

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202392102 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.11.16

(51) Int. Cl. A61K 9/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.02.25

## (54) ПРЕПАРАТЫ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АЭРОЗОЛЯ, И АЭРОЗОЛИ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ДЛЯ ДОСТАВКИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

(31) 21159455.1

(72) Изобретатель:

(32) 2021.02.26

Домен Кристиан, Бек Филипп, Планк  
Кристиан (DE)

(33) EP

(86) PCT/EP2022/054796

(74) Представитель:

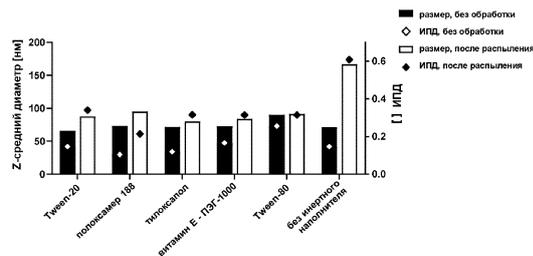
(87) WO 2022/180213 2022.09.01

Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,  
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов  
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,  
Кузнецова Т.В. (RU)

(71) Заявитель:

ЭТРИС ГМБХ (DE)

(57) В изобретении описан препарат водной суспензии, предназначенный для получения аэрозоля, указанный препарат суспензии содержит липидные или липидоподобные наночастицы, которые суспендированы в водном растворе разбавителя, где липидные или липидоподобные наночастицы содержат следующие компоненты (а) и (b): (а) нуклеиновая кислота и (b) ионизируемый липид или ионизируемый липидоид; и где водный раствор разбавителя содержит триблок-сополимер, который включает один поли(пропиленоксидный) блок и два поли(этиленоксидных) блока. Кроме того, в изобретении описан аэрозоль, полученный из препарата, предназначенного для получения аэрозоля.



A1

202392102

202392102

A1

ПРЕПАРАТЫ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АЭРОЗОЛЯ, И  
АЭРОЗОЛИ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ДЛЯ ДОСТАВКИ НУКЛЕИНОВЫХ  
КИСЛОТ

5

Настоящее изобретение относится к препаратам водных суспензий, предназначенным для получения аэрозоля, и к аэрозолям, которые можно успешно применять для введения нуклеиновой кислоты субъекту.

10

Содержащие липиды препараты, такие как липидные везикулы, содержащие липосомы, и липидные или липидоподобные наночастицы (ЛНЧ), часто используют для доставки активных фармацевтических ингредиентов в организмы пациентов. В частности, препараты на основе липидов или липидоидов, содержащие нуклеиновые кислоты, являются чрезвычайно

15

подходящими и эффективными для введения нуклеиновых кислот в клетки. Эту благоприятную характеристику препаратов на основе липидов или липидоидов, содержащих нуклеиновые кислоты, в течение десятилетий использовали в биологических и медицинских исследованиях и в терапевтических подходах для i) сверхэкспрессирования генов или для компенсации генетических дефектов в целевой клетке, или ii) для понижения или повышения уровня экспрессии эндогенного гена в клетках, или iii) для исправления генетических дефектов (мутаций).

20

Для обеспечения сверхэкспрессирования генов и компенсации генетических дефектов в клетки вводят нуклеиновые кислоты, которые содержат последовательности, кодирующие белки. Ими являются конструкции ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота), содержащие кодирующий участок, управляемый подходящим промотором, которые транскрибируются в мРНК (матричная (информационная) рибонуклеиновая кислота) в ядре клетки. мРНК перемещается в цитоплазму, в которой она транслируется с образованием белка

25

30

Альтернативно, для обеспечения такого же эффекта транскрибированную *in vitro* мРНК можно ввести в цитоплазму с использованием содержащих липиды препаратов. В генной терапии и в терапии с помощью транскрипта мРНК концепцию введения экзогенной генетической информации в клетки пациента

используют для индуцирования продуцирования клетками пациента белка, который обладает терапевтическим воздействием.

Для понижения уровня экспрессии эндогенного гена можно использовать полностью синтетические нуклеиновые кислоты, такие как, в частности, синтетические (антисмысловые) олигонуклеотиды или кРНК (короткие интерферирующие РНК), или рибозимы, или конструкции (плазмидной) ДНК, которые в клетке транскрибируются в РНК, которые являются подходящими для понижения регуляции экспрессии эндогенного гена. Для устранения экспрессии эндогенного гена можно использовать нуклеиновые кислоты, которые кодируют нуклеазы, такие как нуклеазы с цинковыми пальцами, нуклеазы TALE (эффektorные нуклеазы, подобные активатору транскрипции) или система CRISPR-Cas. Аналогичным образом, повышение уровня экспрессии эндогенного гена можно обеспечить с использованием определенных олигонуклеотидов, действующих по различным механизмам (Khorkova O, Hsiao J, Wahlestedt C. Oligonucleotides for upregulating gene expression. Pharm Pat Anal. 2013;2(2):215-29; Sargent RG, Kim S, Gruenert DC. Oligo/polynucleotide-based gene modification: strategies and therapeutic potential. Oligonucleotides. 2011;21(2):55-75), этот подход также известен, как терапевтическое модулирование гена. Особым случаем терапевтического модулирования гена является стимуляция иммунного ответа с помощью олигонуклеотидов, содержащих мотив CpG (Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. Annu Rev Immunol. 2002;20:709-60).

