

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390455 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.28

(51) Int. Cl. A61K 9/51 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.07.28

(54) ЧАСТИЦЫ ИЗ СОПОЛИМЕРА ПОЛИАМИНА И СЛОЖНОГО ПОЛИЭФИРА ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОЙ ПУЛЬМОНАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ

(31) 63/057,626; 17/332,175

(32) 2020.07.28; 2021.05.27

(33) US

(86) PCT/US2021/043514

(87) WO 2022/026585 2022.02.03

(71) Заявитель:
ЙЕЙЛ ЮНИВЕРСИТИ (US)(72) Изобретатель:
Зальцман У. Марк, Нтоку Аглая,
Грейф Дэниел, Кауфмани Эми (US)(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

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

A1

202390455

202390455

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577113EA/085

ЧАСТИЦЫ ИЗ СОПОЛИМЕРА ПОЛИАМИНА И СЛОЖНОГО ПОЛИЭФИРА ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОЙ ПУЛЬМОНАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка заявляет преимущество и приоритет заявки на патент США № 63/057626, поданной 28 июля 2020 г., и заявки на патент США № 17/332175, поданной 27 мая 2021 г., которые в полном объеме включены в настоящий документ посредством ссылки.

Заявление относительно разработок или исследований, которые спонсируются государством

Настоящее изобретение было сделано при поддержке правительства в рамках грантов HL142674, HL133016 и HL15076, присужденного Национальным институтом здравоохранения. Правительство имеет определенные права на изобретение.

Область изобретения

Область изобретения, в основном, относится к полимерным композициям и способам улучшенной пульмональной доставки диагностических, профилактических и/или терапевтических средств для селективной доставки и поглощения средств легочными иммунными клетками, в частности, макрофагами и моноцитами.

Уровень техники

Сердечно-сосудистые заболевания, такие как легочная гипертензия (ЛГ), оказывают серьезное пагубное воздействие на здоровье человека. Действительно, ЛГ, которая определяется средним давлением в легочной артерии выше 20 мм рт. ст. является ответственной за 20000 летальных исходов только в США (Simonneau G. et al., Eur. Respir. J. 2019;53(1); George Chest., 2014;146(2):476-95). ЛГ включает гетерогенный набор клинических состояний, которые классифицируются Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) на пять групп на основе клинической картины, гемодинамики, патологических данных и методов лечения (Simonneau).

Согласно ВОЗ группа 1 или легочная артериальная гипертензия (ЛАГ), которая включает идиопатическую (ИЛАГ; ранее классифицированную как первичная ЛГ), и группа 3, которая обусловлена заболеваниями легких и/или гипоксией, являются репрезентативными примерами. Примерно половина случаев ЛАГ представляет собой ИЛАГ, наследственной этиологии или индуцированной лекарственными препаратами. Другой важной подгруппой являются ассоциированные с ЛАГ состояния, основной причиной которых является заболевание соединительной ткани, преимущественно системный склероз (ССК; также известный как склеродермия) (Hoepfer M.M. et al., Lancet Respir. Med., 2016;4(4):306-22; Galie H. et al., Eur. Heart J., 2016;37(1):67-119).

К сожалению, ЛАГ является очень болезненной и смертельной: 50% пациентов умирают в течение семи лет после постановки первоначального диагноза (Benza Chest., 2012;142(2):448-56). Более того, прогноз при ССК-ЛАГ значительно хуже, чем при ИЛАГ

(Fisher M.R. et al., *Arthritis Rheum.*, 2006; 54(9):3043-50). Несмотря на наличие ряда доступных лекарственных препаратов для лечения ЛАГ, ни один из методов лечения не вызывает отмены или предупреждения прогрессирования заболевания. Аналогично среди пациентов группы 3 ЛГ предвещает значительно худший прогноз основного заболевания легких (Hoerger, 2016).

Многие сердечно-сосудистые заболевания, такие как атеросклероз и артериальный рестеноз, характеризуются избытком и наличием аберрантных гладкомышечных клеток (SMC), и аналогично покрытие SMC, в норме немускуляризованных дистальных легочных артериол, при ЛГ является ключевым патологическим признаком. Такая гипермускуляризация снижает растяжимость легочных артерий, что является сильным независимым прогнозирующим фактором летального исхода при ИЛАГ (Mahapatra et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2006;47(4):799-803). Современные методы лечения ЛАГ в основном вызывают расширение сосудов, но эти методы лечения не ослабляют избыточную мускуляризацию. Пробел в лечении в значительной степени отражает ограничения в нашем понимании патогенеза, и, следовательно, дальнейшие исследования патофизиологии ЛГ имеют первостепенное значение.

Специализированные SMC легочных артериол, экспрессирующие рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGFR)- β , клонально экспандируются и дают начало патологическим дистальным артериолам SMC во время индуцированной гипоксией ЛГ, но регуляция этого стереотипного процесса не изучена полностью (Sheikh *Cell Rep.*, 2014; 6(5):809-17; Sheikh, *Sci. Transl. Med.*, 2015;7(308):308ra159). Положительная регуляция фактора, индуцируемого гипоксией (HIF)1- α , в SMC играет ключевую роль в мускуляризации дистальных артериол, и в дополнение к таким путям в самих SMC решающее значение имеет не клеточная автономная регуляция (Ball et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2014;189(3):314-24.; Sheikh, *Cell Rep.*, 2018;23(4):1152-65). В этом контексте эндотелиальные клетки (EC) являются наиболее изученным типом клеток. Например, путь PDGF является неотъемлемой частью развития SMC сосудов и заболевания (Andrae et al., *Genes Dev.*, 2008;22(10):1276-312; Seidemann, *Cell Mol. Life Sci.*, 2014;71(11):1977-99), и делеция лиганда PDGF- β в EC ослабляет индуцированную гипоксией мускуляризацию дистальных легочных артериол, ЛГ и гипертрофию правого желудочка (RVH) (Sheikh, 2018)).

Экспериментальная гипоксия у грызунов вызывает мускуляризацию дистальных легочных артериол, ЛГ и гипертрофию правого желудочка. Сигнальный путь, регулируемый тромбоцитарным фактором роста, сокращенно PDGF, является неотъемлемой частью патофизиологии SMC при ЛГ. Действительно, в патологических SMC повышен уровень рецептора PDGFR- β , и делеция лиганда PDGF- β в эндотелиальных клетках ослабляет ЛГ. За последнее десятилетие новые данные об участии иммунной системы в ряде заболеваний побудили ученых к дальнейшему изучению роли макрофагов при патологиях легких. Гипоксия индуцирует повышенный рекрутмент макрофагов в легких, и было показано, что фармакологическое ингибирование выбранных рецепторов

или агонистов, экспрессированных макрофагами (например, CX3CR1, лейкотриен B4), ослабляет ЛГ; однако эти продукты также продуцируются другими типами клеток, что ставит вопрос о клеточной специфичности.

Помимо типов сосудистых клеток, иммунные клетки, включающие моноциты/макрофаги, в последнее время привлекают все большее внимание в контексте ЛГ (Florentin et al., *Cytokine*, 2017; 100:11-5; Nicolls et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2017; 195(10):1292-95). При воздействии гипоксии на мышей моноциты мигрируют в периваскулярное пространство легких и дифференцируются в интерстициальные макрофаги (Florentin et al., *Cytokine*, 2017; 100:11-5; Nicolls et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2017; 195(10):1292-9). Бронхоальвеолярный лаваж у этих мышей демонстрирует увеличение количества макрофагов в аспирированной жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛЖ), а также в резидуальном легком (Amsellem V. et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2017; 56(5):597-608). Аналогично, количество клеток, экспрессирующих макрофагальный маркер CD68, увеличивается около сосудистых обструктивных очагов в легких пациентов с ЛАГ (Tuder et al., *Am. J. Pathol.*, 1994; 144(2):275-85). На моделях ЛГ на грызунах было показано, что глобальное генетическое или фармакологическое ингибирование отдельных рецепторов или агонистов, экспрессированных макрофагами (например, CX3CR1, лейкотриен B4), ослабляет ЛГ (Amsellem et al., *Sci. Transl. Med.*, 2013; 5 (200): 200ra117); однако эти продукты продуцируются и другими типами клеток, что ставит вопрос о специфичности макрофагов.

Хотя моноциты/макрофаги, несомненно, играют важную роль в патогенезе ЛГ и других сосудистых заболеваний, их роль в регуляции биологии SMC в этих контекстах не установлена. Недавно было показано, что при формировании атеросклеротических бляшек клональная экспансия редких SMC регулируется клетками костного мозга (скорее всего, макрофагами) (Misra A. et al., *Nat. Commun.*, 2018;9(1):2073). Кроме того, среда, кондиционированная активированными макрофагами мышей, склонных к развитию атеросклероза, вызывает миграцию и пролиферацию SMC аорты (Misra, 2018). Что касается ЛГ, то воздействие гипоксии на макрофаги, предварительно активированные интерлейкином-4, создает кондиционированную среду, которая индуцирует пролиферацию SMC легочной артерии (PASMC) (Vergadi E. et al., *Circulation*, 2011;123(18):1986-95). Кроме того, двойное ингибирование рецептора C-C-хемокинов 2 и 5 ослабляет обусловленную макрофагами индукцию пролиферации и миграции PASMC в среде (Abid et al., *Eur. Respir. J.*, 2019; 54 (4)).

Также недавно было обнаружено, что орицательная регуляция PDGF-B в моноцитах/макрофагах с использованием неэффективного Csf1r-Cre-Mer-Cre незначительно ингибирует вызванное гипоксией ремоделирование легочных сосудов, но гемодинамика и основные пути не оценивались (Sheikh, *Cell Reports*, 2018. 23:1152; Epelman S. et al., *Immunity*, 2014;40(1):91-104).

Даже если эти клетки имеют решающее значение для профилактики или лечения ЛГ, то отсутствуют способы селективной доставки к этим клеткам для лечения заболевания или

облегчения его симптомов.

Следовательно, целью изобретения является создание улучшенных полимеров, которые могут избирательно и эффективно доставлять терапевтические, диагностические и/или профилактические средства, средства к легочным иммунным клеткам, в частности, к легочным макрофагам и моноцитам.

Сущность изобретения

PDGF-B, происходящий из макрофагов легких, играет ключевую роль в патологической экспансии SMC и может использоваться в качестве терапевтической мишени для лечения или облегчения таких заболеваний, как ЛГ. Были проведены исследования с использованием мышинных моделей, клеточный тип-специфической делеции нескольких генов, макрофагов человека от пациентов с ИЛАГ и ССК-ЛАГ, а также доставляемой наночастицами *in vivo* миРНК против PDGF- β . Истощение легочных макрофагов или делеция PDGF- β в миелоидных клетках ослабляет индуцированную гипоксией мускуляризацию дистальных артериол, ЛГ и накопление альвеолярных миофибробластов. Результаты показывают, что моноциты/макрофаги играют важную роль в развитии легочной гипертензии (ЛГ).

Используя мышиную модель гипоксии, а также макрофаги, полученные из моноцитов человека, было показано, что тромбоцитарный фактор роста (PDGF-B) из макрофагов подвергается положительной регуляции у пациентов с легочной гипертензией и в легких экспериментальных мышей с легочной гипертензией. PDGF-B, происходящий из макрофагов, индуцирует повышенную миграцию и пролиферацию гладкомышечных клеток легочной артерии человека, ключевых компонентов в патогенезе ЛГ. Кроме того, полученные результаты показывают, что генетическая делеция PDGF- β в миелоидных клетках предотвращает индуцированную гипоксией ЛГ. Результаты демонстрируют, что HIF1- α и HIF2- α находятся апстрим от PDGF-B в макрофагах, и делеция гена *Hifa* в *LysM*⁺ клетках у мышей, подвергшихся гипоксии, имеет такие же эффекты, как и делеция PDGF- β . В качестве дополнительного подхода в нормоксических условиях мутация приобретения функции HIF1 α в миелоидных клетках вызывает накопление макрофагов в легких и экспрессию PDGF- β , а также мускуляризацию дистальных артериол, ЛГ и RVH. Среда, кондиционированная макрофагами от пациентов с ИЛАГ и ССК-ЛАГ, индуцирует пролиферацию и миграцию PASMC человека (hPASMC) PDGF-B-зависимым образом. Результаты показывают, что введенные оротрахеально наночастицы, нагруженные миРНК PDGF- β , заметно ослабляют индуцированную гипоксией экспрессию PDGF- β макрофагами легких, мускуляризацию дистальных артериол, ЛГ, RVH и накопление альвеолярных миофибробластов. Все они демонстрируют нацеливание на PDGF-B, происходящий из макрофагов легких, в качестве терапевтической стратегии при легочной гипертензии.

Ряд технологий на основе наночастиц в настоящее время одобрен FDA, но они преимущественно вводятся внутривенно для достижения органа-мишени(ов) через кровеносную систему. Было обнаружено, что частицы, образованные из сополимеров полиамина и сложного полиэфира, могут быть использованы для селективной доставки

терапевтических, профилактических или диагностических средств к иммунным клеткам, выстилающим легочный тракт, таким как макрофаги, для поглощения ими. Примеры демонстрируют, что частицы имеют высокую загрузку и селективное поглощение в отсутствие нацеливающих групп при введении в легочные пути.

В дополнение к легочным заболеваниям, таким как легочная гипертензия, заболевания или патологические состояния, подлежащие лечению, включают инфекционные заболевания, рак, метаболические расстройства, аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания и возрастные расстройства. Частицы можно вводить в виде аэрозоля, ингалятором, сухим порошком, интубацией и инстилляцией.

Примеры демонстрируют крупные наночастицы (диаметром 400 нм), вводимые мышам путем оротрахеально, нагруженные сайленсинговой (ми)РНК против PDGF- β . Эти наночастицы преимущественно поглощаются легочными макрофагами (от общего числа клеток, которые поглощают наночастицы, процент клеток, которые являются макрофагами, составляет ~95% в жидкости бронхоальвеолярного лаважа и ~85% в резидуальном легком после бронхоальвеолярного лаважа). При оротрахеальном введении эффективность сайленсинга PDGF- β высока в макрофагах легких (> 85% нокдаун) и может эффективно предотвращать/отменять вызванную гипоксией патологическую мускуляризацию дистальных артериол, давление в легочной артерии и гипертрофию правого желудочка.

Краткое описание фигур

На фиг. 1A-1F представлены графики, показывающие, что макрофаги в легких накапливаются при гипоксии и имеют критическое значение для индуцированного гипоксией ремоделирования легочных сосудов и ЛГ. Мышей дикого типа подвергали гипоксии (10% FiO₂) до 21 суток или выдерживали в условиях нормоксии, как указано. БАЛЖ и резидуальное легкое собирали, и суспензии отдельных клеток подвергали анализу проточной цитометрией. Определяли процент от общего числа клеток в данном компартменте, которые являются CD64⁺Ly6G⁺ макрофагами. n=3 мыши на каждую временную точку. На фиг. 1A и 1B представлены графики CD64⁺Ly6G⁺ клеток (%) в течение дней гипоксии, для БАЛЖ (фиг. 1A) и резидуального легкого (фиг. 1B). На фиг. 1C-1D представлены графики RVSP (мм рт. ст.) (фиг. 1C) и RV/(LV+S) (фиг. 1D, индекс Фултона (F; отношение массы правого желудочка [RV] к сумме массы левого желудочка [LV] и перегородки [S])). n=3 мыши) для нормоксии и гипоксии. Липосомы, содержащие PBS (носитель) или клодронат, вводили оротрахеально в начале гипоксии (или нормоксии в качестве контроля) и каждые 3 суток после этого в течение 21-суточного периода обработки. На фиг. 1E и 1F приведены результаты определения процента CD64⁺Ly6G⁺ макрофагов в общем количестве клеток БАЛЖ (фиг. 1G) и резидуального легкого (фиг. 1H). n=3 мыши.

На фиг. 2A-2F представлены графики, показывающие, что уровни PDGF- β в макрофагах легких возрастают при гипоксии, и делеция PDGF- β в LysM⁺ клетках ослабляет мускуляризацию дистальных артериол и ЛГ. Клетки CD64⁺Ly6G⁺ из БАЛЖ (фиг. 2A) и резидуального легкого (фиг. 2B) выделяли с использованием FACS от мышей дикого типа,

подвергшихся гипоксии (10% FiO₂) до 21 суток или нормоксии, как указано. Уровни мРНК PDGF- β измеряли с помощью кОТ-ПЦР (см. таблицу 1). n=3 мыши на каждую временную точку с использованием кОТ-ПЦР, выполненной в трех повторностях. На фиг. 2С-2F, мыши PDGF- $\beta^{(flox/flox)}$, также не несущие Cre или LysM-Cre, подвергались гипоксии в течение 21 суток или содержались в условиях нормоксии. На фиг. 2С, RVSP; на фиг. 2D, RV/(LV+S), на фиг. 2Е, изменение RV/LV+S, и на фиг. 2F, миофибробласты/100 альвеол. Различия индекса Фултона между значениями при гипоксии и нормоксии, стратифицированными по генотипу, показаны на фиг. 2С. Однофакторный анализ ANOVA с тестом множественных сравнений Тьюки (*, **, ***, #, по сравнению с нормоксией, $p < 0,05$, $< 0,01$, $< 0,001$, $< 0,0001$ соответственно) использовали для данных на (фиг. 2С-2D), и критерий Стьюдента использовали для данных на фиг. 2Е.

На фиг. 3А-3D показано, что делеция Vhl в LysM⁺ клетках индуцирует мускуляризацию дистальных артериол и легочную гипертензию в условиях нормоксии. Мыши Vhl^(flox/flox), также не несущие Cre или LysM-Cre, содержались в условиях нормоксии в течение 49 суток после рождения. На фиг. 3А показана выделенная БАЛЖ, и уровни транскриптов PDGF- β определяли по индексу Фултона (фиг. 3С, БАЛЖ; 3В, легкое). Количество макрофагов (звездочки) определяли в расчете на 100 альвеол (фиг. 3D). Количественно оценивали более 500 альвеол на мышь. n=3 мыши. Использовали t-критерий Стьюдента.

На фиг. 4А-4F показано, что делеция Hif1a в миелоидных клетках ослабляет индуцированную гипоксией экспрессию PDGF- β , мускуляризацию дистальных альвеол и ЛГ. Клетки БАЛЖ выделяли у мышей дикого типа, находящихся в нормоксических или гипоксических условиях (10% FiO₂, до 21 суток). Белки HIF1- α и β -актин анализировали вестерн-блоттингом с денситометрией HIF1- α относительно β -актина. n=3 мыши на каждую временную точку. Однофакторный дисперсионный анализ с тестом множественных сравнений Тьюки. Мышей Hif1a^(flox/flox), также не несущих Cre или LysM-Cre, подвергали гипоксии в течение 3 или 21 суток. На сутки 3 гипоксии уровни транскриптов PDGF- β в клетках БАЛЖ определяли с использованием кОТ-ПЦР (фиг. 4А, 4В). Срезы легких, полученные на вибраторе, окрашивали на SMA, маркер макрофагов CD64 и ядра (DAPI). Количество макрофагов и альвеолярных миофибробластов определяли количественно из расчета на 100 альвеол (фиг. 4С, 4D). n=3-5 мышей, кОТ-ПЦР проводили в трех повторностях. Количественно оценивали более 700 альвеол на мышь. На сутки 21 гипоксии срезы, полученные на вибраторе, с дистальными артериолами в области L.L1.A1.L1 окрашивали на SMA и CD31, измеряли RVSP и индекс Фултона, как показано на фиг. 4Е, 4F. n=3 мыши.

