м, 16H), 1,75-1,54 (м, 10H), 1,50-1,36 (м, 4H), 1,35-1,09 (м, 52H), 0,94-0,82 (м, 12H).

ПРИМЕР 10

Синтез бис(2-гексилдецил) 7-(N-(2-(диметиламино)этил)-6-метокси-6-оксогексанамидо)тридекандиоата (Соединение I-16)

Соединение I-16 получали в соответствии с общими процедурами Примера 8 с

получением 0,27 г бесцветного масла, 0,29 ммоль, 81%. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ : 4,53-4,30 (шир., 0,3H, из-за медленной изомеризации вокруг амидной связи), 3,99-3,92 (м, 4H), 3,66 (с, 3H), 3,59 (квинтет-подобный, 7,0 Гц, 0,7H), 3,28-3,14 (м, 2H), 2,46-2,20 (м, 16H), 1,75-1,53 (м, 10H), 1,51-1,36 (м, 4H), 1,35-1,09 (м, 56H), 0,94-0,81 (м, 12H).

ПРИМЕР 11

Синтез бис(2-гексилдецил) 7-(N-(3-(диметиламино)пропил)-8-метокси-8-оксооктанамидо)тридекандиоата (Соединение I-17)

Соединение I-17 получали в соответствии с общими процедурами Примера 8 с получением 0,08 г бесцветного масла, 0,08 ммоль, 75%. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ : 4,53-4,30 (шир., 0,3H, из-за медленной изомеризации вокруг амидной связи), 3,99-3,91 (м, 4H), 3,66 (с, 3H), 3,61 (квинтет-подобный, 7,0 Гц, 0,7H), 3,15-3,06 (м, 2H), 2,34-2,23 (м, 10H), 2,22 (с, 6H), 1,75-1,53 (м, 10H), 1,51-1,38 (м, 4H), 1,37-1,15 (м, 62H), 0,93-0,82 (м, 12H).