На фиг. 5А-5F показано, что делеция Hif2a в LysM⁺ клетках ослабляет индуцированную гипоксией экспрессию PDGF- β , мускуляризацию дистальных артериол и ЛГ. Клетки БАЛЖ выделяли у мышей дикого типа, подвергшихся нормоксии или гипоксии (10% FiO₂) в течение до 21 суток. Вестерн-блоттинг использовали для определения уровней белков HIF2- α и β -актина с денситометрией HIF2- α относительно β -актина. n=3 мыши на

каждую временную точку. На фиг. 5А представлен однофакторный дисперсионный анализ с тестом множественных сравнений Тьюки. На фиг. 5В-5F показано, что мышей $Hif2a^{(flox/flox)}$, также не несущих Cre или LysM-Cre, подвергали гипоксии в течение 3 или 21 суток. На сутки 3 гипоксии выделяли клетки БАЛЖ с определением уровней мРНК PDGF- β с использованием кОТ-ПЦР (фиг. 5В), и срезы легких, полученные на вибраторе, окрашивали на SMA, CD64 и ядра (DAPI). Количество макрофагов и альвеолярных миофибробластов определяли количественно из расчета на 100 альвеол (фиг. 5С-5D). $n=3-5$ мышей, кОТ-ПЦР проводили в трех повторностях. Количественно оценивали более 700 альвеол на мыш. На сутки 21 гипоксии срезы, полученные на вибраторе, с дистальными артериолами в области L.L1.A1.L1 окрашивали на SMA и MECA-32 и RVSP и измеряли индекс Фултона (фиг. 5Е, 5F). $n=3$ мыши. Использовали t-критерий Стьюдента.

На фиг. 6А-6Е показано, что PDGF- β , секретированный макрофагами пациентов с ССК-ЛАГ, способствует пролиферации и миграции hPASMC. Моноциты выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови контрольных субъектов и пациентов с ИЛАГ или ССК-ЛАГ и подвергали дифференцировке в макрофаги в культуре. На фиг. 6А показано, что макрофаги, полученные из моноцитов контрольных субъектов, культивировали в условиях нормоксии или гипоксии (3% O_2) в течение 12 ч, и затем с использованием кОТ-ПЦР измеряли уровни мРНК PDGF- β . $n=3$ человека (две женщины и один мужчина в возрасте 30-60 лет) с кОТ-ПЦР, проведенной в трех повторностях. На фиг. 6В, кОТ-ПЦР использовали для анализа уровней мРНК PDGF- β макрофагов у контрольных субъектов и пациентов с ЛАГ. $n=5$ человек на диагностический класс ЛАГ и $n=9$ контролей (см. таблицу S2) с использованием кОТ-ПЦР, выполненной в трех повторностях. На фиг. 6С, hPASMC культивировали в течение 24 ч в среде, предварительно кондиционированной макрофагами контрольных субъектов и макрофагами пациентов. BrdU был включен в последние 10 ч этой инкубации. Затем клетки окрашивали на BrdU и ядра (йодид пропидия [PI]). На фиг. 6С показан процент всех клеток (PI^+ ядра), экспрессирующих BrdU, для контрольных субъектов и пациентов был нормализован к этому проценту для контролей. На фиг. 6D блокирующее анти-PDGF-B антитело или контрольный IgG добавляли в кондиционированную среду за 1 ч до инкубации с hPASMC. Результаты представляют собой процентное отношение от общего числа (PI^+) клеток, которые представляют собой $BrdU^+$ для обработки анти-PDGF-B, по отношению к обработке IgG, стратифицированное по диагностическому классу пациента. $n=3$ человека на диагностический класс ЛАГ и $n=6$ контролей (см. таблицу S3), 10 полей зрения при микроскопии на человека, 30-60 клеток в поле зрения. Среду, предварительно кондиционированную макрофагами контрольных субъектов или макрофагами пациента, обрабатывали блокирующим анти-PDGF-B или контрольным IgG антителом в течение 1 ч, и затем помещали в нижнюю часть камеры Бойдена. hPASMC добавляли в верхнюю часть для оценки миграции в кондиционированную среду в течение 8 ч. Мигрировавшие клетки (т.е. находящиеся на нижней поверхности мембраны) окрашивали кристаллическим фиолетовым. На фиг. 6Е приведены результаты количественной оценки мигрировавших клеток по сравнению с

контрольными субъектами, получавшими IgG. n=4 человека на класс ЛАГ и n=3 контроля (см. таблицу 4), 5 полей зрения при микроскопии на человека, 8-90 клеток в поле зрения. Использовали однофакторный дисперсионный анализ с тестом множественных сравнений Тьюки и t-критерием Стьюдента. #, ## по сравнению с ИЛАГ, $p<0,05$, $<0,01$, и *, **, ***, ns по сравнению с соответствующими контролями IgG, $p<0,05$, $<0,01$, $<0,0001$, статистически недостоверно соответственно.

На фиг. 7А-7F показано, что опосредованный наночастицами нокдаун PDGF- β ослабляет мускуляризацию дистальных артериол, накопление миофибробластов и легочную гипертензию. Наночастицы (диаметр 400 нм), нагруженные красителем DiD, вводили оротрахеально мышам, находящимся в нормоксических условиях, и через 12 ч клетки БАЛЖ и резидуального легкого окрашивали на CD64 и подвергали анализу проточной цитометрией. На фиг. 7А представлены результаты количественного анализа, показывающие процент клеток БАЛЖ или резидуального легкого (RL), содержащих DiD⁺ наночастицы (с диаметром 400 или 200 нм, как указано), которые экспрессируют CD64. n=3 мыши на обработку. Клетки БАЛЖ собирали у мышей, находящихся в условиях нормоксии, культивировали с нагруженными DiD наночастицами с диаметром 400 нм в течение 6 ч, и затем окрашивали ядра (DAPI). На фиг. 7В-7F показано, что наночастицы с диаметром 400 нм нагружали миРНК, нацеленной против PDGF- β , или скремблированной (Scr) РНК, и затем вводили мышам в начале гипоксии и затем два раза в неделю. Легкие выделяли у мышей на сутки 3 гипоксии, окрашивали на Ly6G и CD64 и подвергали проточной цитометрии, и процент CD64⁺Ly6G⁺ макрофагов определяли количественно, результаты представлены на фиг. 7В. n=3 мыши на обработку. На фиг. 7С показано, что уровни РНК PDGF- β в CD64⁺Ly6G⁺ макрофагах количественно определяли с помощью кОТ-ПЦР. n=3 мыши на обработку с использованием кОТ-ПЦР, проведенной в трех повторностях. На фиг. 7D-7F показано, что мышам обрабатывали гипоксией в течение 21 суток или содержали в условиях нормоксии. Для мышам с гипоксией срезы, содержащие дистальные артериолы в области L.L1.A1 или альвеолярной области, окрашивали на CD31 и SMA. Определяли RVSP (фиг. 7D), индекс Фултона (фиг. 7E) и количество миофибробластов в расчете на 100 альвеол (фиг. 7F). Количественно оценивали более 500 альвеол на мыш. Использовали однофакторный дисперсионный анализ с тестом множественных сравнений Тьюки и t-критерием Стьюдента. * по сравнению с нормоксией, $p<0,05$. ns, статистически недостоверно. Шкала, 10 мкм (D) и 25 мкм (I, L).

На фиг. 8 представлена схема методов, использованных для исследований на животных и с участием людей.

Подробное описание изобретения

I. Определения

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

Термин «микрочастицы» включает структуры, имеющие средний диаметр примерно от одного или более до примерно 1000 микрон. Термин «микрочастицы» включает микросферы и микрокапсулы, а также структуры, которые не могут быть легко отнесены ни к одной из двух вышеуказанных категорий. Микрочастица может быть сферической или несферической и может иметь любую правильную или неправильную форму. Структуры со средним диаметром менее одного микрона (1000 нм), относятся к «наночастицам» и включают «наносферу» и «нанокапсулу». Термин «диаметр» используется здесь для обозначения либо физического диаметра, либо гидродинамического диаметра. Диаметр по существу сферической частицы может относиться к физическому или гидродинамическому диаметру. Диаметр несферической частицы предпочтительно может относиться к гидродинамическому диаметру. В рамках настоящего изобретения, диаметр несферической частицы может относиться к наибольшему линейному расстоянию между двумя точками на поверхности частицы. Когда речь идет о множестве частиц, то диаметр частиц обычно относится к среднему диаметру частиц. Диаметр частиц можно измерить с использованием различных методов, известных в данной области техники, включая, не ограничиваясь этим, динамическое светорассеяние и конфокальную микроскопию.

Композиция, содержащая микрочастицы или наночастицы, может включать частицы различных размеров. В некоторых вариантах осуществления распределение частиц по размерам может быть однородным, например, в пределах менее примерно 20% стандартного отклонения от среднего объемного диаметра, и в других вариантах осуществления еще более однородным, например, в пределах примерно 10%, 8%, 5%, 3% или 2% от медианного объемного диаметра.

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

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

Термин «биodeградируемый», используемый в данном документе, означает, что вещества деградируют или распадаются на составляющие его субъединицы, например, в результате гидролиза или ферментативного действия.

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

«Пролонгированное высвобождение», как это выражение используется в данном документе, относится к высвобождению вещества в течение длительного периода времени,

в отличие от болюсного введения, при котором все количество вещества становится биологически доступным за один раз.

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

В рамках настоящего изобретения, термин «нацеливающая группа» относится к группе, локализуемой в определенном месте или за его пределами. Группа может представлять собой, например, белок, нуклеиновую кислоту, аналог нуклеиновой кислоты, углевод или небольшую молекулу. Указанная молекула может быть, например, терапевтическим соединением, таким как небольшая молекула, или диагностическим соединением, таким как детектируемая метка.

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

В предпочтительных вариантах осуществления алкил с прямой или разветвленной цепью содержит 30 или меньше атомов углерода в своем остове (например, C₁-C₃₀ для прямых цепей, C₃-C₃₀ для разветвленных цепей), предпочтительно 20 или меньше, более предпочтительно 15 или меньше, наиболее предпочтительно 10 или меньше. Все целые значения числа атомов углеродного остова от одного до 30 рассматриваются и раскрываются для алкилов с прямой или разветвленной цепью. Аналогично, предпочтительные циклоалкилы имеют от 3 до 10 атомов углерода в своей кольцевой структуре и более предпочтительно имеют 5, 6 или 7 атомов углерода в кольцевой структуре. Все целые значения количества атомов углерода в кольце от трех до 10 рассматриваются и раскрываются для циклоалкилов.

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

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

Специалистам в данной области будет понятно, что группы, замещенные в углеводородной цепи, сами могут быть замещены, если это является подходящим. Например, заместители замещенного алкила могут включать атом галогена, гидроксильную, нитро-, тио-, амино-, азидо-, имино-, амидо-, фосфорил- (включая фосфонат и фосфинат), сульфонил- (включая сульфат, сульфонамидо-, сульфоамидо- и сульфонат-) и силильные группы, а также простые эфиры, алкилтиогруппы, карбонилы (включая кетоны, альдегиды, карбоксилаты и сложные эфиры), $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ и т.п. Циклоалкилы могут быть замещены аналогичным образом.

Термин «арил», используемый здесь, относится к C_5 - C_{10} -членным ароматическим, гетероциклическим, конденсированным ароматическим, конденсированным гетероциклическим, биароматическим или бигетероциклическим кольцевым системам. В некоторых формах кольцевые системы содержат от 3 до 50 атомов углерода. В широком смысле термин «арил», используемый в данном документе, включает 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10- и 24-членные ароматические группы с одним кольцом, которые могут включать от нуля до четырех гетероатомов, например, бензол, нафталин, антрацен, фенантрен, хризен, пирен, кораннулен, коронен, пиррол, фуран, тиофен, имидазол, оксазол, тиазол, триазол, пиразол, пиридин, пиазин, пиадазин и пиаимидин и т.п. Эти арильные группы, имеющие гетероатомы в кольцевой структуре, также могут называться «арильными гетероциклами» или «гетероароматическими соединениями». Ароматическое кольцо может быть замещено в одном или нескольких положениях кольца одним или несколькими заместителями, включая, не ограничиваясь этим, атом галогена, азид, алкил, аралкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, гидроксил, алкоксил, амино (или кватернизованный амино), нитро-, сульфгидрильная, имино-, амидо-, фосфонатная, фосфинатная, карбонильная, карбоксильная, силильная, эфирная, алкилтио-, сульфонильная, сульфонамидо-, кетоновая, альдегидная, сложноэфирная, гетероциклическая, ароматическая или гетероароматическая группы, $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$; и их комбинации.

Термин «арил» также включает полициклические кольцевые системы, имеющие два или более циклических кольца, в которых два или более атомов углерода являются общими для двух соседних колец (т. е. «конденсированные кольца»), где, по меньшей мере, одно из колец является ароматическим, например, другое циклическое кольцо или кольца могут представлять собой циклоалкилы, циклоалкенилы, циклоалкинилы, арилы и/или гетероциклы. Примеры гетероциклических колец включают, не ограничиваясь этим,

бензимидазолил, бензофуранил, бензотиофуранил, бензотиофенил, бензоксазолил, бензоксазолинил, бензтиазолил, бензтриазолил, бензтетразолил, бензизоксазолил, бензизотиазолил, бензимидазолил, карбазолил, 4aH карбазолил, карболинил, хроманил, хроменил, циннолинил, декагидрохинолинил, 2H,6H-1,5,2-дитиазинил, дигидрофуоро[2,3-b]тетрагидрофуран, фуранил, фуразанил, имидазолидинил, имидазолинил, имидазолил, 1H-индазолил, индоленил, индолинил, индолизинил, индолил, 3H-индолил, изатиноил, изобензофуранил, изохроманил, изоиндазолил, изоиндолинил, изоиндолил, изохинолинил, изотиазолил, изоксазолил, метилендиоксифенил, морфолинил, нафтиридилил, октагидроизохинолинил, оксадиазолил, 1,2,3-оксадиазолил, 1,2,4-оксадиазолил, 1,2,5-оксадиазолил, 1,3,4-оксадиазолил, оксазолидинил, оксазолил, оксиндолил, пиримидинил, фенантридинил, фенантролинил, феназинил, фенотиазинил, феноксатинил, феноксазинил, фталазинил, пиперазинил, пиперидинил, пиперидонил, 4-пиперидонил, пиперонил, птеридинил, пуринил, пиранил, пиразинил, пиразолидинил, пиразолинил, пиразолил, пиридазинил, пиридоксазол, пиридоимидазол, пиридотиазол, пиридинил, пиридил, пиримидинил, пирролидинил, пирролинил, 2H-пирролил, пирролил, хиназолинил, хинолинил, 4H-хинолизинил, хиноксалинил, хинуклидинил, тетрагидрофуранил, тетрагидроизохинолинил, тетрагидрохинолинил, тетразолил, 6H-1,2,5-тиадиазинил, 1,2,3-тиадиазолил, 1,2,4-тиадиазолил, 1,2,5-тиадиазолил, 1,3,4-тиадиазолил, тиантренил, тиазолил, тиенил, тиенотиазолил, тиенооксазолил, тиеноимидазолил, тиофенил и ксантенил. Одно или более колец могут быть заменены, как определено выше, на «арил».

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

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

«Замещенный», используемый в данном документе, означает, что один или более атомов или групп атомов в мономере были замещены одним или несколькими атомами или группами атомов, которые отличаются от замещаемого атома или группы атомов. В некоторых вариантах осуществления один или более атомов водорода в мономере замещены одним или несколькими атомами или группами атомов. Примеры функциональных групп, которые могут замещать атом водорода, перечислены выше в определении. В некоторых вариантах осуществления могут быть добавлены одна или более функциональных групп, которые изменяют химические и/или физические свойства получаемого мономера/полимера, такие как заряд или гидрофильность/гидрофобность и т. д. Примеры заместителей включают, не ограничиваясь этим, атом галогена, гидроксил,

карбонил (такой как карбоксил, алкоксикарбонил, формил или ацил), тиокарбонил (такой как тиоэфир, тиоацетат или тиоформат), алкоксил, фосфорил, фосфат, фосфонат, фосфинат, аминок, амидо, амидин, имин, циано, нитро, азидо, сульфгидрил, алкилтио, сульфат, сульфонат, сульфоамид, сульфонамидо, сульфонил, нитро, гетероциклил, аралкил или ароматическую или гетероароматическую группу.

Если не указано иное, то раскрытие охватывает обычные методы молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии и рекомбинантной ДНК, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области. См., например, Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition (2001); *Current Protocols In Molecular Biology* [(Ausubel, et al. eds., (1987)] Coligan, Dunn, Ploegh, Speicher and Wingfeld, eds. (1995) *Current Protocols in Protein Science* (John Wiley & Sons, Inc.); серия *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A Practical Approach* (M. J. MacLГerson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)).

II. Частицы

Частицы для эффективной и селективной доставки в легкие обычно состоят из биodeградируемых биосовместимых полимеров. Обычно это наночастицы размером менее 1000 нм, более предпочтительно менее 500 нм, наиболее предпочтительно по меньшей мере 100 нм. Примеры демонстрируют, что наночастицы с диаметром от 200 до 400 нм избирательно нацелены на иммунные клетки легких, такие как моноциты и макрофаги.

Полимеры

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

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

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

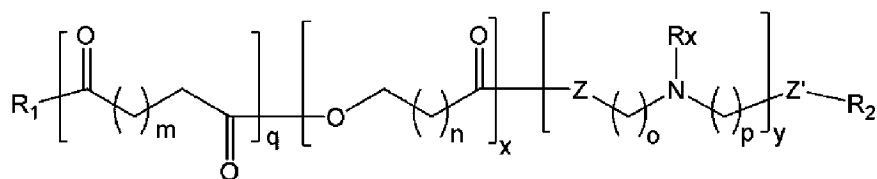
В некоторых вариантах осуществления содержание гидрофобного мономера в полимере увеличивается по сравнению с содержанием того же гидрофобного мономера при

использовании для образования полиплексов. Увеличение содержания гидрофобного мономера в полимере приводит к образованию полимера, способного образовывать наночастицы с твердым ядром в присутствии нуклеиновых кислот, в том числе РНК.

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

А. Структура полимера

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



формула I

где n представляет собой целое число 1-30,

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

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

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

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

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

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

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

Полимер может быть получен из одного или более лактонов, одного или более

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

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

В некоторых формах Z является таким же как Z' .

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

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

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

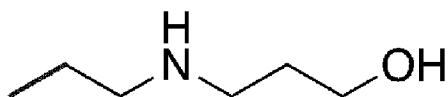
В некоторых формах Z' представляет собой O , n представляет собой целое число 1-24, например 4, 10, 13 или 14, m представляет собой целое число 1-10, например 4, 5, 6, 7 или 8, и o и p представляют собой одно и то же целое число 1-6, например 2, 3 или 4. В некоторых формах Z также представляет собой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

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

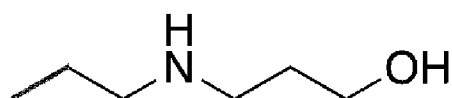
В некоторых формах n равно 14 (например, пентадекалактон, PDL), m равно 7 (например, себациновая кислота), o и p равно 2 (например, *N*-метилдиэтаноламин, MDEA).

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

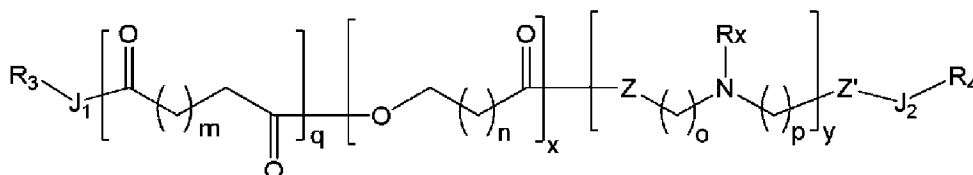
состоят из или включают:



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



В некоторых формах полимер имеет структуру формулы II:



формула II

где J_1 и J_2 независимо представляют собой связывающие группы или отсутствуют,

R_3 и R_4 независимо представляют собой замещенный алкил, содержащий гидроксильную группу, первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу, третичную аминогруппу или их комбинации. В некоторых формах молекулярная масса R_3 , R_4 или обоих составляет 500 дальтон или ниже, 200 дальтон или ниже или 100 дальтон или ниже.

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

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

В некоторых формах R_3 идентичен R_4 .

Предпочтительно R_3 и/или R_4 являются линейными.