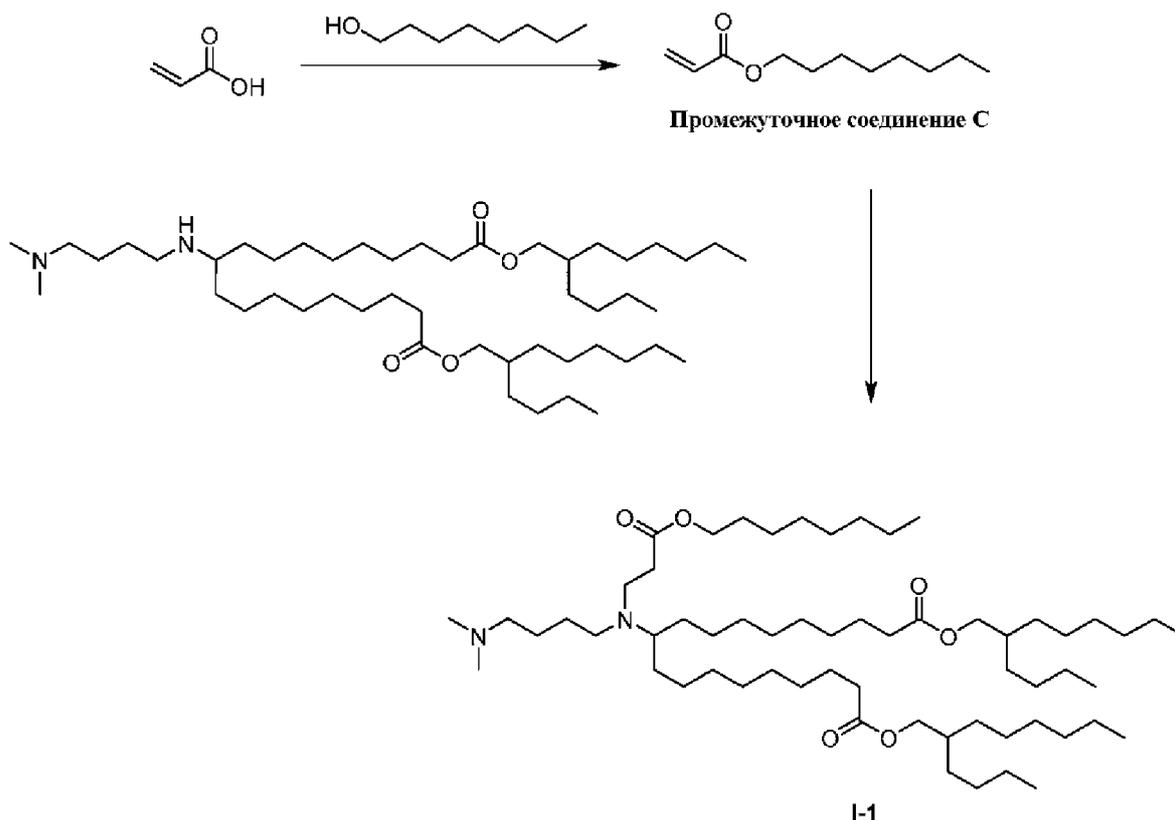
ПРИМЕР 12

Синтез бис(2-гексилдецил) 7-(N-(2-(диметиламино)этил)-8-метокси-8-оксооктанамидо)тридекандиоата (Соединение I-18)

Соединение I-18 получали в соответствии с общими процедурами Примера 8 с получением 0,15 г бесцветного масла, 0,16 ммоль, 79%. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ : 4,53-4,30 (шир., 0,3H, из-за медленной изомеризации вокруг амидной связи), 3,99-3,92 (м, 4H), 3,66 (с, 3H), 3,61 (квинтет-подобный, 7,0 Гц, 0,7H), 3,26-3,14 (м, 2H), 2,47-2,35 (м, 2H), 2,34-2,20 (м, 14H), 1,73-1,53 (м, 8H), 1,51-1,39 (м, 4H), 1,38-1,14 (м, 62H), 0,93-0,82 (м, 12H).

ПРИМЕР 13

Синтез бис(2-бутилоктил) 10-(N-(3-(диметиламино)пропил)-6-метокси-6-оксогексанамидо)нонадекандиоата (Соединение I-1)



Синтез промежуточного соединения С

К раствору акриловой кислоты (1,1 экв., 8,25 ммоль, 594 мг), октанола (1 экв., 975 мг, 7,5 ммоль) и DMAP (0,4 экв., 3 ммоль, 366 мг) в DCM (15 мл) добавляли DCC (1,4 экв., 10,5 ммоль, 2,16 г). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат концентрировали. Остаток обрабатывали гексаном (50 мл) и загружали в колонку с силикагелем. Колонку промывали гексаном (40 мл). Фракции объединяли, повторно загружали в колонку и элюировали смесью гексана и этилацетата (приблизительно 99:1 или 98:2, 200 мл). Получали бесцветное масло (986 мг, 71%).

Синтез соединения I-1

Раствор бис(2-бутилоктил) 10-((4-(диметиламино)бутил)амино)нонадекандиоата (1 экв., 220 мг, 0,28 ммоль, получен в соответствии с описанными выше общими способами), и промежуточного соединения С (2,75 экв. 0,77 ммоль, 140 мг) в EtOH (10 мл) в герметично закрытой колбе под давлением перемешивали при комнатной температуре в течение 4 дней в атмосфере Ar. Реакционную смесь концентрировали. Остаток дважды очищали колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (гексан-EtOAc-Et₃N, от 95:5:0 до 80:20:1, и MeOH в хлороформе, 0-5%). Целевой продукт получали в виде бесцветного масла (68 мг, 0,07 ммоль, 25%) ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ: 4,03 (т, 6,9 Гц, 2H), 3,97 (д, 5,8 Гц, 4H), 2,69 (т, 7,2 Гц, 2H), 2,38-2,33 (м, 4H), 2,33-2,26 (м, 1H), 2,29 (т, 7,5 Гц, 4H), 2,26-2,22 (м, 2H), 2,21 (с, 6H), 1,61 (квинтет-подобный, 7,0 Гц, 8H), 1,48-1,08 (70H), 0,92-0,86 (м, 15H).

ПРИМЕР 14

Синтез бис(2-бутилоктил) 10-((5-(диметиламино)пентил)(3-(октилокси)-3-оксопропил)амино)нонадекандиоата (Соединение I-2)

Соединение I-2 получали в соответствии с общими процедурами Примера 13 с получением 0,05 г бесцветного масла, 0,05 ммоль, 10%. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ : 4,03 (т, 6,8 Гц, 2H), 3,96 (д, 5,8 Гц, 4H), 2,69 (т, 7,2 Гц, 2H), 2,38-2,21 (м, 17H), 1,61 (квинтет-подобный, 7,0 Гц, 8H), 1,51-1,10 (м, 72H), 0,93-0,84 (м, 15H).