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

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

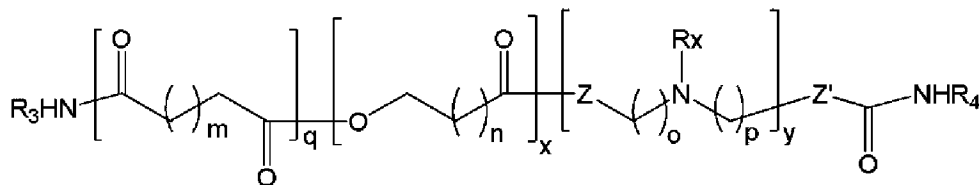
В некоторых формах по меньшей мере один из R_3 и R_4 не содержит гидроксильной группы.

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

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

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

В некоторых формах полимер имеет структуру формулы III:



формула III

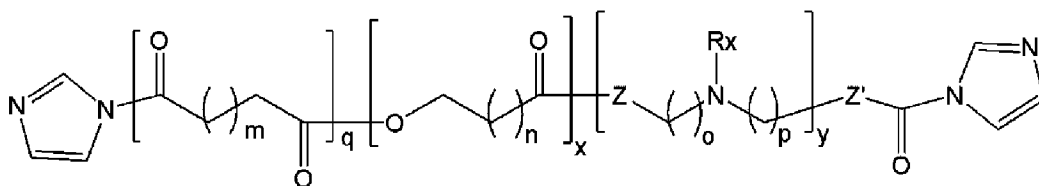
Мономерные звенья могут быть замещены в одном или более положениях одним или более заместителями. Примеры заместителей включают, не ограничиваясь этим, алкильные группы, циклические алкильные группы, алкеновые группы, циклические алкеновые группы, алкины, атом галогена, гидроксил, карбонил (такой как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

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

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

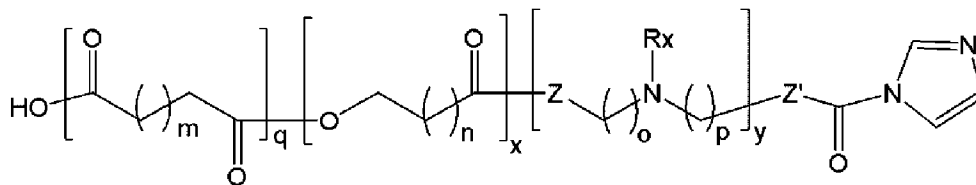
некоторых формах активированные полимеры содержат R_1 или R_2 на одном конце и гидроксильную или карбоксильную концевую группу на другом конце, образующуюся в результате гидролиза.

В некоторых формах полимер имеет структуру формулы IV:



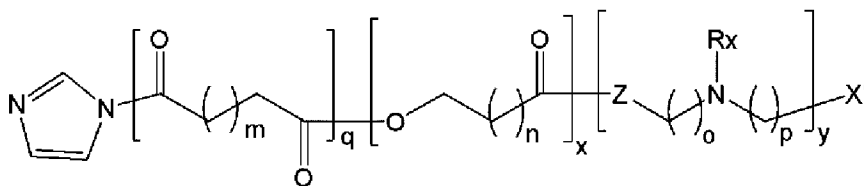
формула IV

В некоторых формах полимер имеет структуру формулы V:



формула V

В некоторых формах полимер имеет структуру формулы VI:



формула VI

где X' представляет собой $-OH$ или $-NHR'$.

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

В. ПЭГ-содержащие блок-сополимеры

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

pH-чувствительные мицеллярные наноносители часто образуются путем самосборки амфифильных блок-сополимеров и состоят из гидрофильной (например, ПЭГ) внешней оболочки и гидрофобного внутреннего ядра, способного реагировать на pH среды. Как правило, при изменении pH среды от нейтрального или слабощелочного до слабокислого ядра мицелл подвергаются ускоренной деградации, становятся полностью растворимыми в воде или существенно набухают в водной среде. В результате мицеллы с инкапсулированным лекарственным средством, с медленной скоростью высвобождения

лекарственного средства, при физиологическом значении pH могут активироваться под действием кислого pH с быстрой «выгрузкой» молекул лекарственного средства. Согласно предшествующим сообщениям полимерные сегменты, составляющие ядра мицелл, включают поли(ортоэфир), поли(β -аминоэфир), поли(L-гистидин) и другие. Основными недостатками большинства предшествующих мицеллярных систем являются многочисленные стадии, необходимые для получения сополимеров, и сложность контроля молекулярной массы полимера и корректировки состава полимера во время синтеза сополимера.

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

Известно, что при захвате мицелл опухолевыми клетками частицы мицелл подвергаются захвату в эндосомах с pH от 5,5 до 6,0 и в лизосомах с pH от 4,5 до 5,0. Как

ясно показывают приведенные выше результаты, такие кислые среды неизбежно вызывают быстрое высвобождение DTX из мицелл из сополимера PEG2K-PPMS, тем самым повышая цитотоксичность мицелл, нагруженных лекарственным средством. Аминогруппы в сополимерах будут функционировать в качестве «протонных губок», облегчая высвобождение из эндосом. Следовательно, pH-чувствительные свойства, проявляемые мицеллами сополимера PEG2K-PPMS, весьма желательны, что делает их превосходными носителями для доставки противоопухолевых препаратов.

С. Способы получения полимеров

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

Д. Частицы, образованные из полимеров

Полимеры можно использовать для получения микро- и/или наночастиц с инкапсулированным в них одним или более терапевтическими, диагностическими или профилактическими средствами. Средство может быть инкапсулировано внутри частицы, диспергировано в полимерной матрице, образующей частицу, ковалентно или нековалентно связано с поверхностью частицы или их комбинации.

Скорость высвобождения можно регулировать, изменяя мономерный состав полимера и/или молекулярную массу полимера и, таким образом, скорость деградации. Например, если основным механизмом деградации является простой гидролиз, то увеличение гидрофобности полимера может замедлить скорость разложения и, следовательно, увеличить период высвобождения. Во всех случаях полимерную композицию выбирают таким образом, чтобы высвобождалось эффективное количество нуклеиновой кислоты (нуклеиновых кислот) для достижения желаемой цели/результата.

Е. Перплексы и мицеллы

Было обнаружено, что способность поликатионных полимеров доставлять гены зависит от множества факторов, включая молекулярную массу полимера, гидрофобность и плотность заряда. Многие синтетические поликатионные материалы были исследованы в качестве векторов для невирусной доставки генов, но почти все они были неэффективными за счет их низкой эффективности или высокой токсичности. Большинство поликатионных векторов, описанных ранее, обладают высокой плотностью заряда, что считается основным требованием для эффективной конденсации ДНК. В результате они способны доставлять гены с высокой эффективностью *in vitro*, но ограничены для применения *in vivo* за счет токсичности, связанной с чрезмерной плотностью заряда.

Высокомолекулярные полимеры, в частности, терполимеры, имеют низкую плотность заряда. Кроме того, их гидрофобностью можно варьировать, выбирая лактоновый сомономер с определенным размером кольца и регулируя содержание лактона

в полимерах. Высокая молекулярная масса и повышенная гидрофобность терполимеров лактон-диэфир-аминодиол компенсируют низкую плотность заряда, обеспечивая эффективную доставку генов с минимальной токсичностью.

В предпочтительных вариантах осуществления терполимеры демонстрируют эффективную доставку генов с пониженной токсичностью. Терполимеры могут быть значительно эффективнее коммерчески доступных невирусных векторов. Например, терполимеры могут быть более чем в 100 раз эффективнее коммерчески доступных невирусных векторов, таких как на основе PEI и LIPOFECTAMINE® 2000, по данным анализа экспрессии люциферазы, проявляя при этом минимальную токсичность в дозах до 0,5 мг/мл по сравнению с этими коммерчески доступными невирусными векторами. Предпочтительно терполимер нетоксичен в концентрациях, подходящих для трансфекции нуклеиновых кислот как *in vitro*, так и *in vivo*. Например, в некоторых вариантах осуществления терполимеры вызывают меньшую неспецифическую гибель клеток по сравнению с другими подходами трансфекции клеток. Предпочтительный терполимер представляет собой терполимер ω -пентадекалактон-диэтилсебацинат-N-метилдиэтаноламин, содержащий 20% PDL (также называемый терполимером III-20% PDL).

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

Было обнаружено, что размер и дзета-потенциал мицелл значительно изменяются при изменении pH водной среды, содержащей мицеллы. Например, тренды кривых зависимости размер-pH и дзета-pH удивительно схожи для мицелл трех сополимеров PEG2K-PPMS с разным содержанием PDL (11%, 30% и 51%). Очевидно, что средний размер образцов мицелл постепенно увеличивается при снижении pH среды от 7,4 до 5,0, и затем остается практически постоянным при значении pH ниже 5,0. Такое поведение мицелл в зависимости от pH ожидается при снижении pH с 7,4 до 5,0, ядра мицелл из PPMS становятся протонированными и более гидрофильными, при этом поглощая больше молекул воды из водной среды, вызывая набухание мицелл. Ядра мицелл полностью протонированы уже при pH 5,0, в результате чего размеры мицелл остаются достаточно постоянными при дальнейшем снижении pH от 5,0. Влияние содержания PDL в сополимерах PEG2K-PPMS на величину изменения размера мицелл между значениями pH 7,4 и 5,0 также является существенным. Ожидается, что с уменьшением содержания PDL и увеличением содержания третичных аминогрупп в сополимере будет увеличиваться

способность ядер мицелл поглощать протоны и молекулы воды. Так, при снижении pH с 7,4 до 5,0 изменение среднего размера мицелл было более значительным для PEG2K-PPMS-11%PDL (от 200 нм до 234 нм) по сравнению с PEG2K-PPMS-30%PDL (от 184 нм до 214 нм) и PEG2K-PPMS-51%PDL (от 163 до 182 нм) (фиг. 5A).

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

Поверхностный заряд частиц/мицелл был слегка отрицательным в растворе PBS (0,01 М, pH=7,4), что выгодно для применения мицелл для доставки лекарственных средств *in vivo*. Известно, что для наночастиц с почти нейтральным поверхностным зарядом (дзета-потенциал от -10 до +10 мВ) может уменьшаться их поглощение ретикулоэндотелиальной системой (RES) и пролонгироваться время их циркуляции в крови. Отрицательные поверхностные заряды мицелл могут быть результатом поглощения анионов HPO_4^{2-} и/или H_2PO_4^- в PBS частицами мицелл за счет взаимодействия водородных связей между анионами и эфирными группами ПЭГ оболочек или аминогруппами ядер PPMS. Полагается, что для мицелл из амфифильного блок-сополимера гидрофильные сегменты цепи (например, ПЭГ) во внешней оболочке мицеллы могут экранировать заряды в ядре

мицелл, при этом блоки с длинной цепью более эффективно снижают дзета-потенциал, чем блоки с короткой цепью. Таким образом, для мицелл сополимера PEG5K-PPMS наблюдались значительно более низкие значения дзета-потенциала по сравнению с мицеллами сополимера PEG2K-PPMS.

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

Г. Терапевтические, профилактические и диагностические средства

Полимеры можно использовать для инкапсулирования, смешивания или ионного или ковалентного связывания с любым из множества терапевтических, профилактических или диагностических средств. Широкий спектр биологически активных веществ может быть инкапсулирован или включен.

Соединения с широким диапазоном молекулярной массы могут быть инкапсулированы, например, от 100 до 500000 г или более на моль. В некоторых формах агент, который необходимо инкапсулировать и доставить, может представлять собой низкомолекулярный агент (т. е. неполимерный агент с молекулярной массой менее 2000, 1500, 1000, 750 или 500 дальтон) или макромолекулу (например, олигомер или полимер), такую как белки, пептиды, нуклеиновые кислоты и т.д. Подходящие низкомолекулярные активные агенты включают органические, неорганические и/или металлоорганические соединения.

Примеры подходящих терапевтических и профилактических средств включают синтетические неорганические и органические соединения, белки и пептиды, полисахариды и другие сахара, липиды и последовательности нуклеиновых кислот ДНК и РНК, обладающие терапевтической, профилактической или диагностической активностью. Последовательности нуклеиновых кислот включают гены, антисмысловые молекулы, которые связываются с комплементарной ДНК для ингибирования транскрипции, и рибозимы. Примеры подходящих веществ включают белки, такие как антитела, лиганды

рецепторов и ферменты, пептиды, такие как пептиды адгезии, сахараиды и полисахариды, синтетические органические или неорганические лекарственные средства и нуклеиновые кислоты. Предпочтительными лекарственными средствами для доставки являются те, которые специфичны для лечения легочного заболевания или расстройства, в частности, ЛГ. Для ЛГ большинство препаратов являются вазодилататорами, что означает, что они приводят к расслаблению клеток гладкой мускулатуры (например, антагонисты эндотелина, аналоги простациклина, ингибиторы фосфодиэстеразы), что, по мнению авторов изобретения, не имеет смысла использовать их в стратегии, нацеленной на макрофаги легких. Лекарственные средства, воздействующие на иммунную систему при ЛГ, кажутся недостаточно используемыми. При COPD аналогичные ингаляционные бронходилататоры приводят к расслаблению SMC дыхательных путей, хотя можно использовать кортикостероиды.

Поскольку результаты показывают удивительную избирательность доставки и поглощения легочными иммунными клетками, эта система доставки особенно хорошо подходит для локальной доставки в легкие, особенно противовирусных препаратов, таких как те, которые используются в лечении вирусных заболеваний, таких как COVID-19, таких заболеваний, как фиброз легких и рак легких. Она также имеет явные преимущества для доставки иммуномодуляторов для лечения хронической обструктивной болезни легких (COPD).

Примеры терапевтических средств, которые могут быть включены в частицы, включают, не ограничиваясь этим, иммуномодулирующие агенты, противомикробные агенты (включая противовирусные или антибиотические агенты), химиотерапевтические препараты, моноклональные антитела или их фрагменты или гуманизированные варианты, ферменты, факторы роста, ингибиторы роста, гормоны, антагонисты гормонов и молекулы нуклеиновых кислот.

Иммуномодулирующие агенты включают противовоспалительные препараты, лиганды, которые связываются с Toll-подобными рецепторами для активации врожденной иммунной системы, молекулы, которые мобилизуют и оптимизируют адаптивную иммунную систему, молекулы, которые активируют или усиливают действие цитотоксических Т-лимфоцитов, естественных клеток-киллеров и хелперных Т-клеток и молекулы, которые дезактивируют или подавляют супрессорные или регуляторные Т-клетки), и агенты, которые способствуют поглощению частиц клетками (включая дендритные клетки и другие антигенпрезентирующие клетки). Примеры иммуномодулирующих агентов включают цитокины, ксантины, интерлейкины, интерфероны, олигонуклеотиды, глюкозы, факторы роста (например, TNF, CSF, GM-CSF и G-CSF), гормоны, такие как эстрогены (диэтилstilбестрол, эстрадиол), андрогены (тестостерон, HALOTESTIN® (флюоксиместерон)), прогестины (MEGACE® (мегестрола ацетат), PROVERA® (медроксипрогестерона ацетат)) и кортикостероиды (преднизолон, дексаметазон, гидрокортизон).

Олигонуклеотидные препараты включают ДНК, РНК, антисмысловые, аптамеры,

малые интерферирующие РНК, рибозимы, внешние направляющие последовательности для рибонуклеазы Р и триплекс-образующие агенты.

Репрезентативные противоопухолевые препараты включают, не ограничиваясь этим, алкилирующие агенты (такие как цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, мехлорэтамин, циклофосфамид, хлорамбуцил, дакарбазин, ломустин, кармустин, прокарбазин, хлорамбуцил и ифосфамид), антиметаболиты (такие как фторурацил (5-FU), гемцитабин, метотрексат, цитозин арабинозид, флударабин и флоксуридин), антимитотические агенты (включая таксаны, такие как паклитаксел и доцетаксел, и алкалоиды барвинка, такие как винкристин, винбластин, винорелбин и виндезин), антрациклины (включая доксорубин, даунорубин, валрубин, идарубин и эпирубин, а также актиномицины, такие как актиномицин D), цитотоксические антибиотики (включая митомицин, пликамицин и блеомицин), ингибиторы топоизомеразы (включая камптотецины, такие как камптотecin, иринотекан и топотекан, а также производные эпиподофиллотоксинов, такие как амсакрин, этопозид, этопозид фосфат и тенипозид), антитела к фактору роста эндотелия сосудов (VEGF), такие как бевацизумаб (AVASTIN®), другие анти-VEGF соединения; талидомид (THALOMID®) и его производные, такие как леналидомид (REVLIMID®); эндостатин; ангиостатин; ингибиторы рецепторной тирозинкиназы (RTK), такие как сунитиниб (SUTENT®); ингибиторы тирозинкиназы, такие как сорафениб (Nexavar®), эрлотиниб (Tarceva®), пазопаниб, акситиниб и лапатиниб; ингибиторы трансформирующего фактора роста- α или трансформирующего фактора роста- β и антитела к рецептору эпидермального фактора роста, такие как панитумумаб (VECTIBIX®) и цетуксимаб (ERBITUX®).

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

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

Репрезентативные диагностические средства включают агенты, детектируемые с помощью рентгеновских лучей, флуоресценции, магнитно-резонансной томографии, радиоактивности, ультразвука, компьютерной томографии (КТ) и позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ). Ультразвуковые контрастные агенты обычно представляют собой газ, такой как воздух, кислород или перфторуглероды. Типичные диагностические агенты включают парамагнитные молекулы, флуоресцентные соединения, магнитные молекулы и радионуклиды, а также агенты для рентгеновской визуализации.

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

Полинуклеотиды

Полимерные частицы можно использовать для трансфекции клеток нуклеиновыми кислотами. Полинуклеотид может кодировать один или более белков, функциональных нуклеиновых кислот или их комбинации. Полинуклеотид может быть моноцистронным или полицистронным. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид является мультигенным.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид трансферируется в клетку и остается внехромосомным. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид вводится в клетку-хозяина и интегрируется в геном клетки-хозяина.

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

Можно использовать ряд экспрессионных систем на основе вирусов, например,

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

Для эффективной трансляции композиций также могут потребоваться специфические иницирующие сигналы. Эти сигналы включают иницирующий кодон ATG и соседние последовательности. Дополнительно могут потребоваться экзогенные сигналы контроля трансляции, включая иницирующий кодон ATG. При эукариотической экспрессии также обычно желательно включить в транскрипционную единицу соответствующий сайт полиаденилирования, если он не содержится в исходном клонированном сегменте. Как правило, сайт добавления поли-А расположен примерно на 30-2000 нуклеотидов «даунстрим» от сайта терминации белка в положении, предшествующем терминации транскрипции.

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

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

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

Полинуклеотид может кодировать один или более представляющих интерес полипептидов.

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

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает селективируемый

маркер, например селектируемый маркер, который эффективен в эукариотической клетке, такой как маркер селекции лекарственной устойчивости. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает репортерный ген.

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

Молекулы функциональных нуклеиновых кислот могут взаимодействовать с любой макромолекулой, такой как ДНК, РНК, полипептиды или углеводные цепи. Таким образом, функциональные нуклеиновые кислоты могут взаимодействовать с мРНК или геномной ДНК полипептида-мишени или они могут взаимодействовать с самим полипептидом. Функциональные нуклеиновые кислоты часто конструируют для взаимодействия с другими нуклеиновыми кислотами на основе гомологии последовательностей между молекулой-мишенью и молекулой функциональной нуклеиновой кислоты. В других ситуациях специфическое распознавание между молекулой функциональной нуклеиновой кислоты и молекулой-мишенью основано не на гомологии последовательностей между молекулой функциональной нуклеиновой кислоты и молекулой-мишенью, а скорее основано на формировании третичной структуры, которая позволяет осуществлять специфическое распознавание.

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

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

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

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

триплекс, связывались с молекулой-мишенью с K_d ниже 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} или 10^{-12} .

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

Экспрессия генов также может эффективно подвергаться сайленсингу высокоспецифическим образом посредством РНК-интерференции (РНКи). Такой сайленсинг первоначально наблюдали при добавлении двухцепочечной РНК (дцРНК) (Fire et al. (1998) *Nature*, 391:806-11; Napoli et al. (1990) *Plant Cell*, 2:279-89; Hannon, (2002) *Nature*, 418:244-51). Как только дцРНК попадает в клетку, она расщепляется ферментом, подобным РНКазе III, Dicer, с образованием двухцепочечных малых интерферирующих РНК (миРНК) длиной 21-23 нуклеотида, которые содержат 2 нуклеотидных выступа на 3'-концах (Elbashir et al. (2001) *Genes Dev.*, 15:188-200; Bernstein et al. (2001) *Nature*, 409:363-6; Hammond et al. (2000) *Nature*, 404:293-6). На АТФ-зависимой стадии миРНК интегрируются в мультисубъединичный белковый комплекс, широко известный как РНК-индуцированный сайленсинговый комплекс (RISC), который направляет миРНК к последовательности РНК-мишени (Nykanen et al. (2001) *Cell*, 107:309-21). На какой-то точке дуплекс миРНК раскручивается, и оказывается, что антисмысловая цепь остается связанной с RISC и направляет деградацию комплементарной последовательности мРНК комбинацией эндо- и экзонуклеаз (Martinez et al. (2002) *Cell*, 110:563-74). Однако эффект иРНК или миРНК или их применения не ограничиваются каким-либо типом механизма.

Малая интерферирующая РНК (миРНК) представляет собой двухцепочечную РНК, которая может индуцировать последовательность-специфический посттранскрипционный сайленсинг генов, тем самым снижая или даже ингибируя экспрессию генов. В одном примере миРНК «запускает» специфическую деградацию гомологичных молекул РНК, таких как мРНК, в области идентичности последовательностей как миРНК, так и РНК-мишени. Например, в WO 02/44321 описаны миРНК, способные к последовательность-специфической деградации мРНК-мишеней при спаривании оснований с 3'-концевыми выступами, включенной в настоящее описание в качестве ссылки для способа получения этих миРНК. Последовательность-специфический сайленсинг генов может быть достигнут в клетках млекопитающих, с использованием синтетических коротких двухцепочечных РНК, которые имитируют миРНК, продуцированные под действием фермента Dicer

(Elbashir et al. (2001) *Nature*, 411:494-498; Ui-Tei et al. (2000) *FEBS Lett.*, 479:79-82). миРНК может быть синтезирована химическим путем или *in vitro*, или может происходить от коротких двухцепочечных шпилечных РНК (кшРНК), которые процессируются в миРНК внутри клетки. Синтетические миРНК обычно конструируют с использованием алгоритмов и обычного синтезатора ДНК/РНК. Поставщики включают Ambion (Austin, Texas), ChemGenes (Ashland, Massachusetts), Dharmacon (Lafayette, Colorado), Glen Research (Sterling, Virginia), MWB Biotech (Eschersberg, Germany), Proligo (Boulder, Colorado) и Qiagen (Venlo, The Netherlands). миРНК также можно синтезировать *in vitro* с использованием таких наборов, как Ambion SILENCER® siRNA Construction.

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

Полинуклеотид может представлять собой ДНК- или РНК- нуклеотиды, которые обычно включают гетероциклическое основание (азотистое основание), сахарную группу, присоединенную к гетероциклическому основанию, и фосфатную группу, которая этерифицирует гидроксильную функциональную группу сахарной группы. Основные встречающиеся в природе нуклеотиды включают урацил, тимин, цитозин, аденин и гуанин в качестве гетероциклических оснований, а также рибозу или дезоксирибозу, связанные фосфодиэфирными связями.

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

Как правило, в аналогах нуклеозидов сохраняются основания, способные образовывать водородные связи посредством спаривания оснований по Уотсону-Крику со обычными полинуклеотидными основаниями, где остов аналога презентует основания таким образом, чтобы сделать возможным образование таких водородных связей

последовательность-специфическим образом между молекулой аналога олигонуклеотида и основаниями в обычном полинуклеотиде (например, одноцепочечная РНК или одноцепочечная ДНК). Предпочтительными аналогами являются такие, которые имеют по существу незаряженный, фосфор-содержащий остов.

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления отрицательно заряженный агент представляет собой отрицательно заряженный полипептид. Например, полипептид может

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

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

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

Г. Композиции

Композиции готовят с использованием фармацевтически приемлемого «носителя», состоящего из веществ, которые считаются безопасными и эффективными, и их можно вводить человеку, не вызывая нежелательных биологических побочных эффектов или нежелательных взаимодействий. «Носителем» являются все компоненты, присутствующие в фармацевтическом составе, кроме активного ингредиента или ингредиентов. Термин «носитель» включает, не ограничиваясь этим, разбавители, связующие вещества, смазывающие вещества, разрыхлители, наполнители и покровные композиции. Подробную информацию о материалах, оборудовании и процессах приготовления таблеток и лекарственных форм с отсроченным высвобождением см. в *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, eds. Lieberman et al. (New York: Marcel Dekker, Inc., 1989) и *Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 6th Ed. (Media, PA: Williams &

Wilkins, 1995).

Предпочтительными композициями для легочной доставки являются фармацевтически приемлемые носители для введения в виде аэрозоля, ингалятора, сухого порошка, интубации и инстилляции.

III. Способы получения частиц и полиплексов

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

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

В одном варианте осуществления загруженные частицы получают объединением раствора полимера, обычно в органическом растворителе, с представляющим интерес полинуклеотидом. Раствор полимера готовят растворением или суспендированием полимера в растворителе. Растворитель следует выбрать таким образом, чтобы он не оказывал неблагоприятного воздействия (например, дестабилизировал или разрушал) инкапсулированную нуклеиновую кислоту. Подходящие растворители включают, не ограничиваясь этим, ДМСО и метиленхлорид. Концентрацию полимера в растворителе можно варьировать по мере необходимости. В некоторых вариантах осуществления концентрация составляет, например, 25 мг/мл. Раствор полимера также может быть разбавлен буфером, например натрий-ацетатным буфером.

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

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

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

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления поликатион представляет собой полиамин. Полиамины представляют собой соединения, имеющие две или более первичных

аминогрупп. Подходящие встречающиеся в природе полиамины включают, не ограничиваясь этим, спермин, спермидин, кадаверин и путресцин. В предпочтительном варианте осуществления полиамин представляет собой спермидин.

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

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

IV. Способы применения частиц/мицелл

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

Композиции вводят в легкие субъекта в терапевтически эффективном количестве. Используемый здесь термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» означает дозу, достаточную для лечения, ингибирования или облегчения одного или более симптомов заболевания, подвергаемого лечению, или для иного обеспечения желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Точная доза будет варьироваться в зависимости от множества факторов, таких как переменные, зависящие от субъекта (например, возраст, состояние иммунной системы и т. д.), заболевание и проводимое лечение.

Примеры

Настоящее изобретение будет дополнительно пояснено со ссылкой на следующие неограничивающие примеры, показывающие, как можно избирательно лечить один или более симптомов легочной гипертензии путем селективного нацеливания ингибитора тромбоцитарного фактора роста с использованием PACE наночастиц.

Патологические характеристики легочной гипертензии («ЛГ»):

мускуляризация дистальных легочных артериол
повышенное артериальное давление в легочной артерии
гипертрофия правого желудочка (RVH)

Тромбоцитарный фактор роста PDGF-B из эндотелиальных клеток важен для патогенеза ЛГ, но роль макрофагов легких и макрофагального PDGF-B при ЛГ четко не определена.

Следующие исследования демонстрируют, что PDGF- β , происходящий из макрофагов легких, играет ключевую роль в патологической экспансии SMC при ЛГ, и что ингибиторы PDGF- β могут быть избирательно доставлены в легочные макрофаги и моноциты для их обработки.

Пример 1: альвеолярные и паренхимные макрофаги легких накапливаются в условиях гипоксии, и их истощение ослабляет мускуляризацию дистальных артериол и легочную гипертензию

Модель ЛГ, при которой мыши дикого типа или трансгенные мыши подвергались гипоксии до 21 суток. Измерения и анализ проводили на легочной ткани, клетках БАЛЖ и сердце. Кроме того, были проведены исследования на свежей цельной крови от пациентов-людей, у которых выделяли первичные моноциты и подвергали дифференцировке в макрофаги, и анализировали содержание РНК в этих клетках, а также оценивали влияние кондиционированной среды из таких культур на миграцию и пролиферацию SMC.

Материалы и методы

Исследования на животных

Мышей получали из лаборатории Джексона. Для исследований использовали мышей C57BL/6 дикого типа и мышей, несущих LysM-Cre (Clausen Transgenic Res. 1999;8(4):265-77; Cowburn, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2016;113(31):8801-6), ROSA26R^(mTmG/mTmG) (Muzumdar M.D., Tasic B., Miyamichi K., Li L. and Luo L. A global double-fluorescent Cre reporter mouse, Genesis, 2007;45(9):593-605), PDGF- $\beta^{(flox/flox)}$ (Enge M. et al., EMBO J., 2002;21(16):4307-16), Vhl^(flox/flox) (Haase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001;98(4):1583-8), Hif1a^(flox/flox) (Ryan. Cancer Res., 2000;60(15):4010-5) или Hif2a^(flox/flox) (Gruber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2007;104 (7):2301-6). Использовали самцов и самок мышей в возрасте 10-16 недель и контролей того же пола и возраста.

Воздействие гипоксии и гемодинамические измерения

Мышей помещали на срок до 21 суток в камеру гипоксии (10% FiO₂), оборудованную контроллером и датчиком кислорода (BioSpherix®). После воздействия гипоксии измеряли RVSP. Затем мышей подвергали эвтаназии с использованием ингаляции изофлураном, и в дополнение к отбору образцов легких отбирали образцы сердца для определения индекса Фултона, который представляет собой отношение массы правого желудочка к сумме массы левого желудочка (LV) и перегородки (S) ((Sheikh Cell Rep., 2014);6(5):809-17). Лаборант, проводивший гемодинамические измерения, не имел информации о группе обработки и генотипе мышей.

Бронхоальвеолярная лаважная жидкость и отбор образцов легких

После эвтаназии PBS перфузировали через RV в легкие. Когда анализировали все легкое, то отбирали как правое, так и левое легкое непосредственно после перфузии. Для сбора БАЛЖ 1 мл PBS вводили через трахею в альвеолы, и затем аспирировали из трахеи. Данную процедуру повторяли один раз, и собранную БАЛЖ объединяли. БАЛЖ центрифугировали при 830 g (центрифуга GS-6R, Beckman Coulter) в течение 10 мин при 4°C и собирали клеточный осадок. Для экспериментов с FACS на резидуальном легком после удаления БАЛЖ правый главный стволочной бронх перевязывали и удаляли правое легкое. Для иммуногистохимии левое легкое наполняли 2% легкоплавкой агарозой и помещали в охлажденный льдом PBS. Когда агароза затвердевала, левое легкое погружали в фиксатор Дента (4:1 метанол:ДМСО) при 4°C на ночь, и на следующий день промывали и хранили в 100% метаноле при -80°C.

Композиция наночастиц и введение

Наночастицы вводили оротрахеально мышам дикого типа. Наночастицы, нагруженные клондронатом или миРНК PDGF- β , вводили в начале гипоксии и затем каждые трое суток в течение 21 суток гипоксии. Мышей, получавших наночастицы, нагруженные красителем DiD, выдерживали в условиях нормоксии в течение 6 ч, и затем подвергали эвтаназии. Для истощения фагоцитов вводили 50 мкл липосом, нагруженных 0,25 мг клондроната или PBS, и растворенных в PBS (Liposoma Research). Для оценки поглощения наночастиц или нокдауна PDGF- β PACE наночастицы, имеющие кислотные концы (поли(пентадекалактон-со-н-метилдиэтаноламинкосебацинат) с 50% лактона (PPMS-50COOH), формулировали с использованием модифицированного метода испарения растворителя из одинарной или двойной эмульсии (Kauffman, Biomacromolecules, 2018;19(9):3861-73). Вкратце, в композиции наночастиц, нагруженных красителем (~200 или ~400 нм в диаметре), использовали 0,2 мас.% DiD (ThermoFisher) к количеству полимера. ДМСО (10 мкл раствора 10 мг/мл) растворяли в 50 мг полимера непосредственно перед приготовлением одинарной эмульсии. Для наночастиц, нагруженных миРНК PDGF- β и скремблированной (Scr) РНК, груз нуклеиновой кислоты (Dharmacon, 50 нМ) растворяли в натрий-ацетатном буфере (25 мМ, pH 5,8) перед тем, как перейти к методу двойной эмульсии. Анализировали параметры наночастиц (стратифицированные по загрузке миPDGF- β или Scr), включая гидродинамический диаметр (404 ± 8 или 386 ± 7 нм), распределение по размерам (PDI; $0,218 \pm 0,004$ или $0,238 \pm 0,007$) и дзета-потенциал ($9,4 \pm 0,3$ или $10,8 \pm 0,5$ мВ) с использованием динамического рассеяния света (Zetasizer Pro, Malvern Panalytical) и эффективность загрузки миРНК ($69,6 \pm 1,2$ или $64,3 \pm 0,5\%$) с использованием анализа QuantIT RiboGreen (ThermoFisher). Наночастицы (0,2 мг) суспендировали в 50 мкл PBS и вводили мышам. Для подтверждения поглощения наночастиц макрофагами в культуре, осадок клеток БАЛЖ ресуспендировали в культуральной среде для мышинных клеток (RPMI [Thermo Scientific], 10% фетальной телячьей сыворотки [FBS; Invitrogen], 5% пенициллина/стрептомицина [Life Technologies]) и инкубировали с наночастицами, содержащими 0,25 мг/мл DiD, в течение 6 ч при 37°C.

Иммуногистохимия

Для иммуногистохимического анализа левые легкие, хранившиеся в 100% метаноле, подвергали дезактивации пероксидазой при инкубации в 5% H_2O_2 /метаноле в течение 15 мин при комнатной температуре, и затем последовательно регидратировали в 75%, 50% и 25% и 0% метаноле в PBS. С использованием вибратома готовили срезы регидратированного легкого толщиной 150 мкм, которые инкубировали в блокирующем буфере для ИHC (5% козья сыворотка в 0,5% Triton X-100/PBS [PBS-T]) при 4°C в течение ночи, и затем окрашивали первичными антителами в блокирующем буфере для ИHC в течение 3 суток при 4°C. Затем срезы трижды промывали в PBS-T, инкубировали со вторичными антителами в блокирующем буфере для ИHC в течение ночи при 4°C, пять раз промывали в PBS-T, помещали на предметные стекла с заливочной средой для микроскопии Dako и хранили при 4°C. Используемые первичные антитела представляли собой крысиные анти-MECA-32 (1:15, Developmental Studies Hybridoma Bank [DSHB]), крысиные анти-CD31-FITC (1:250, BD Biosciences), мышинные анти-CD64-APC (1:250, Biolegend), крысиные анти-CD68-APC (1:50, Miltenyi Biotec) и мышинные анти-SMA-Сy3 клон 1A4 (1:250, Sigma). В качестве вторичного антитела использовали антикрысиное антитело, конъюгированное с Alexa 488 (1:250, Invitrogen). Ядра окрашивали DAPI (1:500).

Визуализация

Изображения окрашенных срезов получали с помощью конфокальных микроскопов (PerkinElmer UltraView VOX spinning disc или Leica SP8 point scanning). Для обработки изображений использовали программное обеспечение Adobe Photoshop. Для анализа дистальной мускуляризации сфокусировались на двух специфических ложах артериол в левом легком, ранее описанных и обозначенных как L.L1.A1.L1 и L.L1.A1.M1 (Sheikh, 2014; Sheikh, 2015). Их название происходит от ближайших дыхательных путей, которые имеют стереотипный рисунок ветвления у взрослых мышей (Sheikh et al., Cell Rep., 2014; 6(5):809-17, Metzger, Nature, 2008;453(7196):745-50). В зависимости от их диаметра и характера ветвления легочные артериолы классифицируются как проксимальные (P; диаметр >75 мкм), медиальные (M; от 25 до 75 мкм) и дистальные (D; <25 мкм) и называются L, левый главный бронх; L1, L2, L3, боковые ветви; медиальные ветви M1, M2; передние ветви A1, A2.

Исследования с участием человека

Все процедуры с участием людей были одобрены Институциональным наблюдательным советом по клиническим исследованиям Йельского университета (IRB № 1307012431 и № 1005006865), и авторы изобретения соблюдали все соответствующие этические нормы. Перед включением в исследование у всех участников было получено письменное информированное согласие.

Выделение моноцитов человека и дифференцировка в макрофаги

Свежая цельная кровь от пациентов с ИЛАГ и ССК-ЛАГ из клиники легочных сосудистых заболеваний Медицинской школы Йельского университета и контрольных здоровых субъектов была предоставлена в лабораторию Greif в виде

неидентифицированных образцов. Моноциты выделяли и подвергали дифференцировке в макрофаги на основе методов, описанных ранее (Bennett J., *Exp. Med.*, 1966; 123(1):145-60; Karlsson et al, *Exp. Hematol.*, 2008;36(9):1167-75). Вкратце, свежую цельную кровь разводили в 3 раза HBSS, загружали на колонку Ficoll-Histopaque (Fisher Scientific) и центрифугировали в течение 30 мин при 830 g. Мононуклеарную фракцию периферической крови аспирировали, разбавляли в 3 раза HBSS и центрифугировали в течение 10 мин при 830 g. Для обеспечения удаления тромбоцитов осадок ресуспендировали в 3 мл HBSS и центрифугировали еще 10 мин при 830 g. Затем осадок ресуспендировали в RPMI с 10% FBS, и клеткам давали возможность адгезировать к пластиковой чашке для культивирования клеток в течение 1 ч при 37°C. Моноциты преимущественно адгезируют к пластику (37) (фиг. S6A, B). Плавающие клетки отбрасывали, и адгезировавшие клетки промывали PBS или инкубировали с 5 mM ЭДТА в PBS в течение 10 мин и собирали для окрашивания и анализа проточной цитометрией, либо культивировали в среде для дифференцировки макрофагов (среда для макрофагов ImmunoCult™-SF и 1 нг/мл макрофагального колониестимулирующего фактора [оба от StemCell Technologies]). Среду заменяли свежей средой для дифференцировки макрофагов на четвертый сутки. На сутки 6 среду заменяли на среду для макрофагов ImmunoCult™-SF, и через 12 ч собирали кондиционированную среду и собирали клетки. Для исследований с гипоксией макрофаги, полученные из моноцитов здоровых доноров, подвергались воздействию либо нормоксии, либо 3% O₂ в течение 12 ч в RPMI с добавлением 1% FBS и 5% пенициллина-стрептомицина.

Культивирование hPASMC и анализ пролиферации

hPASMC (Американская коллекция типовых культур) культивировали до пассажа 6 в среде M199 с добавлением 10% FBS, 1% пенициллина/стрептомицина, 2 нг/мл фактора роста фибробластов (Promega), 3 нг/мл эпидермального фактора роста (Promega). Пролиферацию оценивали, как описано ранее, с небольшими модификациями (Dave J., *Dev. Cell*, 2018; 44(6):665-78 e6). hPASMC обрабатывали трипсином и культивировали в течение ночи на культуральных предметных стеклах (BD Falcon), предварительно покрытых фибронектином (10 мкг/мл в PBS). На следующие сутки клетки промывали PBS и выдерживали в течение ночи без сыворотки в M199 с добавлением 0,5% FBS. Затем клетки промывали в PBS и культивировали в течение 24 ч в среде, кондиционированной макрофагами, полученными от контрольных субъектов, или макрофагами, полученными от пациентов, которые были или не были предварительно обработаны 20 мкг/мл контрольного IgG или блокирующего анти-PDGF-B антитела (R&D Systems) в течение 1 ч при 37°C. В течение последних 10 ч этой инкубации к клеткам добавляли 10 мкг/мл BrdU (Sigma). Срезы фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 30 мин, промывали в 0,3% Трис, 1,5% глицина в воде в течение 15 мин, инкубировали в 2 N HCl в течение 30 мин при 37°C, промывали 0,1 M борной кислотой и затем инкубировали в 1% FBS в PBS-T в течение 1 ч. hPASMC окрашивали крысиным первичным анти-BrdU антителом (1:100, BioRad) в 1% FBS в PBS-T в течение 1 ч, трижды промывали 0,5% Твином 20 в PBS, и затем

инкубировали с козьим антикрысиным вторичным антителом, конъюгированным с Alexa 488 (1:500, Molecular Probes) и PI (1:500, Sigma) в 1% FBS в PBS-T в течение 1 ч. Наконец, срезы трижды промывали 0,5% Твином 20 в PBS и помещали на предметные стекла с использованием флуоресцентной заливочной среды (Dako). Пролиферацию рассчитывали как процент от общего количества PI⁺ hPASC, которые были BrdU⁺. Для каждого контрольного субъекта или пациента оценивали не менее 10 полей зрения.