ПРИМЕР 15

Синтез бис(2-бутилоктил) 7-((4-(диметиламино)бутил)(3-(октилокси)-3-оксопропил)амино)тридекандиоата (Соединение I-3)

Соединение I-3 получали в соответствии с общими процедурами Примера 13 с получением 0,01 г бесцветного масла, 0,01 ммоль, 11%. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ : 4,03 (т, 6,9 Гц, 2H), 3,96 (д, 5,6 Гц, 4H), 2,69 (т, 7,1 Гц, 2H), 2,38-2,20 (м, 17H), 1,69-1,56 (м, 10H), 1,48-1,09 (м, 56H), 0,92-0,84 (м, 15H).

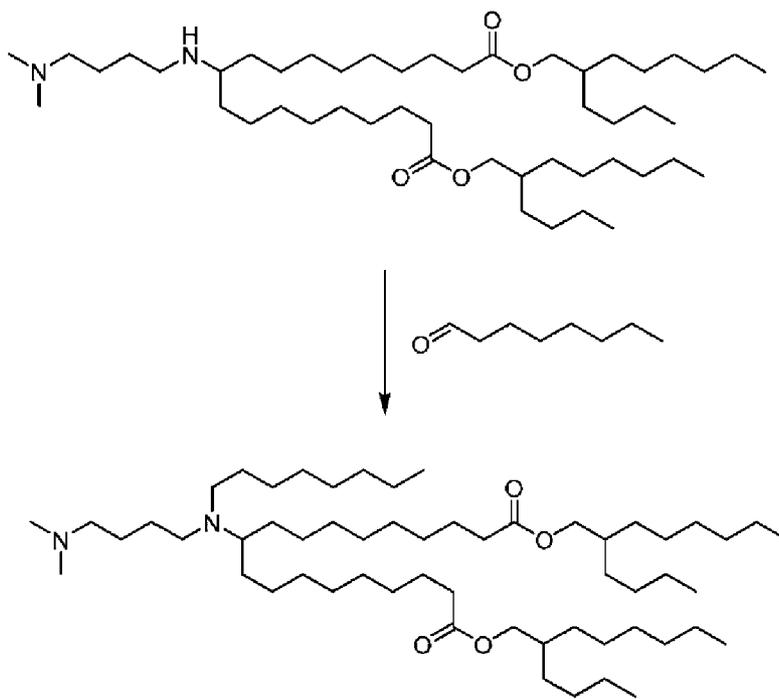
ПРИМЕР 16

Синтез бис(2-гексилдецил) 7-((4-(диметиламино)бутил)(3-(октилокси)-3-оксопропил)амино)тридекандиоата (Соединение I-4)

Соединение I-4 получали в соответствии с общими процедурами Примера 13 с получением 0,05 г бесцветного масла, 0,05 ммоль, 13%. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ : 4,03 (т, 6,8 Гц, 2H), 3,96 (д, 5,8 Гц, 4H), 2,69 (т, 7,1 Гц, 2H), 2,39-2,21 (м, 17H), 1,66-1,09 (м, 82H), 0,88 (т, 7,0 Гц, 15H).

ПРИМЕР 17

Синтез бис(2-бутилоктил) 10-((4-(диметиламино)бутил)(октил)амино)нонадекандиоата (Соединение I-23)



I-23

Синтез соединения I-23

Раствор октанала (3,5 экв., 0,90 ммоль, 115 мг, 0,141 мл) и бис(2-бутилоктил) 10-((4-(диметиламино)бутил)амино)нонадекандиоата (200 мг, 0,26 ммоль, полученный в соответствии с общими процедурами, описанными выше) в 1,2-дихлорэтаноле (5 мл) перемешивали в течение 15 минут, затем одной порцией добавляли триацетоксиборогидрид натрия (3,5 экв., 0,9 ммоль, 190 мг). Перемешивание продолжали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакционную смесь концентрировали. Остаток дважды очищали колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (гексан-EtOAc-Et₃N, от 95:5:0 до 80:20:1, и MeOH в хлороформе, 0-5%). Желаемый продукт получали в виде бесцветного масла (203 мг, 0,23 ммоль, 88%). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ: 3,97 (д, 5,8 Гц, 4H), 2,40-2,18 (м, 17H), 1,69-1,56 (м, 6H), 1,52-1,10 (м, 72H), 0,92-0,86 (м, 15H).