Анализ миграции SMC

Миграцию клеток оценивали по методу Dave, Dev. Cell, 2018;44(6):665-78 e6. Вкратце, hPASC трипсинизировали и немедленно помещали в верхнюю часть поликарбонатных мембран камеры Бойдена (Corning Costar, поры 8 мкм). Нижний отсек камеры Бойдена содержал среду, кондиционированную макрофагами контрольных субъектов и макрофагами, полученными от пациентов, которые были или не были предварительно обработаны 20 мкг/мл блокирующего анти-PDGF-В антитела или контрольного IgG в течение 1 ч при 37°C. hPASC давали возможность мигрировать в течение 8 ч в нижнюю камеру, после чего мембрану фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 30 мин, окрашивали 0,1% кристаллическим фиолетовым и промывали водой. С верхней поверхности мембраны ватным тампоном удаляли немигрировавшие клетки, и клетки на нижней поверхности (т.е. мигрировавшие клетки) визуализировали и подсчитывали.

Статистика

Все данные представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение. Критерий Стьюдента (непарный, двусторонний) и однофакторный дисперсионный анализ использовали для сравнения средних значений двух групп и нескольких групп соответственно (программное обеспечение GraPad Prism). Порог статистической значимости был установлен на уровне $p \leq 0,05$. Все тесты предполагали нормальное распределение.

Результаты

На фиг. 1A-1, на которых представлены полученные результаты, показано, что альвеолярные и резидуальные паренхимные макрофаги легких, клетки CD64⁺Ly6G⁺, накапливаются в условиях гипоксии.

Как показано на фиг. 2A-2B, аналогичным образом наблюдается увеличение мРНК PDGF- β , которое достигает максимума на уровне ~6 и ~9-кратного увеличения для альвеолярных и резидуальных макрофагов легких, соответственно.

На фиг. 2C-2F показано, что истощение макрофагов ослабляет мускуляризацию, систолическое давление в правом желудочке, а также гипертрофию правого желудочка у животных, подвергшихся воздействию гипоксии.

Мышей LysM-Cre с аллелями floxed использовали для делеции специфических генов в миелоидных клетках. После 21 суток гипоксии мыши с миелоидными клетками, истощенными по PDGF- β или индуцируемому гипоксией фактору 2a, защищены от мускуляризации дистальных артериол и легочной гипертензии. Как показано на фиг. 3A-

3D, ген фон Гиппеля-Линдау играет ключевую роль в деградации факторов, индуцированных гипоксией, и результаты показывают, что делеция гена фон Гиппеля-Линдау в миелоидной ткани приводит к мускуляризации дистальных артериол и ЛГ при нормоксии.

Как показано на фиг. 4A-4F, фиг. 5A-5F и фиг. 7A-7F, оценивали эффект фармакологической негативной регуляции PDGF- β в макрофагах легких посредством доставки наночастиц, нагруженных миРНК PDGF- β . В бронхоальвеолярной жидкости легких миРНК PDGF- β снижает уровень PDGF- β на 90%. Эти наночастицы с миРНК PDGF- β ослабляют вызванную гипоксией мускуляризацию дистальных легочных артериол, легочную гипертензию и гипертрофию правого желудочка.

Наконец, на фиг. 6A-6E, на которых приведены результаты оценки клинической значимости настоящей работы, были исследованы макрофаги и SMC человека. Первоначально в макрофагах здоровых доноров наблюдалось 2,5-кратное увеличение уровня транскриптов PDGF- β при воздействии гипоксии (фиг. 6A-6B). Кроме того, уровни PDGF- β в макрофагах у пациентов с легочной гипертензией идиопатической этиологии или склеродермией были повышены в 5 и 10 раз соответственно. См. фиг. 6C-6D. Также, среда, кондиционированная макрофагами пациента, увеличивала пролиферацию SMC в ~6 раз. Кроме того, предварительная обработка кондиционированной средой от пациентов с ЛГ блокирующим анти-PDGF-B антителом ингибировала пролиферацию этих SMC. См. фиг. 6E. Аналогично кондиционированная среда от пациентов с ЛГ индуцировала миграцию SMC примерно в 4 раза, и предварительная обработка анти-PDGF-B снижала этот эффект примерно на 50%.

На фиг. 8 представлено схематическое изображение методов, использованных в настоящем документе для исследований на мышах и с участием людей.

В совокупности исследования на экспериментальной модели, а также с клетками, выделенными у пациентов с легочной гипертензией, демонстрируют, что фактор, индуцируемый гипоксией макрофагов, и PDGF-B играют важную роль в SMC, ремоделировании правого желудочка и ЛГ. Кроме того, опосредованный наночастицами сайленсинг PDGF- β в макрофагах легких является терапевтическим средством. Иммуногистохимический анализ дистальной мускуляризации в исследованиях, описанных в настоящем документе, был сфокусирован на определенных ложах легочных артериол, прилегающих к идентифицированным ветвям дыхательных путей: левый бронх-первая боковая вторичная ветвь-первая передняя ветвь- первая латеральная или первая медиальная ветвь (L.L1.A1.L1 или L.L1.A1.M1). В нормоксических условиях дистальные артериолы в этих ложах являются немускуляризованными, но подвергаются стереотипному процессу мускуляризации при воздействии гипоксии (Sheikh, Cell Rep., 2014; 6(5):809-17; Sheikh, Sci. Transl. Med., 2015; 7(308):308ra159; Sheikh, Cell Rep., 2018; 23(4):1152-65).

В дополнение к развитию мускуляризации дистальных артериол и легочной гипертензии в легких мышей, подвергшихся воздействию гипоксии, накапливаются избыточные макрофаги (Amsellem, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 2017; 56(5):597-60818,

Stenmark, *Circ. Res.*, 2006;99(7):675-91; Rabinovitch, *Annu. Rev. Pathol.*, 2007;2:369-99) (фиг. 1A-1C). Определена динамика накопления макрофагов в легких при ЛГ у мышей дикого типа, находящихся в условиях гипоксии (FiO_2 10%), до 21 суток. Легочные сосуды промывали, и затем с помощью проточной цитометрии $\text{CD64}^+\text{Ly6G}^-$ макрофаги выделяли из жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛЖ) и из резидуального легкого после БАЛЖ. Процент макрофагов в БАЛЖ постепенно увеличивается, достигая статистической значимости на сутки 21 гипоксии по сравнению с нормоксией. Напротив, макрофаги из резидуального легкого увеличиваются в $2,9 \pm 0,5$ раза на сутки 3 день гипоксии и в $10,8 \pm 1,1$ раза на сутки 21 гипоксии.

Оценивали влияние истощения альвеолярных и резидуальных макрофагов с использованием клодроната на индуцированную гипоксией дистальную мускуляризацию и легочную гипертензию. Липосомы, нагруженные клодронатом или фосфатно-солевым буфером (PBS), используемым в качестве контроля, вводили оротрахеально мышам дикого типа в начале гипоксии и два раза в неделю в течение последующих 21 суток гипоксии для истощения фагоцитов. У мышей, получавших клодронат, наблюдали ослабление индуцированной гипоксией дистальной мускуляризации, систолического давления в правом желудочке (RVSP; эквивалентно систолическому давлению в легочной артерии) и RVH, измеренных с помощью индекса Фултона (т. е. отношение массы правого желудочка [RV] к сумме массы левого желудочка [LV] и перегородки [S]). По сравнению с контрольными липосомами обработка липосомами, нагруженными клодронатом, снижала количество макрофагов примерно на 50% в БАЛЖ и примерно на 65% в резидуальном легком (фиг. 1E, 1F). В исходных условиях взрослое легкое имеет очень редкие миофибробласты, но было показано, что гипоксия вызывает заметное увеличение количества этих клеток (Sheikh, *Cell Rep.*, 2014;6(5):809-17, Chen, *J. Appl. Physiol.*, (1985) 2006;100(2):564-71). Истощение миелоидных клеток заметно ингибирует индуцированное гипоксией накопление альвеолярных миофибробластов.

PDGF- β макрофагов легких подвергается положительной регуляции при гипоксии, и делеция PDGF- β в линии дифференцировки LysM-Cre ослабляет легочную гипертензию

Воздействие гипоксии на мышей увеличивает уровни PDGF-B во всем легком и в частности в ES легких (Sheikh, 2015; Sheikh, 2018); однако не весь PDGF- β в легких происходит из ES. Таким образом, рассчитывали динамику экспрессии PDGF- β в $\text{CD64}^+\text{Ly6G}^-$ макрофагах, выделенных с помощью FACS из БАЛЖ и резидуального легкого мышей, подвергшихся гипоксии до 21 суток. Уровень мРНК PDGF- β , измеренный с помощью кОТ-ПЦР, по сравнению с нормоксией повышался в течение одних суток гипоксии и достигал максимума на сутки 3 на уровне $5,6 \pm 0,2$ и $9,3 \pm 0,2$ -кратного повышения для БАЛЖ и резидуального легкого соответственно (фиг. 2A, 2B). Для дополнительного подтверждения положительной регуляции PDGF- β в моноцитах/макрофагах использовали LysM-Cre, который маркирует эту популяцию. Мышей LysM-Cre, ROSA26R^(mTmG/mTmG) подвергали гипоксии в течение 21 суток или содержали в условиях нормоксии, и затем

GFP⁺ клетки выделяли с использованием FACS из цельного легкого. Уровень мРНК PDGF- β повышался в $2,1 \pm 0,4$ раза в клетках, выделенных от мышей, подвергшихся гипоксии. Аналогично, GFP⁺ клетки, выделенные от БАЛЖ мышей, находящихся в нормоксических условиях, имели одинаково повышенные уровни мРНК PDGF- β при культивировании в условиях гипоксии (3% O₂), в отличие от нормоксических условий.

Затем оценивали, насколько PDGF- β , происходящий из моноцитов/макрофагов, способствует развитию гипоксия-индуцированной ЛГ. Ранее было обнаружено, что обработка тамоксифеном мышей Csflr-Mer-iCre-Mer, PDGF- $\beta^{(flox/flox)}$ умеренно ослабляет патологическую мускуляризацию дистальных легочных артериол (Sheik, 2018), но влияние на ЛГ, RVH и накопление миофибробластов не изучалось. Индуцибельный Csflr-Cre является по существу неэффективным в индукции рекомбинации (Qian Nature, 2011; 475(7355):222-5; Epelman, Immunity, 2014; 40(1):91-104), и в данном случае, чтобы обойти эту неэффективность, использовали конститутивный LysM-Cre для делеции PDGF- β (фиг. S3A). На генетическом фоне PDGF- $\beta^{(flox/flox)}$ мыши, также несущие LysM-Cre, имеют ослабленную мускуляризацию дистальных артериол и ЛГ при 21-суточном воздействии гипоксии по сравнению с мышами без Cre (фиг. 2C, 2D). При сравнении индекса Фултона у мышей LysM-Cre, PDGF- $\beta^{(flox/flox)}$ и у мышей PDGF- $\beta^{(flox/flox)}$ отмечена тенденция к его снижению при гипоксии и к его увеличению при нормоксии, но эти различия не достигают статистической значимости (фиг. 2E). Однако, когда различия индекса Фултона между значениями при гипоксии и нормоксии были стратифицированы по генотипу, то наблюдалось значительное снижение этой разницы на $46 \pm 7\%$ для мышей LysM-Cre, PDGF- $\beta^{(flox/flox)}$ (фиг. 2F). Наконец, при делеции PDGF- β миелоидных клеток, миофибробласты уменьшались примерно на 60% как на сутки 3, так и на сутки 21 гипоксии (фиг. 2G, H, S4A, B). Таким образом, PDGF- β , происходящий из миелоидных клеток, играет важную роль в индуцированном гипоксией remodelировании легочных сосудов и ЛГ.

LysM-Cre-опосредованная делеция гена фон-Хиппеля-Линдау индуцирует экспрессию PDGF- β и remodelирование легочных сосудов при нормоксии

Учитывая критическую роль PDGF- β , происходящего из миелоидных клеток, в патогенезе легочной гипертензии, были исследованы механизмы, лежащие в основе индуцированной гипоксией экспрессии PDGF- β этим типом клеток. Индуцируемые гипоксией факторы (HIF) представляют собой гетеродимеры изоформы HIF1- β и HIF α , либо HIF1- α , либо HIF2- α . У мышей, подвергшихся гипоксии, ЕС HIF регулирует автономную клеточную экспрессию PDGF- β , а также мускуляризацию дистальных артериол и ЛГ. Используя кислород в качестве субстрата, HIF α подвергается гидроксилированию пролина, модификации, которая облегчает связывание с убиквитинлигазой фон-Хиппеля-Линдау (VHL)-E3 и, в конечном счете, протеосомо-опосредованную деградацию. То есть, HIF α накапливается при недостатке кислорода или когда соответствующий путь убиквитинирования-деградации ингибируется, например, в результате делеции Vhl. В нормоксических условиях по сравнению с мышами Vhl^(flox/flox) у мышей LysM-Cre, Vhl^(flox/flox) снижен уровень Vhl и повышены уровни Hif1a, Hif2a и PDGF-

β в клетках БАЛЖ (фиг. 3А, S3D-F)). Кроме того, делеция *Vhl* в миелоидных клетках индуцирует мускуляризацию дистальных артериол, ЛГ и RVH при нормоксии (фиг. 3В-3С), а также накопление легочных макрофагов (фиг. 3D).

Затем оценивали, насколько делеция *Vhl* потенцирует эффекты относительно короткого (7 суток) воздействия гипоксии. На данную временную точку у мышей *Vhl*^(flox/flox), несущих *LysM-Cre*, уровни мРНК PDGF- β в клетках БАЛЖ значительно повышались в $7,6 \pm 1,2$ раза по сравнению с мышами, лишенными *Cre*. Кроме того, делеция *Vhl* в *LysM*⁺ клетках индуцирует заметно усиленную мускуляризацию дистальных артериол, а также увеличение RVSP и RVH после кратковременного воздействия гипоксии.

HIF α миелоидных клеток регулирует экспрессию PDGF- β и индуцированную гипоксией мускуляризацию дистальных артериол, RVH и ЛГ

Для дополнения экспериментов, в которых был делецирован *Vhl* и, таким образом, индуцирован путь HIF, проводили исследования, в которых делеции подвергались *Hif1 α* или *Hif2 α* в *LysM*⁺ клетках. Во-первых, временной ход воздействия гипоксии на мышей дикого типа выявил повышенную регуляцию HIF1- α и HIF2- α в клетках БАЛЖ на сутки 3 гипоксии (фиг. 4А, 5А). На данную временную точку мыши с генетическим фоном *Hif1 α* ^(flox/flox) или *Hif2 α* ^(flox/flox), а также несущие *LysM-Cre*, имели пониженные уровни PDGF- β и либо *Hif1 α* , либо *Hif2 α* , соответственно, в клетках БАЛЖ по сравнению с мышами, у которых отсутствует *Cre* (фиг. 4В, 5В). Кроме того, накопление в легочных клетках, экспрессирующих маркер макрофагов CD64, и миофибробластов существенно снижается при делеции *Hif1 α* или *Hif2 α* (фиг. 4С-4D, 5С-5D). Более того, анализ на сутки 21 гипоксии показал, что мыши *LysM-Cre*, несущие *Hif1 α* ^(flox/flox) или *Hif2 α* ^(flox/flox), имеют пониженную мускуляризацию дистальных легочных артериол, RVSP и индекса Фултона (фиг. 4Е-4F, 5Е-5F). Таким образом, совмещая эксперименты с делецией PDGF- β , *Vhl*, *Hif1 α* и *Hif2 α* , результаты позволяют предположить, что экспрессия PDGF- β миелоидными клетками модулируется клеточно-автономно обеими изоформами HIF α и является ключевым фактором, регулирующим ремоделирование легочных сосудов и ЛГ.

PDGF- β , происходящий из макрофагов, повышается у пациентов с ЛАГ и индуцирует пролиферацию и миграцию SMC

Учитывая заметную роль макрофагов и миелоидного PDGF- β в патологической мускуляризации легких у мышей, затем авторы изобретения попытались экстраполировать эти результаты на пациентов-людей с ЛАГ. Первоначально анализировали уровни PDGF- β в макрофагах человека. Фракцию мононуклеарных клеток периферической крови выделяли из свежей цельной крови контрольных субъектов центрифугированием на колонке Ficoll и обогащали моноцитами путем адгезии к пластику. Адгезировавшие клетки инкубировали с макрофагальным колониестимулирующим фактором для их дифференцировки в макрофаги, и воздействие на макрофаги гипоксии (3% O₂) в отличие от нормоксии в течение 12 ч вызывало $2,6 \pm 0,6$ -кратное увеличение уровней транскриптов PDGF- β (фиг. 6А). В качестве убедительного доказательства клинической значимости этой работы, уровни PDGF- β в макрофагах, дифференцированных из циркулирующих моноцитов от пациентов

с ИЛАГ и ССК-ЛАГ, были повышены в $5,1 \pm 1,8$ и $10,7 \pm 4,8$ раза, соответственно, по сравнению с контрольными субъектами (фиг. 6B).

Оценивали влияние среды, кондиционированной макрофагами от пациентов с ЛАГ, на пролиферацию hPASC и роль PDGF- β в этой среде. hPASC культивировали в течение 24 ч в среде, кондиционированной вновь дифференцированными макрофагами, и в последние 10 ч этой инкубации добавляли BrdU. Определяли процент клеток (йодид пропидия [PI]⁺-ядер), которые были пролиферативными (т.е. BrdU⁺) по сравнению с контролем (фиг. 6C). Для среды, кондиционированной макрофагами, полученными от пациентов с ИЛАГ и ССК-ЛАГ, наблюдали относительное увеличение пролиферации hPASC в $4,6 \pm 0,3$ и $7,0 \pm 1,9$ раза соответственно. Для оценки вклада PDGF-B в эти эффекты, среду, кондиционированную макрофагами, инкубировали с блокирующим анти-PDGF- β антителом или контрольным IgG в течение 1 ч перед добавлением к hPASC. Для макрофагов, полученных от контрольных субъектов, пролиферация hPASC не изменялась при предварительной обработке анти-PDGF- β , тогда как эта предварительная обработка достоверно ингибировала пролиферацию hPASC, индуцированную средой, кондиционированной макрофагами от пациентов с ИЛАГ или ССК-ЛАГ (фиг. 6D).

Затем аналогичный подход использовали для исследования влияния среды, кондиционированной макрофагами, и PDGF-B в ней на миграцию hPASC. Миграцию hPASC из верхней части камеры Бойдена в нижнюю часть, содержащую предварительно обработанную кондиционированную среду, аналогично как в исследованиях пролиферации, оценивали с использованием анти-PDGF-B антитела или контрольного IgG. При предварительной обработке контрольным IgG кондиционированная среда из макрофагов пациентов с ИЛАГ или ССК-ЛАГ индуцировала миграцию по сравнению с контрольными макрофагами в $3,0 \pm 0,8$ или $4,2 \pm 0,8$ раза соответственно. Кроме того, по сравнению с предварительной обработкой IgG, предварительная обработка анти-PDGF-B снижала миграцию hPASC в среде, кондиционированной макрофагами от пациентов с ИЛАГ или ССК-ЛАГ, примерно на 40-50%. Напротив, предварительная обработка PDGF-B кондиционированной средой от контрольных субъектов не влияла на миграцию hPASC.

Доставка наночастиц с миPDGF- β ослабляет индуцированную гипоксией ЛГ

После демонстрации значения миелоидного PDGF- β при экспериментальной ЛГ и индуктивных эффектов PDGF- β из макрофагов пациентов с ЛАГ на hPASCs, данный лиганд в макрофагах легких был подвергнут фармакологической негативной регуляции посредством доставки наночастиц, образованных из сополимера полиамина и сложного полиэфира [PAC] и миРНК PDGF- β . В предыдущих исследованиях было показано, что подобные наночастицы способны к устойчивому сайленсингу экспрессии белка в клетках, интернализирующих частицы. Во-первых, мышам дикого типа оротрахеально вводили наночастицы диаметром 400 или 200 нм, состоящие из поли(пентадекалактон-со-н-метилдиэтаноламинкосебацината) с 50% лактоном (PPMS-50COOH), нагруженных красителем DiD, и через 12 ч для оценки поглощения клетками легких, экспрессирующими макрофагальный маркер CD64, использовали анализ проточной цитометрией (фиг. 7A).

При ведении наночастиц диаметром 400 и 200 нм подавляющее большинство CD64⁺ клеток становилось мечеными DiD (>99% в БАЛЖ и примерно 92% в резидуальном легком. Аналогично, процент DiD-меченых клеток, которые были CD64⁺, был высоким и эквивалентен для частиц с диаметром 400 и 200 нм (95±1% и 93±3% соответственно) в БАЛЖ; однако, в резидуальном легком эти процентные значения составляли 86±1% для частиц с диаметром 400 нм и снижались до 62±1% для частиц с диаметром 200 нм (фиг. 7C). Таким образом, все дальнейшие эксперименты проводили с наночастицами диаметром 400 нм. Для подтверждения поглощения, выделенные клетки БАЛЖ культивировали с DiD-нагруженными наночастицами в течение 6 ч, и эти клетки демонстрировали перинуклеарную флуоресценцию.

Затем оценивали, насколько наночастицы, нагруженные миРНК, нацеленной на PDGF-β, снижают эффекты воздействия гипоксии на легкое мыши. Использовали олигонуклеотид миРНК PDGF-β, который при трансфекции в клетки БАЛЖ снижал уровни PDGF-β на 91±1% по сравнению с обработкой Scr РНК. Наночастицы, нагруженные этими миPDGF-β или Scr РНК, вводили оротрахеально в начале гипоксии и дважды в неделю в течение 21 суток воздействия гипоксии. На сутки 3 или 21 гипоксии процент клеток во всем легком, которые представляли собой CD64⁺LysG⁺ макрофаги, не различался между мышами, получавшими наночастицы двух типов (фиг. 7B-7C). Влияние миPDGF-β-наночастиц на уровни РНК PDGF-β макрофагов на сутки 3, затем определяли по времени наступления максимальных уровней PDGF-β (см. фиг. 2A, 2B). Наночастицы, нагруженные миPDGF-β, снижали уровни PDGF-β в макрофагах легких на 86±11% (фиг. 7C). Наконец, обработка миPDGF-β-наночастицами во время 21-суточного воздействия гипоксии заметно ослабляла мускуляризацию дистальных легочных артериол, ЛГ, RVH и накопление миофибробластов (фиг. 7D-F).

Обсуждение

Экспансия линии дифференцировки SMC все чаще признается ключевым фактором при различных сердечно-сосудистых заболеваниях; однако в этих патологических контекстах, а также во время нормального развития сосудов понимание не клеточной автономной регуляции SMC типами клеток за пределами ЕС является зачаточным. Фагоциты, в том числе макрофаги, играют фундаментальную роль как во врожденной иммунной системе, так и в патогенезе различных сердечно-сосудистых заболеваний, включая ЛГ. Во время эмбрионального периода развития предшественники эмбриональных макрофагов рекрутируются в нормальное легкое и дифференцируются в макрофаги, и затем эти резидентные макрофаги поддерживаются за счет локальной пролиферации. Напротив, при легочной гипертензии в легочной сосудистой и периваскулярной областях обнаруживается повышенное количество моноцитов, что приводит к образованию легочных макрофагов. Хотя сосудистые SMC и легочные макрофаги, несомненно, являются важными типами клеток при ЛГ, критический нерешенный вопрос заключается в том, насколько и каким образом легочные макрофаги регулируют SMC в этом контексте. В данном случае исследования авторов изобретения с мышинными моделями ЛГ и

макрофагами человека от пациентов с ИЛАГ и ССК-ЛАГ демонстрируют, что PDGF- β , происходящий из макрофагов, индуцирует патологическую экспансию SMC и развитие ЛГ, и, таким образом, определяют PDGF- β , происходящий из макрофагов, в качестве ключевого фактора в этой парадигме. Более того, полученные результаты авторов изобретения с мРНК PDGF- β в наночастицах, выдвинули интригующий терапевтический подход.

Ранее было показано, что интратрахеально введенные клодронат-содержащие липосомы приводят к истощению альвеолярных макрофагов и снижению индуцированной гипоксией ЛГ и RVH у крыс. В данном случае авторы изобретения показали, что такая обработка мышей снижает количество макрофагов в резидуальном легком, а также в БАЛЖ, а также ослабляет мускуляризацию дистальных альвеол и гемодинамические изменения (фиг. 1). Хотя данный подход полезен в краткосрочной перспективе, хроническое истощение макрофагов невозможно, учитывая их неотъемлемую роль во врожденном иммунитете. Таким образом, предпочтительной стратегией является нацеливание на специфические генные продукты, происходящие из макрофагов.

В соответствии с этим, PDGF широко вовлечен в патогенез легочной гипертензии. При ИЛАГ человека уровни мРНК лигандов PDGFA, PDGF-B и рецепторов PDGFRA и PDGFRB повышены в мелких легочных сосудах, и уровень белка PDGF- β повышен в лизатах целых легких. Мыши с нокином мутантного *Pdgfrb*, кодирующего белок, дефектный в опосредовании даунстрим передачи сигналов PI3K и PLC- γ , имеют ослабленное индуцированное гипоксией ремоделирование легочных сосудов, ЛГ и RVH. На модели эмбриона ягненка, у которой ЛГ индуцируется внутриутробной частичной перевязкой артериального протока, инфузия анти-PDGF-B аптамера в легочную артерию снижает тяжесть ремоделирования легочных сосудов наполовину и RVH на две трети. Более того, у мышей с глобальным PDGF- $\beta^{(+/-)}$ отсутствуют индуцированные гипоксией SMC дистальных легочных артериол, тогда как ЕС-специфическая делеция PDGF- β снижается, но не полностью предотвращает дистальную мускуляризацию. В данном случае авторы изобретения показали, что при воздействии гипоксии на мышей экспрессия PDGF- β альвеолярными и резидуальными легочными макрофагами заметно повышается (при гипоксии на сутки 3), и у мышей *LysM-Cre*, PDGF- $\beta^{(flox/flox)}$ существенно ослабляется мускуляризация дистальных артериол и ЛГ. Интересно, что у этих мышей, подвергшихся воздействию гипоксии, наблюдается тенденция к снижению RVH, но она не достигает статистической значимости, вероятно, за счет тенденции к увеличению соотношения массы RV при нормоксии у этих мутантов. Действительно, индуцированное гипоксией увеличение RVH, стратифицированное по генотипу, уменьшается примерно на 50% при делеции PDGF- β . Объяснение тенденции к увеличению соотношения массы RV в исходных условиях неясно, но авторы изобретения предполагают, что PDGF- β , происходящий из миелоидных клеток, может ограничивать массу RV во время нормального развития и/или поддержания.

Эти данные указывают на то, что PDGF-B, происходящий из макрофагов легких, играет важную роль при ЛГ; однако регуляция экспрессии PDGF-B в клетках этого типа

плохо изучена. При воздействии на мышей гипоксии ЕС легких увеличивают уровни PDGF- β зависимым от HIF1- α образом, и в данном случае было обнаружено, что делеция Hif1a или Hif2a миелоидных клеток снижает уровни PDGF- β в макрофагах легких по сравнению с контрольными мышами. Данные показывают, что делеция Hif1a в миелоидных клетках является защитной от ЛГ, индуцированной гипоксией. Кроме того, мыши LysM-Cre, Hif2a^(flox/flox) защищены от Schistosoma-индуцированной легочной гипертензии, и результаты показывают, что у этих мышей аналогичным образом наблюдается ослабленная легочная гипертензия, индуцированная гипоксией. Результаты дополнительных исследований с мутацией приобретения функции HIF (т.е. миелоидная делеция Vhl) дают основание предположить, что HIF макрофагов легких достаточен для индукции клеточной автономной экспрессии PDGF- β , дистальной мускуляризации, ЛГ и RVH в нормоксических условиях (Fig. 3). Таким образом, полагается, что HIF-индуцированный PDGF- β в макрофагах является неотъемлемой частью ответной реакции на гипоксию, проявляющуюся в ремоделировании сосудов и гемодинамических изменениях.

Эти результаты показывают, что, подобно мускуляризации дистальных артериол, макрофаги легких вызывают накопление альвеолярных миофибробластов в легком при гипоксии (фиг. 1), и миелоидные PDGF- β , Hif1a и Hif2a имеют решающее значение для данного процесса (фиг. 2, 4, 5). Легочные миофибробласты играют ключевую роль в формировании альвеолярных перегородок во время нормального альвеологенеза у мышей в раннем постнатальном периоде, и впоследствии в легком взрослых особей эти клетки встречаются очень редко. При фиброзном заболевании миофибробласты участвуют в образовании большей части избыточного внеклеточного матрикса, и макрофаги секретируют профибротические факторы, которые рекрутируют и активируют миофибробласты. Напротив, ранее не сообщалось о роли моноцитов/макрофагов в регуляции индуцированных гипоксией альвеолярных миофибробластов. PDGFR- β^+ клетки дают более 40% индуцированных гипоксией миофибробластов в легких (R. Chandran I. Kabir, A. Sheikh, ELN и DMG, неопубликованные данные), тогда как SMA⁺ клетки являются источником только примерно 20%. Эти результаты согласуются с данными других исследований, предполагающими, что перициты легких, представляющие собой PDGFR- β^+ SMA⁻, являются важным типом клеток при ЛГ.

Примерно у 10-15% пациентов с ССК развивается ЛАГ, и ЛАГ является ведущей причиной смертности у этих пациентов. Действительно, трехлетняя выживаемость оценивается всего на уровне 49% для ССК-ЛАГ по сравнению с 84% для пациентов с ИЛАГ. Одним из факторов, способствующих этой повышенной летальности, является слабый ответ на стандартное лечение ЛАГ у пациентов с ССК-ЛАГ по сравнению с пациентами с ИЛАГ. Кроме того, иммуногистохимическое окрашивание анти-PDGF- β усиливается в мелких сосудах у пациентов с ССК-ЛАГ по сравнению с пациентами, страдающими ИЛАГ. Количество циркулирующих моноцитов не различается между этими популяциями пациентов с ЛАГ; однако результаты показывают, что в макрофагах, происходящих из этих моноцитов, по сравнению с контрольной группой субъектов, уровни PDGF- β более

повышены при ССК-ЛАГ, чем у пациентов с ИЛАГ. Кроме того, макрофаги у этих двух групп пациентов с ЛАГ индуцируют пролиферацию и миграцию SMC в значительной степени PDGF- β -зависимым образом. В исследовании, опубликованном 25 лет назад, сообщалось, что уровень белка PDGF-B повышен в БАЛЖ пациентов с генерализованным ССК (т. е. пациентов, не обследованных на ЛГ) по сравнению с контрольной группой. Таким образом, стратегия, нацеленная на PDGF- β макрофагов, может быть эффективной при ЛАГ.

Иматиниб является ингибитором тирозинкиназы с активностью против BCR-ABL, c-KIT, PDGFR- α и PDGFR- β и применяется при раке. Ежедневные инъекции иматиниба реверсируют ремоделирование легочных сосудов, ЛГ и RVH, вызванные монокроталином у крыс или хронической гипоксией у мышей. К сожалению, эти положительные результаты не были экстраполированы на пациентов с ЛАГ в рандомизированном исследовании эффективности иматиниба при легочной артериальной гипертензии (IMPRES). В целом, 94% пациентов прекратили это исследование иматиниба при пероральном введении, и часто встречались серьезные и неожиданные побочные эффекты, включая субдуральную гематому. Однако примечательно, что пациенты в IMPRES, которые могли продолжать принимать иматиниб в течение длительного времени, показали улучшение результатов функционального класса и теста дистанции 6-мин ходьбы. Эти результаты дополнительно подчеркивают необходимость терапии ЛГ, нацеленной на специфический путь (например, опосредованный PDGF-B) в определенном типе клеток (например, макрофагах) в легких.

Оротрахеально введенные наночастицы, состоящие из PPMS полимера, нагруженные миРНК, нацеленной на PDGF- β , существенно снижают PDGF- β , происходящий из макрофагов, предотвращая индуцированную гипоксией мускуляризацию дистальных легочных артериол, ЛГ и RVH. Такие наночастицы специфически и широко фагоцитируются макрофагами легких. Результаты предыдущих исследований показали, что интратрахеальная или внутривенная доставка наночастиц, содержащих агенты, эффективные при ЛАГ у человека, включая аналоги простациклина и силданафил, ослабляет ЛГ на экспериментальных моделях на грызунах. Единственное сообщение на предшествующем уровне о РНК-интерференции, опосредованной наночастицами, в этом контексте продемонстрировало, что внутривенная доставка антисмыслового олигонуклеотида микроРНК (antimiR)-145, который направлен на прямое нацеливание на SMC, ослабляет гипоксию/Sugen-5416-индуцированную ЛГ у крыс; однако помимо легких этот antimiR накапливается в печени, селезенке и почках. Подход, описанный здесь, с оротрахеальным введением наночастиц, нагруженных миРНК, является преимущественным, поскольку он специфически и эффективно нацелен на продукт выбранного гена в макрофагах легких и, таким образом, обещает ограничить неблагоприятные эффекты. Кроме того, наночастицы на основе полимера PPMS являются нетоксичными и биodeградируемыми, и защищают свой груз от деградации.

В совокупности исследования с экспериментальной моделью, а также с клетками, выделенными у пациентов с ЛАГ, демонстрируют, что HIF-регулируемая экспрессия

PDGF-В макрофагами играет важную роль в ремоделировании SMC, ЛГ и RVH. Кроме того, опосредованный наночастицами сайленсинг PDGF-β в макрофагах легких является терапевтической стратегией, требующей интенсивных дальнейших исследований.

Залючение:

Результаты показывают, что PACE наночастицы обеспечивают селективное поглощение легочными макрофагами и моноцитами после перорального (или легочного) введения.

Результаты также показывают, что этот способ доставки ингибитора PDGF-β был эффективен в лечении ЛГ.

На фиг. 1A-1F показано, что количество макрофагов из БАЛЖ и резидуального легкого возрастает при воздействии гипоксии. Мышей подвергали нормоксии или гипоксии (FiO₂ 10%) в течение 0-21 суток. CD64⁺Ly6G⁺ макрофаги выделяли с использованием FACS из БАЛЖ и подвергали кОТ-ПЦР на PDGF-β. Аналогично CD64⁺Ly6G⁺ макрофаги выделяли из резидуального легкого и оценивали уровни мРНК PDGF-β.

На фиг. 2A-2F показано, что истощение макрофагов защищает от легочной гипертензии. Мышей подвергали нормоксии или гипоксии (FiO₂ 10%) в течение 21 суток, и одновременно оротрахеально они получали липосомы, нагруженные клодронатом или носителем, два раза в неделю. Обработка клодронатом ослабляла дистальную артериальную мускуляризацию, о чем свидетельствовало систолическое давление в правом желудочке (RVSP; эквивалентно систолическому давлению в легочной артерии) и индекс Фултона у мышей, подвергнутых воздействию гипоксии.

Как показано на фиг. 3A-3D, 4A-4F и 5A-5F, гипоксия индуцирует PDGF-β в макрофагах БАЛЖ и резидуального легкого. В линии дифференцировки LysM-Cre делеция PDGF-β или Hif2a ослабляет индуцированную гипоксией мускуляризацию дистальных артериол и ЛГ, и делеция Vhl индуцирует спонтанную ЛГ.

Делеция PDGF-β и Hif2a в миелоидных клетках защищает от ЛГ, в то время как делеция Vhl приводит к ЛГ в нормоксических условиях. Мышей подвергали гипоксии или нормоксии, как указано. Срезы легких с дистальными артериолами от мышей, не несущих Cre или LysM-Cre и аллели floxed для PDGF-β, Hif2a или Vhl, окрашивали на маркеры SMC (альфа-актин гладкой мускулатуры [SMA]) и эндотелиальные клетки (EC; MECA-32).

Миелоидные клетки пациентов с легочной гипертензией человека имеют повышенный уровень PDGF-β, что вызывает пролиферацию и миграцию SMC.

На фиг. 6A-6E показано, что PDGF-В макрофагов у пациентов с идиопатической ЛАГ и ЛАГ со склеродермией способствует пролиферации и миграции SMC. Макрофаги человека культивировали в условиях нормоксии или гипоксии (3% O₂) в течение 12 ч, и затем с помощью кОТ-ПЦР анализировали мРНК PDGF-β в макрофагах контрольных субъектов и пациентов с ЛАГ. Анализ BrdU проводили на SMC легочной артерии человека, культивированных в культуральной среде пациента или в контрольной культуральной среде (CM). К CM добавляли блокирующие анти-PDGF-В антитела или контрольный IgG. Для количественного определения мигрировавших клеток по сравнению с контролями

использовали анализ миграции с добавлением SMC в верхнюю часть камеры Бойдена и СМ на дно либо с анти-PDGF-В Ab, либо с IgG.

На фиг. 7A-7F показано, что нокдаун PDGF- β в миелоидных клетках, опосредованный PACE наночастицами (NP), ослабляет ЛГ. Мыши подвергались воздействию нормоксии или гипоксии и одновременно получали NP, нагруженные скремблированной (Scr) РНК или миРНК, нацеленной на PDGF- β . CD64⁺Ly6G⁺ макрофаги, выделенные с помощью FACS, подвергали кОТ-ПЦР для мРНК PDGF- β . Срезы легких с дистальными артериолами окрашивали на SMA и CD31 (маркер EC). Измеряли RVSP и индекс Фултона. Доставляемая наночастицами миPDGF- β в макрофаги легких ослабляет индуцированную гипоксией мускуляризацию дистальных артериол, ЛГ и RVH.

Следовательно, результаты дают основание заключить, что:

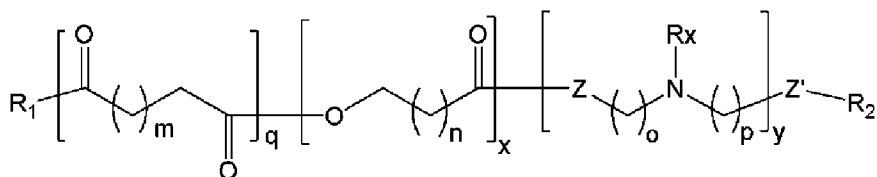
1. ЛГ можно лечить или профилактировать введением PDGF- β в легкие; и
2. С использованием наночастиц, сформированных из PACE полимеров, можно добиться селективного захвата средства легочными макрофагами и моноцитами.

Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые здесь, имеют те же значения, которые обычно понимаются специалистами в области, к которой относится изобретение. Публикации, цитированные здесь, и материалы, для которых они цитируются, специально включены посредством ссылки.