ПРИМЕР 18

Синтез бис(2-этилгексил) 10-((4-(диметиламино)бутил)(6-((2-гексилдеканоил)окси)гексил)амино)нонадекандиоата (Соединение I-22)

Соединение I-22 получали в соответствии с общими процедурами Примера 17 с получением 0,19 г бесцветного масла, 0,19 ммоль, 80%. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ: 4,06 (т, 6,7 Гц, 2H), 3,97 (д, 5,6 Гц, 4H), 2,39-2,26 (м, 11H), 2,23 (с, 6H), 1,68-1,10 (м, 83H), 0,94-0,82 (м, 18H).

ПРИМЕР 19

Синтез бис(2-бутилоктил) 10-((4-(диметиламино)бутил)(6-((2-гексилдеканоил)окси)гексил)амино)нонадекандиоата (Соединение I-5)

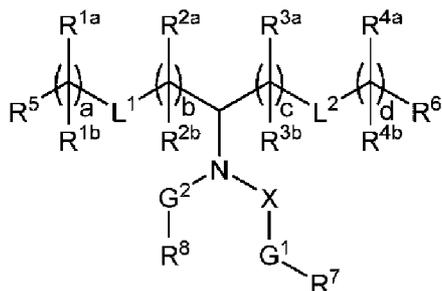
Соединение I-5 получали в соответствии с общими процедурами Примера 17 с получением 0,04 г бесцветного масла, 0,04 ммоль, 73%. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ: 4,05 (т, 7,0 Гц, 2H), 3,96 (д, 5,8 Гц, 4H), 2,38-2,26 (м, 11H), 2,23 (с, 6H), 1,71-1,09 (м, 99H), 0,95-0,82 (м, 18H).

Различные варианты осуществления, описанные выше, могут быть объединены для получения дополнительных вариантов осуществления. Все патенты США, публикации патентных заявок США, патентные заявки США, иностранные патенты, иностранные патентные заявки и непатентные публикации, указанные в данном описании, включая, но не ограничиваясь этим, предварительную заявку на патент США № 63/052815, поданную 16 июля 2020 г., и предварительную заявку на патент США № 63/188996, поданную 14 мая 2021 г., полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки. Аспекты вариантов осуществления могут быть модифицированы, если это необходимо, для использования концепций различных патентов, заявок и публикаций для обеспечения дополнительных вариантов осуществления. Эти и другие изменения могут быть внесены в варианты осуществления в свете приведенного выше подробного описания. В целом, в следующей формуле изобретения используемые термины не должны толковаться как ограничивающие формулу изобретения конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в описании и формуле изобретения, но должны толковаться как включающие все возможные варианты осуществления вместе с полным объемом эквивалентов, на которые распространяется такая

формула изобретения. Соответственно, формула изобретения не ограничивается раскрытием.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, имеющее структуру Формулы (I):



(I)

или его фармацевтически приемлемая соль, таутомер или стереоизомер, где:

G^1 и G^2 , каждый независимо, представляют собой C_1-C_6 алкилен;

L^1 и L^2 , каждый независимо, представляют собой $-O(C=O)-$ или $-(C=O)O-$;

R^{1a} и R^{1b} в каждом случае независимо представляют собой либо: (a) H или C_1-C_{12} алкил; либо (b) R^{1a} представляет собой H или C_1-C_{12} алкил, а R^{1b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, взятый вместе со смежным R^{1b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь;

R^{2a} и R^{2b} в каждом случае независимо представляют собой либо: (a) H или C_1-C_{12} алкил; либо (b) R^{2a} представляет собой H или C_1-C_{12} алкил, а R^{2b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, взятый вместе со смежным R^{2b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь;

R^{3a} и R^{3b} в каждом случае независимо представляют собой либо (a): H или C_1-C_{12} алкил; либо (b) R^{3a} представляет собой H или C_1-C_{12} алкил, а R^{3b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, взятый вместе со смежным R^{3b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь;

R^{4a} и R^{4b} в каждом случае независимо представляют собой либо: (a) H или C_1-C_{12} алкил; либо (b) R^{4a} представляет собой H или C_1-C_{12} алкил, а R^{4b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, взятый вместе со смежным R^{4b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь;

R^5 и R^6 , каждый независимо, представляют собой H или метил;

R^7 представляет собой $-O(C=O)R^{10}$, $-(C=O)OR^{10}$, $-NR^9(C=O)R^{10}$ или $-(C=O)NR^9R^{10}$;

R^8 представляет собой OH, $-N(R^{11})(C=O)R^{12}$, $-(C=O)NR^{11}R^{12}$, $-NR^{11}R^{12}$, $-(C=O)OR^{12}$ или $-O(C=O)R^{12}$;

R^9 представляет собой H или C_1-C_{15} алкил;

R^{10} представляет собой C_1-C_{15} алкил;

R^{11} представляет собой H или C_1-C_6 алкил;

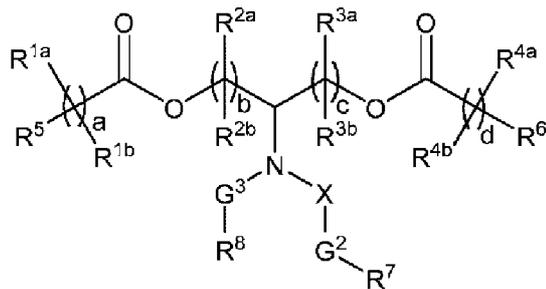
R^{12} представляет собой C_1-C_6 алкил;

X представляет собой $-(C=O)-$ или прямую связь; и

a, b, c и d, каждый независимо, представляют собой целое число от 1 до 24;

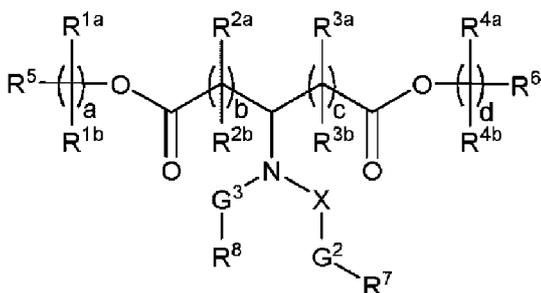
где каждый алкил и алкилен независимо необязательно замещены.

2. Соединение по пункту 1, имеющее одну из следующих структур (IA) или (IB):



(IA)

или



(IB)

или его фармацевтически приемлемая соль, таутомер или стереоизомер.

3. Соединение по пункту 1 или 2, где G^1 представляет собой C_2-C_3 алкилен.
4. Соединение по пункту 1 или 2, где G^1 представляет собой C_4-C_6 алкилен.
5. Соединение по любому из пунктов 1-4, где G^2 представляет собой C_2-C_4 алкилен.
6. Соединение по пункту 5, где G^2 представляет собой C_2-C_3 алкилен или C_3-C_4 алкилен.
7. Соединение по любому из пунктов 1-6, где X представляет собой $-(C=O)-$.
8. Соединение по любому из пунктов 1-6, где X представляет собой прямую связь.
9. Соединение по любому из пунктов 1-8, где R^7 представляет собой $-O(C=O)R^{10}$ или $-(C=O)OR^{10}$.
10. Соединение по пункту 9, где R^{10} представляет собой линейный C_1-C_{15} алкил.
11. Соединение по пункту 10, где R^{10} представляет собой линейный C_6-C_{10} алкил.
12. Соединение по пункту 10, где R^{10} представляет собой метил.
13. Соединение по пункту 10, где R^{10} представляет собой разветвленный C_2-C_{15} алкил.
14. Соединение по пункту 13, где R^{10} представляет собой разветвленный $C_{10}-C_{15}$ алкил.
15. Соединение по любому из пунктов 1-8, где R^7 представляет собой $-NR^9(C=O)$ или $-(C=O)NR^9R^{10}$.
16. Соединение по пункту 15, где R^9 представляет собой H.

17. Соединение по пункту 15, где R^9 и R^{10} , каждый независимо, представляют собой C_6 - C_{10} алкил.

18. Соединение по любому из пунктов 1-17, где, по меньшей мере в одном случае R^{1a} и R^{1b} , R^{1a} представляет собой H или C_1 - C_{12} алкил, а R^{1b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, взятый вместе со смежным R^{1b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь.

19. Соединение по любому из пунктов 1-18, где, по меньшей мере в одном случае R^{4a} и R^{4b} , R^{4a} представляет собой H или C_1 - C_{12} алкил, а R^{4b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, взятый вместе со смежным R^{4b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь.