Специалисты в данной области знают или смогут установить, используя не более чем обычное экспериментирование, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных здесь. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются следующей формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для селективной доставки к иммунным клеткам легких, таким как макрофаги и моноциты, содержащая наночастицы со средним диаметром между 100 и 500 нм, предпочтительно между 200 и 400 нм, и включающие полимер, имеющий формулу;

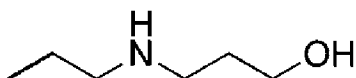


формула I

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

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

2. Композиция по п.1, где R_1 и/или R_2 не представляют собой:

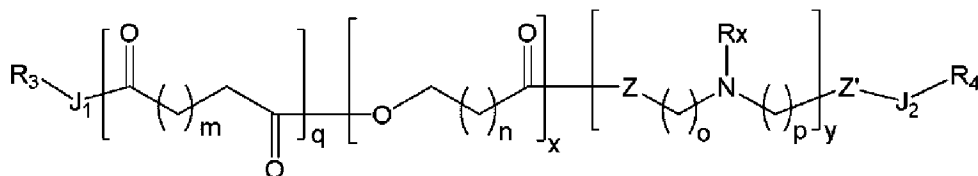


3. Композиция по п.1, где полимер находится в форме полиплексов или их частиц, содержащих нуклеиновую кислоту.

4. Композиция по п.3, где R_1 и/или R_2 состоят из:



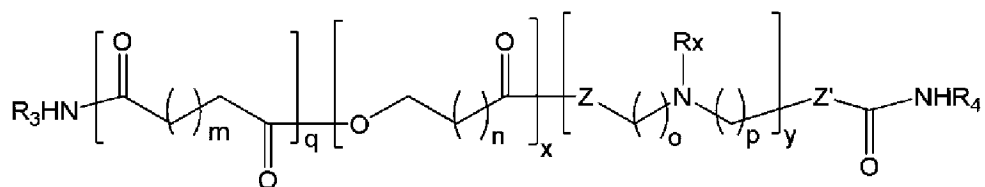
5. Композиция по п.1, где полимер имеет структуру формулы II:



формула II

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

6. Композиция по п.1, где полимер имеет структуру формулы III:



формула III.

7. Композиция по п.1, где полимер имеет средневесовую молекулярную массу, измеренную с помощью гель-проникающей хроматографии с использованием стандартов полистирола с узкой полидисперсностью, которая составляет примерно между 2000 и 20000 дальтон, предпочтительно между примерно 2000 и примерно 10000 дальтон, наиболее предпочтительно между примерно 2000 дальтон и примерно 7000 дальтон.

8. Композиция по любому из пп.1-7, где наночастицы содержат терапевтическое, профилактическое или диагностическое средство.

9. Композиция по п.8, где средство предназначено для лечения, профилактики или диагностики легочного расстройства или заболевания.

10. Композиция по п.8, где агент представляет собой ингибитор PDGF-β.

11. Композиция по п.8, где средство представляет собой белок или пептид, сахар или углевод, липид, липопротеин или липополисахарид, молекулу нуклеиновой кислоты или небольшую молекулу с молекулярной массой менее 2000 дальтон.

12. Композиция по п.8, где композиция формулирована для введения в виде аэрозоля, для инстилляций, в распылителе, в ингаляторе, в дыхательном аппарате или респираторе, или в виде сухого порошка.

13. Композиция по п.8, где средство находится в количестве, обеспечивающем местную доставку средства в легочную систему, а не системно.

14. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества композиции по любому из пп.8-13.

15. Способ по п.14, где ингибитор PDGF-β вводят субъекту с легочной гипертензией.

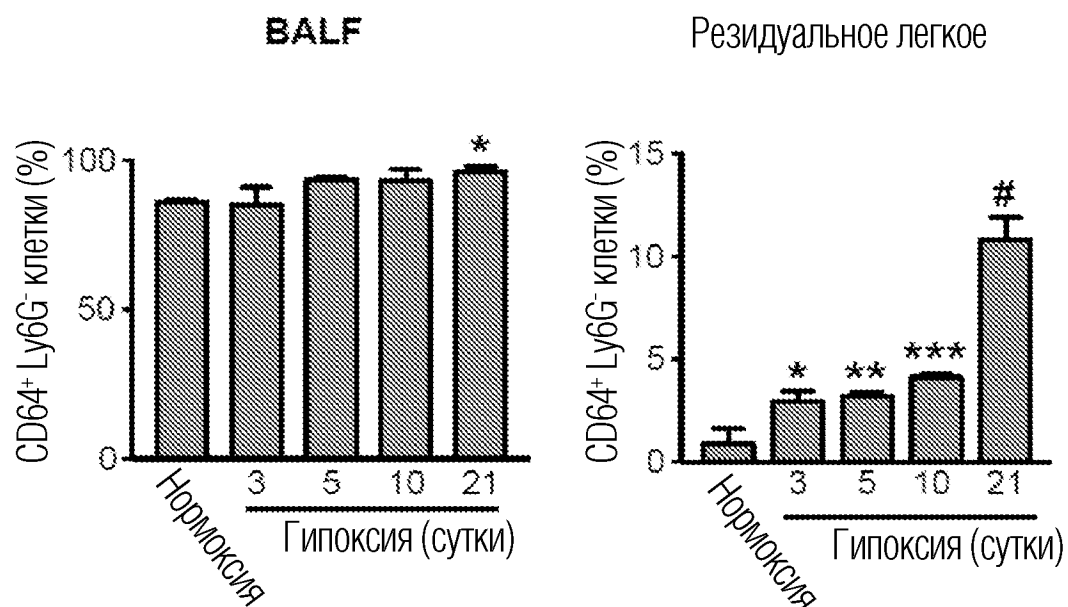
16. Способ по п.14, где у субъекта имеет место застойная сердечная недостаточность.

17. Способ по п.14, где у субъекта имеет место фиброз легких.

18. Способ по п.14, где у субъекта имеет место рак легкого.

19. Способ по п.14, где у субъекта имеет место или имеется риск развития острого респираторного дистресс-синдрома.

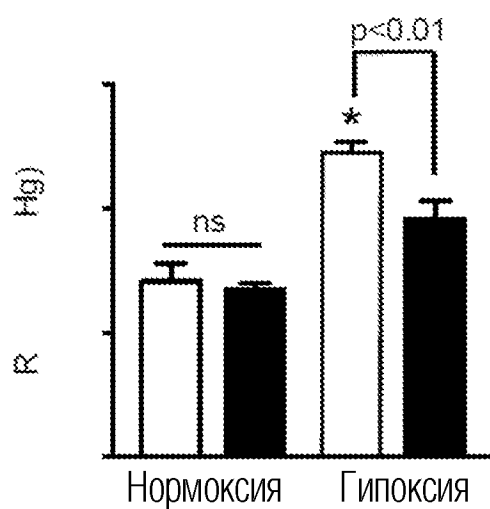
20. Способ по п.14, где у субъекта имеет место вирусное заболевание, такое как COVID-19.



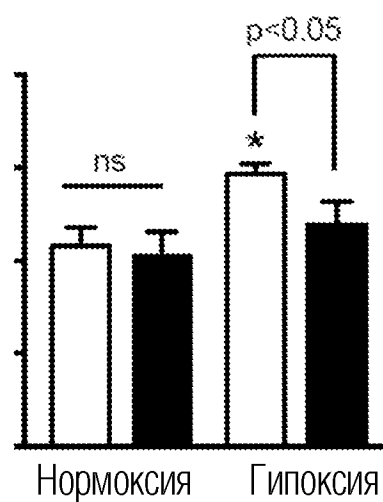
ФИГ. 1А

ФИГ. 1В

□ Растворитель ■ Клодронат

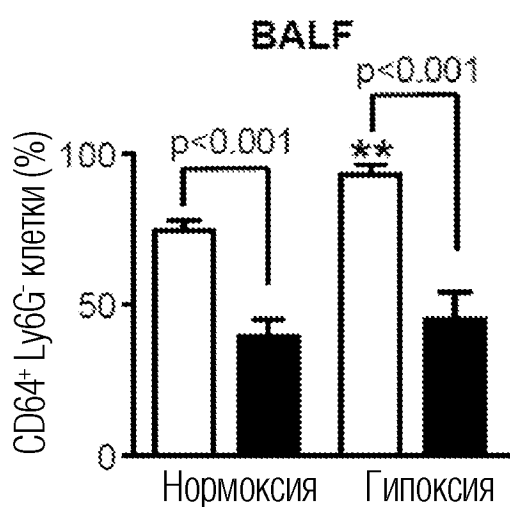


ФИГ. 1С

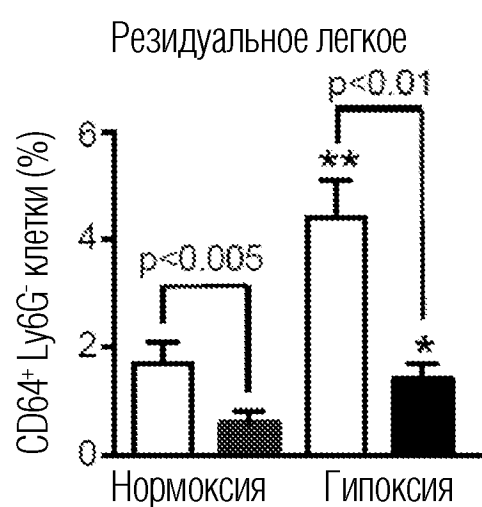


ФИГ. 1D

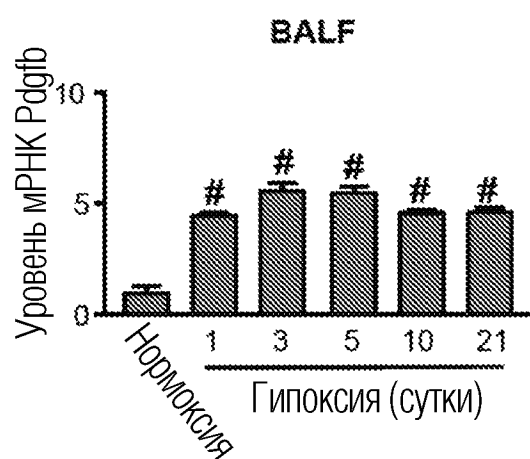
□ Растворитель ■ Клодронат



ФИГ. 1Е



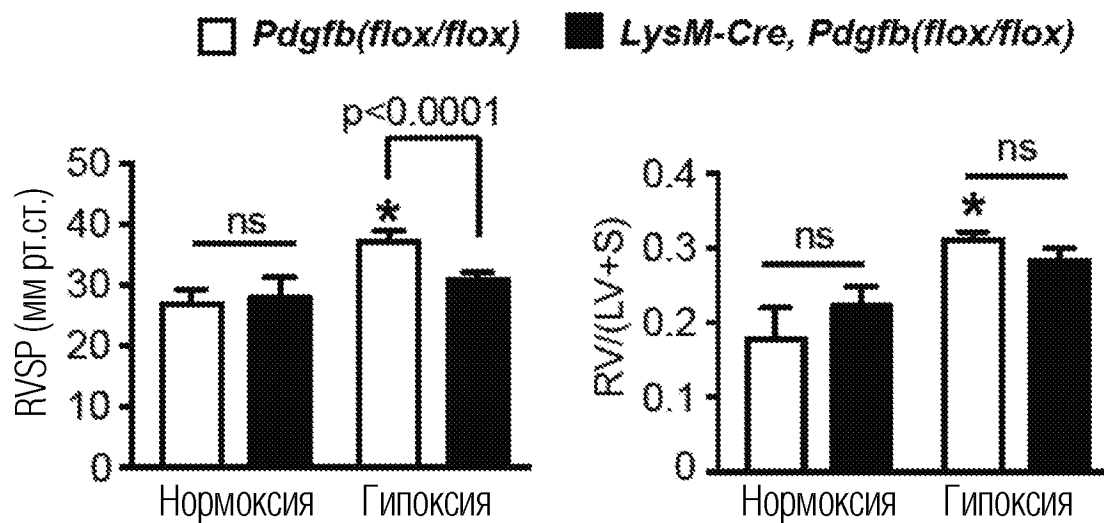
ФИГ. 1F



ФИГ. 2А

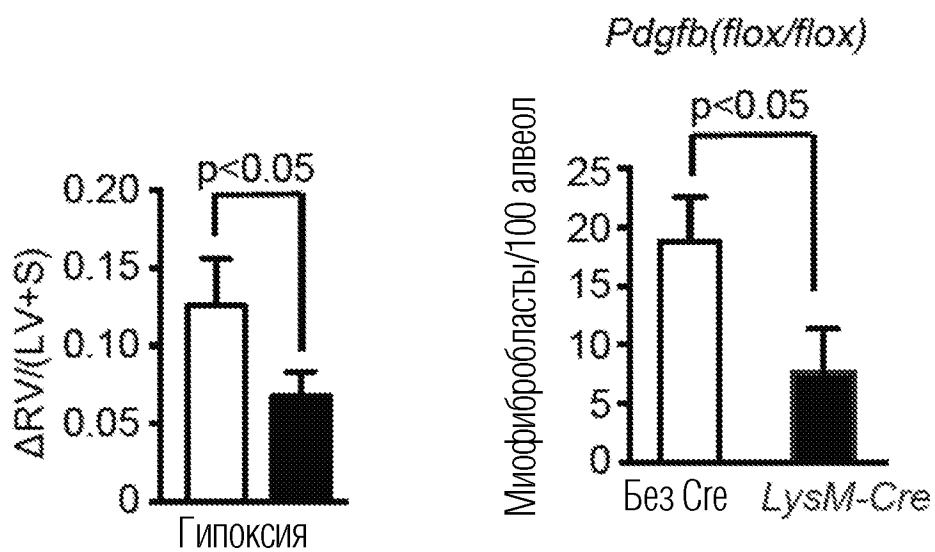


ФИГ. 2В



ФИГ. 2С

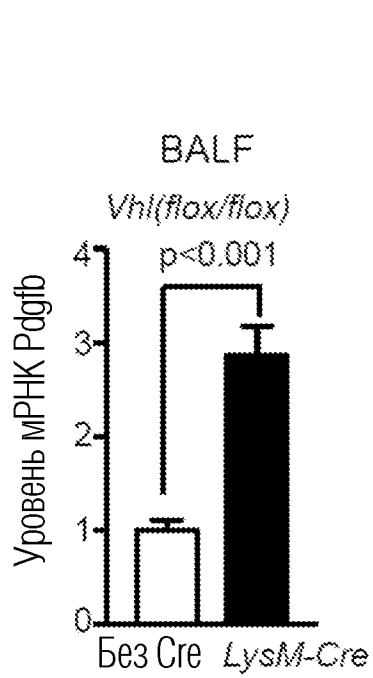
ФИГ. 2D



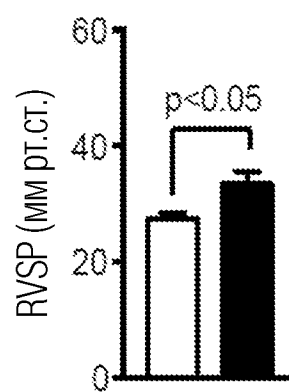
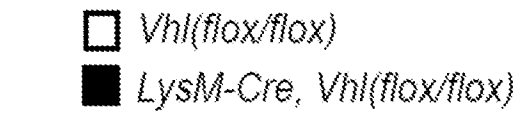
ФИГ. 2Е

ФИГ. 2F

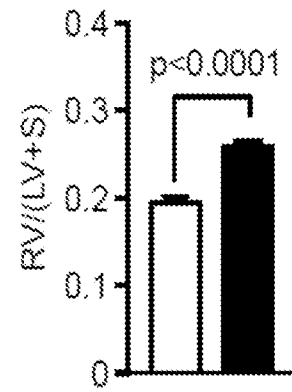
Нормоксия (сутки 49)