20. Соединение по любому из пунктов 1-19, где, по меньшей мере в одном случае R^{2a} и R^{2b} , R^{2a} представляет собой H или C_1 - C_{12} алкил, а R^{2b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, взятый вместе со смежным R^{2b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь.

21. Соединение по любому из пунктов 1-20, где, по меньшей мере в одном случае R^{3a} и R^{3b} , R^{3a} представляет собой H или C_1 - C_{12} алкил, а R^{3b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, взятый вместе со смежным R^{3b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь.

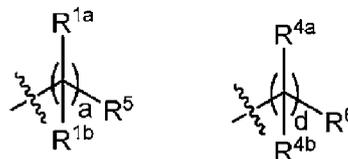
22. Соединение по любому из пунктов 1-17, где R^{1a} , R^{1b} , R^{2a} , R^{2b} , R^{3a} , R^{3b} , R^{4a} и R^{4b} в каждом случае независимо представляют собой H или C_1 - C_{12} алкил.

23. Соединение по пункту 22, где R^{2a} , R^{2b} , R^{3a} и R^{3b} в каждом случае представляют собой H.

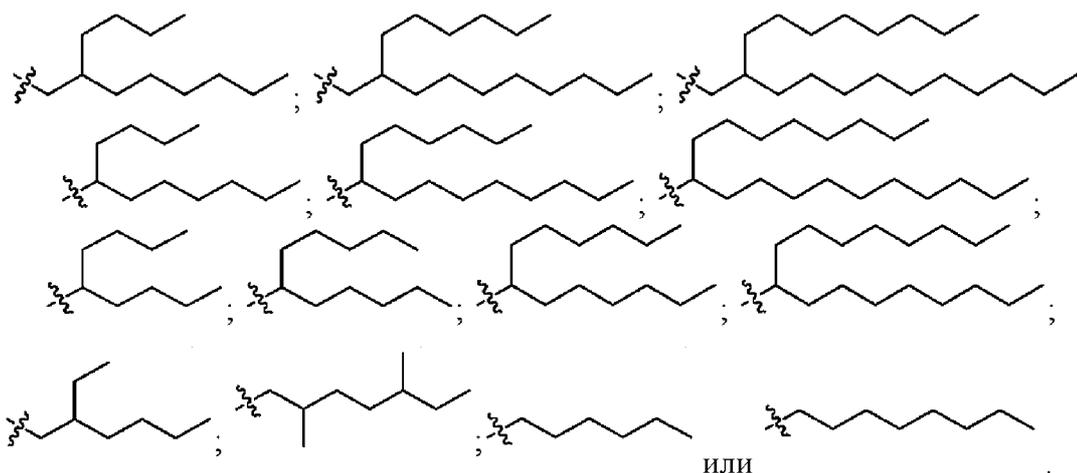
24. Соединение по пункту 22 или 23, где R^{1a} и R^{4a} в каждом случае представляют собой H.

25. Соединение по любому из пунктов 22-24, где по меньшей мере один из R^{1b} и R^{4b} представляет собой C_1 - C_8 алкил.

26. Соединение по пункту 25, где C_1 - C_8 алкил представляет собой метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, трет-бутил, н-гексил или н-октил.



27. Соединение по любому из пунктов 22-26, где или , или оба, независимо имеет одну из следующих структур:



28. Соединение по любому из пунктов 1-27, где а, b, с и d, каждый независимо, представляют собой целое число от 2 до 12.

29. Соединение по любому из пунктов 1-27, где а, b, с и d, каждый независимо, представляют собой целое число от 4 до 10, от 5 до 10, от 6 до 10, от 4 до 9, от 5 до 9 или от 6 до 9.

30. Соединение по любому из пунктов 1-29, где один из R^5 или R^6 представляет собой метил.

31. Соединение по любому из пунктов 1-30, где каждый из R^5 и R^6 представляет собой метил.

32. Соединение по любому из пунктов 1-31, где R^8 представляет собой OH.

33. Соединение по любому из пунктов 1-31, где R^8 представляет собой $-N(R^{11})(C=O)R^{12}$.

34. Соединение по любому из пунктов 1-31, где R^8 представляет собой $-(C=O)NR^{11}R^{12}$.

35. Соединение по любому из пунктов 1-31, где R^8 представляет собой $-NR^{11}R^{12}$.

36. Соединение по любому из пунктов 33-35, где R^{11} и R^{12} , каждый независимо, представляют собой H или C_1-C_8 алкил.

37. Соединение по любому из пунктов 33-36, где R^{11} и R^{12} , каждый независимо, представляют собой H или C_1-C_3 алкил.

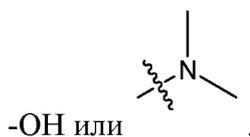
38. Соединение по пункту 36 или 37, где C_1-C_8 алкил или C_1-C_3 алкил является незамещенным или замещен гидроксилком.

39. Соединение по любому из пунктов 33-36, где R^{11} и R^{12} каждый представляет собой метил.

40. Соединение по любому из пунктов 1-31, где R^8 представляет собой $-(C=O)OR^{12}$.

41. Соединение по пункту 40, где R^8 представляет собой $-O(C=O)R^{12}$.

42. Соединение по любому из пунктов 1-31, где R^8 имеет одну из следующих структур:



43. Соединение, выбранное из соединения в Таблице 1.

44. Липидная наночастица, включающая соединение по любому из пунктов 1-43 и терапевтический агент.

45. Липидная наночастица по пункту 44, дополнительно включающая один или несколько эксципиентов, выбранных из нейтральных липидов, стероидов и конъюгированных с полимерами липидов.

46. Липидная наночастица по пункту 45, где композиция включает один или несколько нейтральных липидов, выбранных из DSPC, DPPC, DMPC, DOPC, POPC, DOPE и SM.

47. Липидная наночастица по пункту 46, где нейтральный липид представляет собой DSPC.

48. Липидная наночастица по любому из пунктов 44-47, где молярное отношение соединения к нейтральному липиду находится в диапазоне от около 2:1 до около 8:1.

49. Липидная наночастица по любому из пунктов 45-48, где стероид представляет собой холестерин.

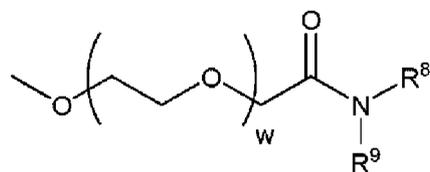
50. Липидная наночастица по пункту 49, где молярное отношение соединения к холестерину находится в диапазоне от 5:1 до 1:1.

51. Липидная наночастица по любому из пунктов 45-50, где конъюгированный с полимером липид представляет собой пегилированный липид.

52. Липидная наночастица по пункту 51, где молярное отношение соединения к пегилированному липиду находится в диапазоне от около 100:1 до около 20:1.

53. Липидная наночастица по любому из пунктов 51 или 52, где пегилированный липид представляет собой PEG-DAG, PEG-PE, PEG-S-DAG, PEG-seg или PEG диалкилоксипропилкарбамат.

54. Липидная наночастица по любому из пунктов 51 или 52, где пегилированный липид имеет следующую структуру (II):



(II)

или его фармацевтически приемлемая соль, таутомер или стереоизомер, где:

R^8 и R^9 , каждый независимо, представляют собой алкил, алкенил или алкинил с прямой или разветвленной цепью, содержащий от 10 до 30 атомов углерода, где алкил, алкенил или алкинил необязательно прерывается одной или несколькими сложноэфирными связями; и

w имеет среднее значение в диапазоне от 30 до 60.

55. Липидная наночастица по пункту 54, где R^8 и R^9 , каждый независимо, представляют собой прямую алкильную цепь, содержащую от 12 до 16 атомов углерода.

56. Липидная наночастица по любому из пунктов 54 или 55, где среднее значение w составляет около 49.

57. Липидная наночастица по любому из пунктов 44-56, где терапевтический агент включает нуклеиновую кислоту.

58. Липидная наночастица по пункту 57, где нуклеиновая кислота выбрана из антисмысловой и матричной РНК.

59. Фармацевтическая композиция, включающая липидную наночастицу по любому из пунктов 44-58 и фармацевтически приемлемый разбавитель или эксципиент.

60. Способ лечения или профилактики заболевания у нуждающегося в этом пациента, включающий введение пациенту липидной наночастицы по любому из пунктов 44-58 или фармацевтической композиции по пункту 59.

61. Способ вакцинации нуждающегося в этом пациента против вирусного патогена, включающий введение пациенту липидной наночастицы по любому из пунктов 44-58 или фармацевтической композиции по пункту 59, где терапевтический агент представляет собой вирусный антиген или нуклеиновую кислоту, способную транскрибировать вирусный антиген.