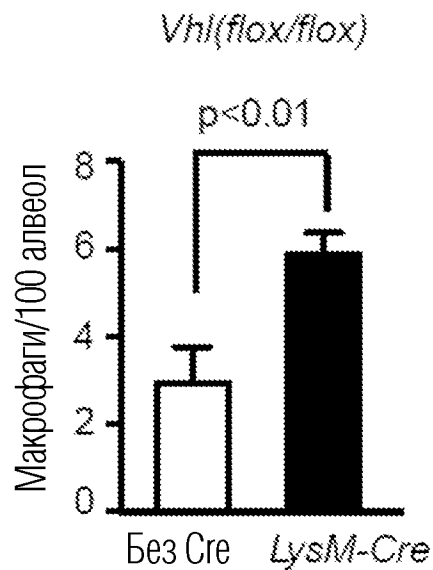
ФИГ. 3А



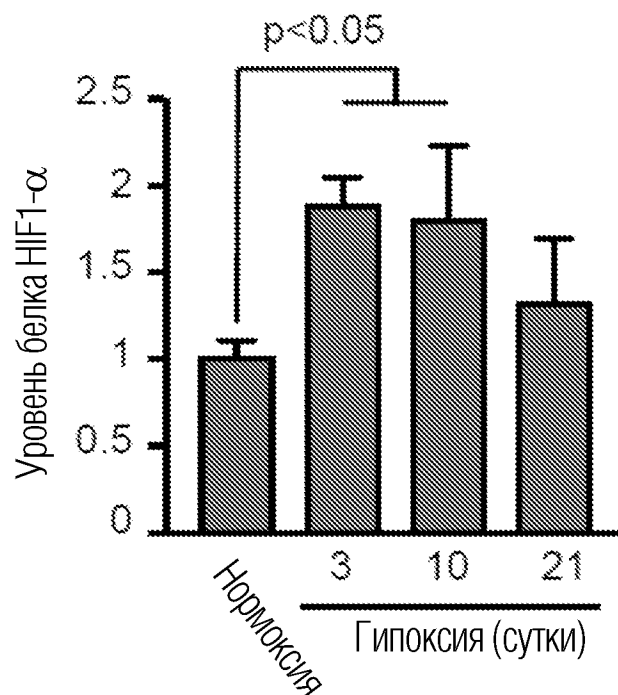
ФИГ. 3В



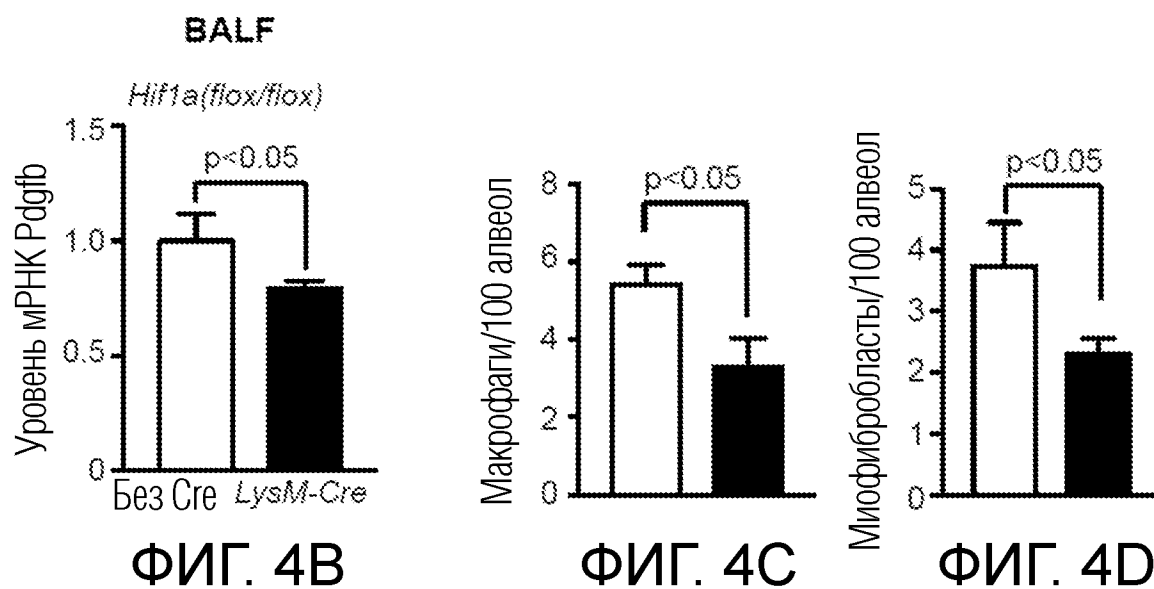
ФИГ. 3С



ФИГ. 3D

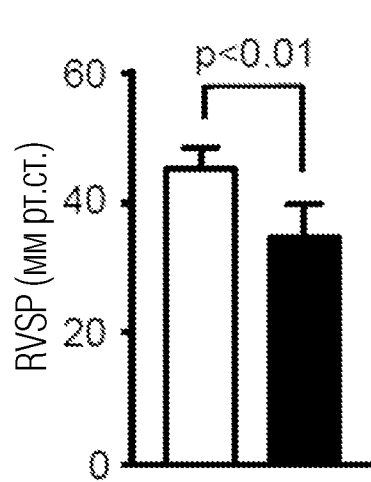


ФИГ. 4А

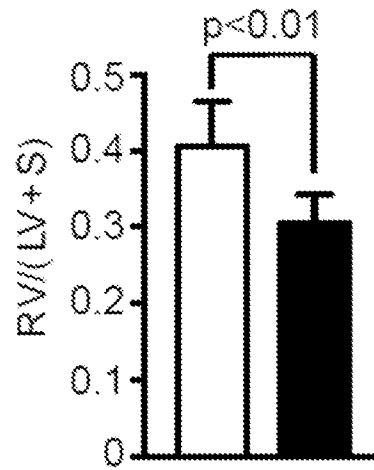


□ *Hif1a(flox/flox)* ■ *LysM-Cre, Hif1a(flox/flox)*

□ *Hif1a(flox/flox)* ■ *LysM-Cre, Hif1a(flox/flox)*

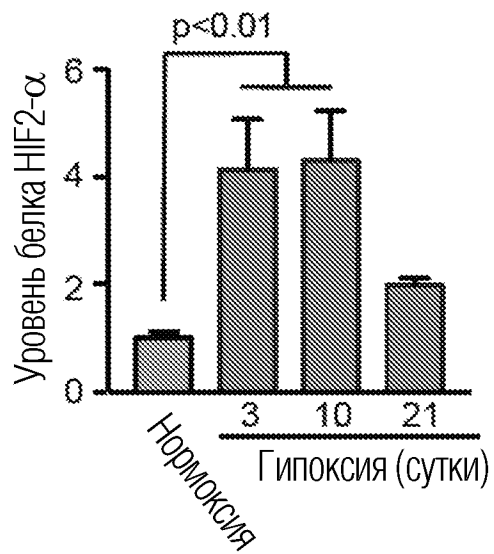


ФИГ. 4Е

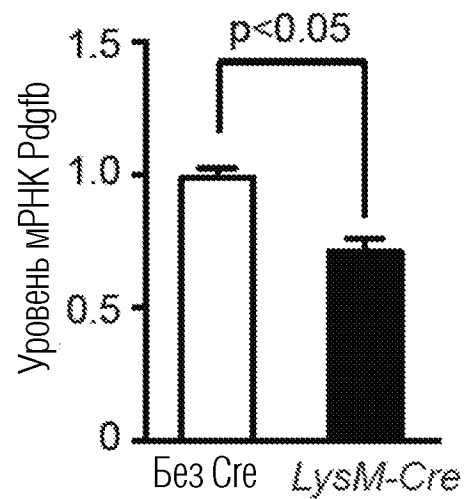


ФИГ. 4F

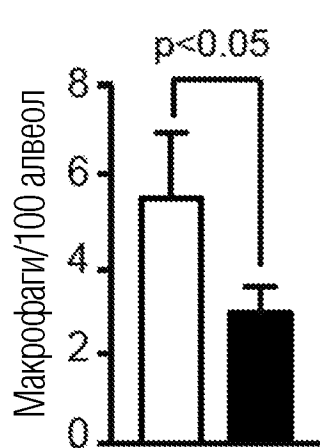
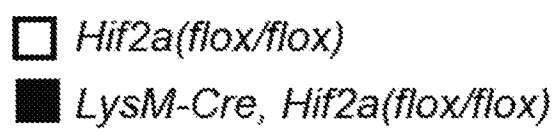
BALF

Hif2a(flox/flox)

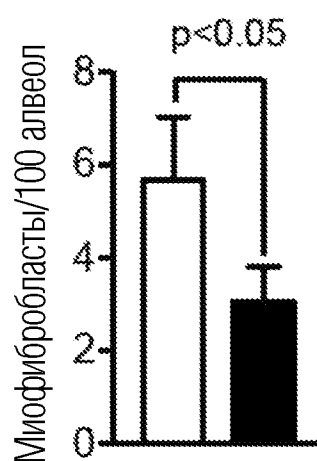
ФИГ. 5А



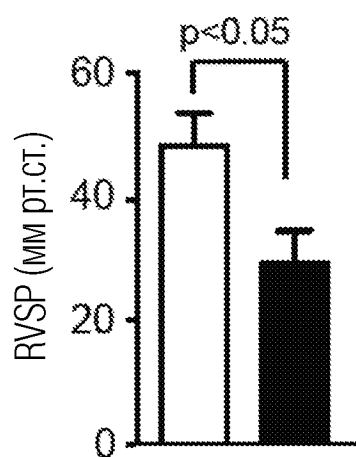
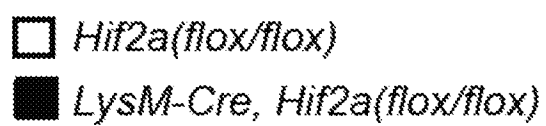
ФИГ. 5В



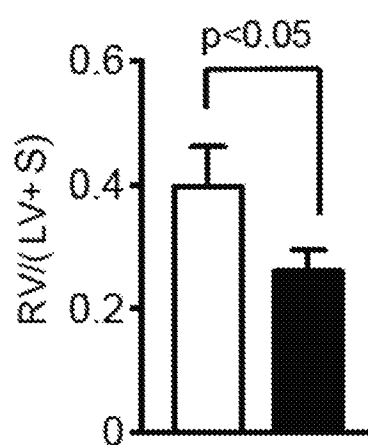
ФИГ. 5С



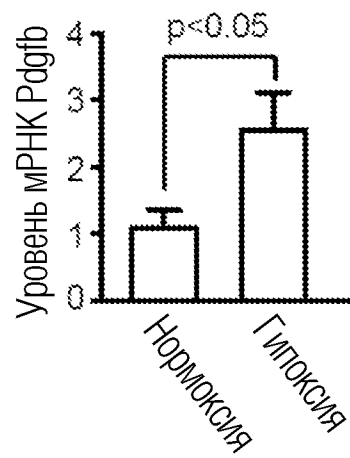
ФИГ. 5D



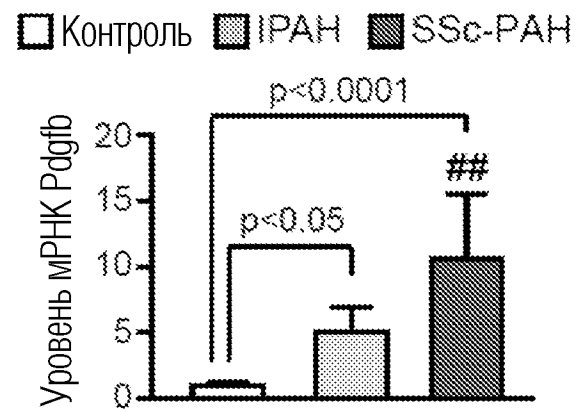
ФИГ. 5Е



ФИГ. 5F

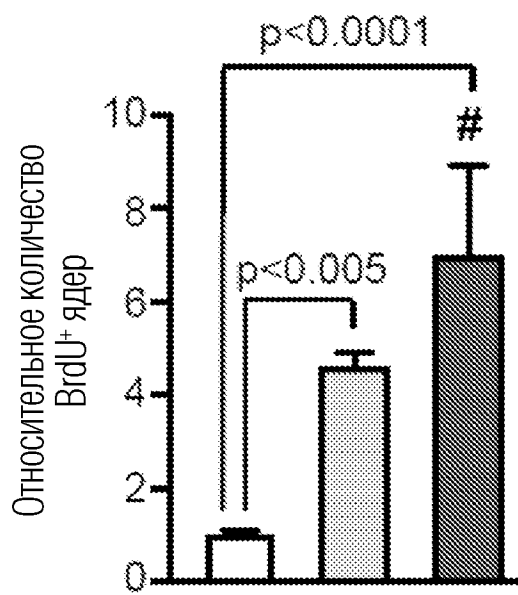


ФИГ. 6А

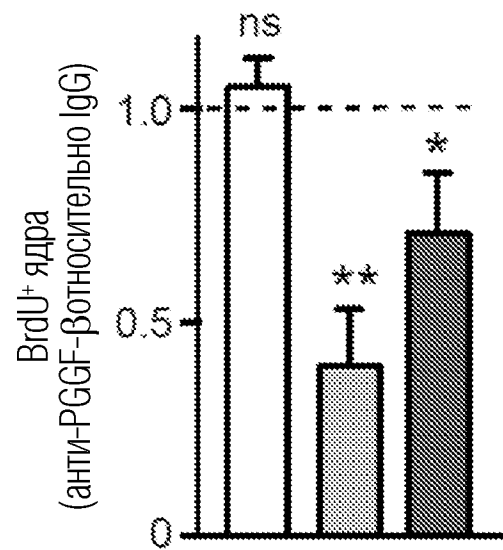


ФИГ. 6В

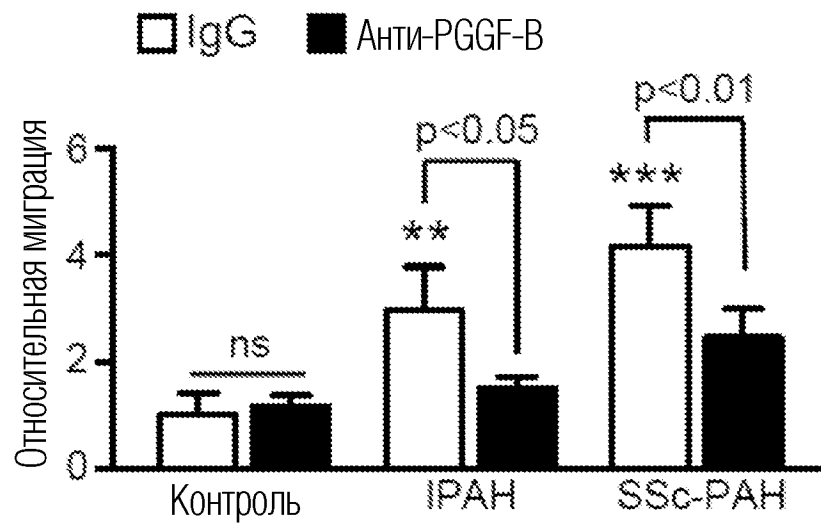
Контроль IPAH SSc-PAH



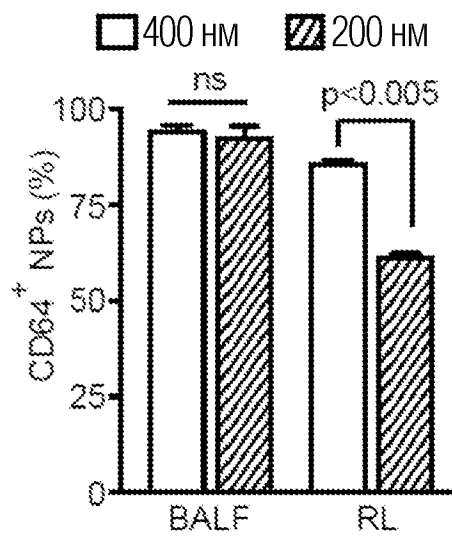
ФИГ. 6С



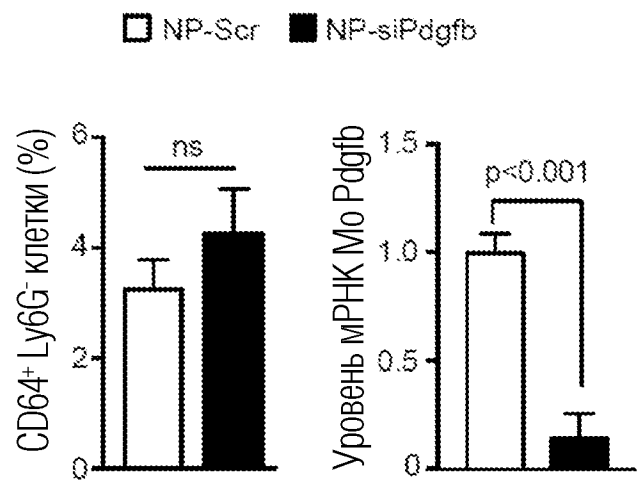
ФИГ. 6D



ФИГ. 6Е

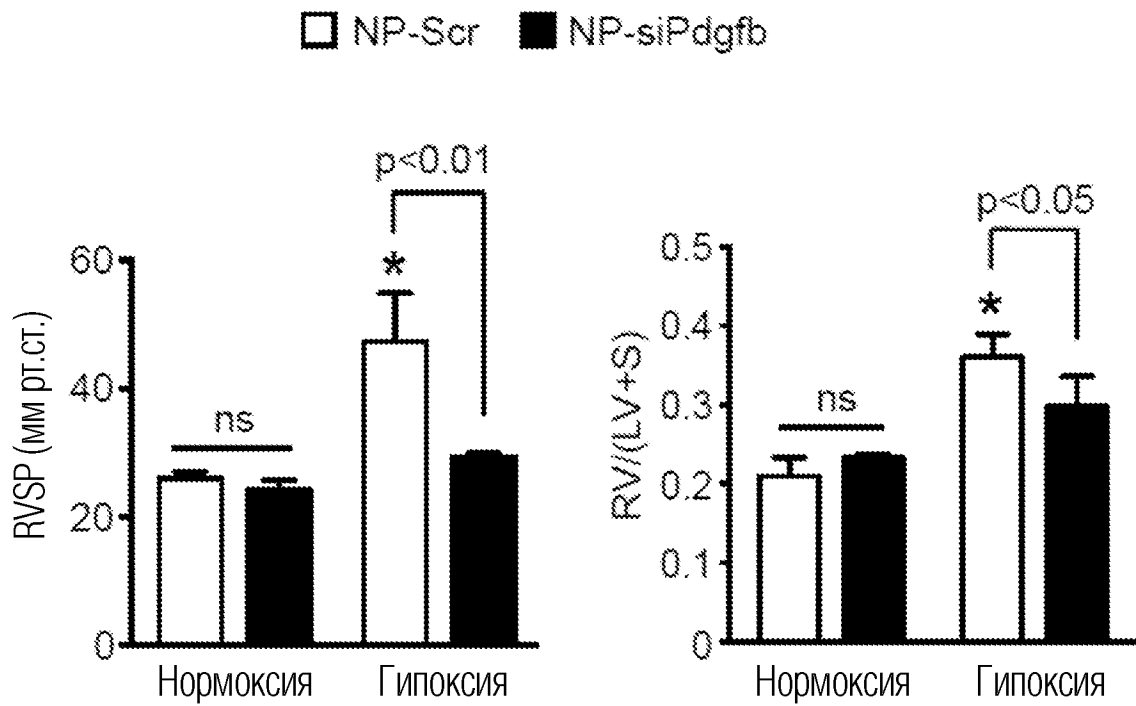


ФИГ. 7А



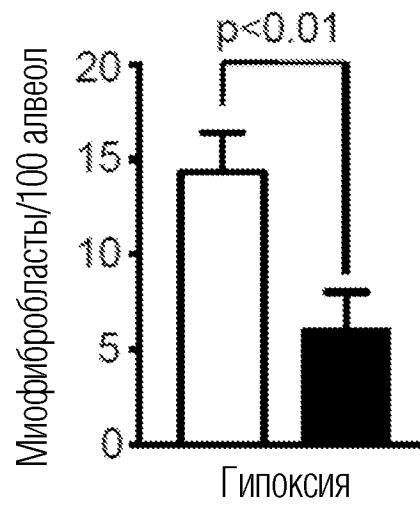
ФИГ. 7В

ФИГ. 7С

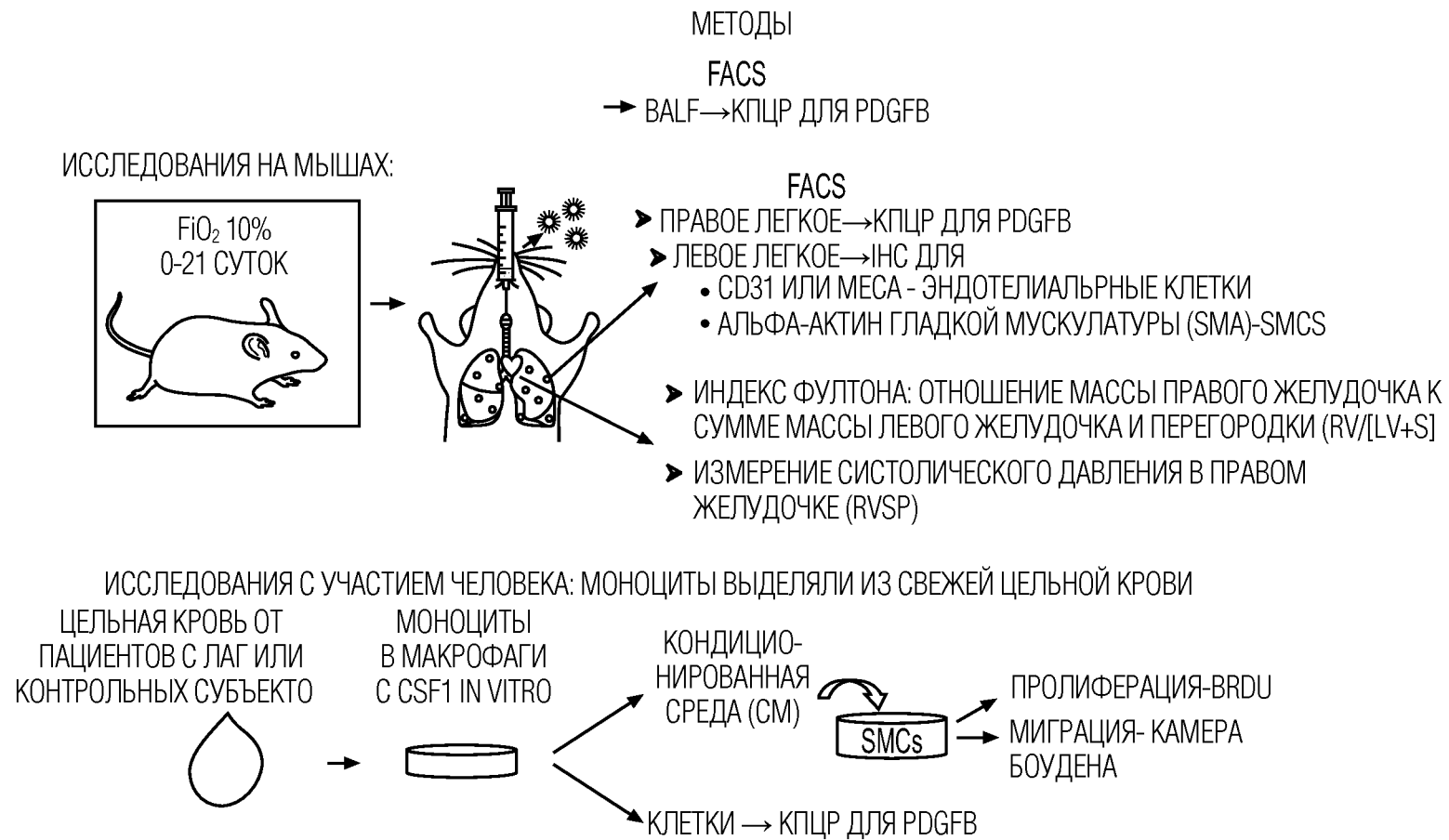


ФИГ. 7D

ФИГ. 7E



ФИГ. 7F



ФИГ. 8