Для исправления генетических дефектов на уровне мРНК можно использовать конструкции нуклеиновой кислоты, которые оказывают влияние на реакции сплайсинга, такие как, но не ограничиваясь только ими, олигонуклеотиды для обеспечения пропуска экзонов. Для исправления гена на уровне генома можно использовать нуклеиновые кислоты, которые кодируют нуклеазы, которые могут обеспечить изменение последовательностей нуклеиновых кислот в хромосомах, такие как нуклеазы с цинковыми пальцами, нуклеазы TALE или система CRISPR-Cas.

В любой из этих трех концепций терапии на основе нуклеиновой кислоты (сверхэкспрессирование-дополнение генов/понижение или повышение уровня экспрессии эндогенных генов/исправление гена) препараты на основе липидов,

содержащие нуклеиновые кислоты, необходимо вводить в организм пациента таким путем, который является приемлемым для пациента, и который является подходящим для того, чтобы нуклеиновая кислота оказывала необходимое воздействие в целевых клетках или в целевых органах, или во всем организме пациента. Пути введения, которые часто используют, включают местное введение путем инъекции, такое как внутрикожное, подкожное, внутриглазное, внутримышечное, внутрисердечное, внутриопухолевое или непосредственное введение в другую целевую ткань или орган, а также системное введение (обычно внутривенное).

10 Реже используют введение аэрозоля препарата на основе липида или липидоида, содержащего активный фармацевтический ингредиент, в частности, нуклеиновую кислоту, путем ингаляции. Хотя этот путь введения представляет собой наиболее удобный и подходящий путь доставки активного фармацевтического ингредиента, в частности, нуклеиновой кислоты, в целевые 15 клетки, находящиеся в дыхательных путях, этот путь введения связан с многочисленными затруднениями, описанными ниже, в особенности, в случае препаратов на основе липида или липидоида, содержащих нуклеиновые кислоты.

Затруднения, с одной стороны, возникают вследствие требований, предъявляемых к применению в медицине. При введении путем ингаляции 20 необходимо, чтобы введение терапевтически эффективной дозы происходило в течение разумного промежутка времени и на тех участках дыхательных путей пациента, где может быть обеспечена необходимая терапевтическая эффективность. В зависимости от случая применения в медицине введением может являться, например, введение в верхние дыхательные пути или в альвеолы. Кроме того, в отношении промежутка времени, требующегося для 25 введения необходимой дозы, следует принимать во внимание возможность соблюдения пациентом режима. Продолжительности ингаляции, составляющие 1 ч и более, несомненно, чрезвычайно обременительны для пациента, тогда как очевидно, что продолжительности ингаляции, составляющие 30 мин или менее, являются более подходящими. 30

Другие затруднения возникают вследствие нормативных требований, описанных в руководстве FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) для промышленности под

названием "Liposome Drug Products Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation" (Liposome Drug Products Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation - Guidance for Industry, (2018)) и в руководстве ЕМА (Европейское агентство лекарственных средств) EMEA/CHMP/QWP/49313/2005 Corr, "Guideline on the Pharmaceutical Quality of Inhalation and Nasal Products", 2006. В обоих руководствах подчеркнута важность целостности лекарственного продукта. В качестве критически важных характеристик качества указаны физико-химические характеристики, такие как размер везикул/частиц и их распределение по размерам, и их морфология. "Проводимые с целью разработки исследования должны включать исследование физических характеристик лекарственного вещества и инертных наполнителей, относящихся к их влиянию на функциональность продукта" (Guideline on the Pharmaceutical Quality of Inhalation and Nasal Products, (2006)). В руководстве EMEA/CHMP/QWP/49313/2005 Corr указано, что "физические характеристики, такие как растворимость, размер, форма, плотность, шероховатость, заряд и степень кристалличности лекарственного вещества и/или инертных наполнителей, могут оказывать влияние на однородность готового продукта и воспроизводимость при его изготовлении". В руководстве приведены требования того, что должна быть гарантирована однородность доставляемой дозы и масса мелкодисперсных частиц в диапазоне скорости их потока в организме пациента. Подверженность слиянию (т. е. необратимому соединению более мелких липосом с образованием более крупных липосом), агрегации (т. е. обратимой агломерации или соединения двух и большего количества липосом без слияния) и вытекание включенного лекарственного вещества во время хранения могут оказывать влияние на стабильность лекарственного продукта (Liposome Drug Products Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation - Guidance for Industry, (2018)). Другими словами, лекарственный продукт, содержащийся в жидкости, которую распыляют, не должен изменяться во время распыления, т. е. состав, размер частиц и эффективность капсулирования лекарственного вещества (в случае

конкретного лекарственного продукта), а также его эффективность, должны оставаться неизменными.

Для введения путем ингаляции препарат на основе липида, содержащий активный фармацевтический ингредиент, необходимо распылить. Специалисту в данной области техники известны распылители различных типов, предназначенные для применения в медицине. Независимо от конструкции распылителя для распыления жидкости необходимо подача в жидкость существенного количества энергии. Показано, что при распылении препаратов на основе липида или липидоида, содержащего фармацевтически активные ингредиенты, действительно происходит изменение размера, морфологии и эффективности капсулирования лекарственного вещества (Elhissi AM, Faizi M, Naji WF, Gill HS, Taylor KM. Physical stability and aerosol properties of liposomes delivered using an air-jet nebulizer and a novel micropump device with large mesh apertures. *Int J Pharm.* 2007;334(1-2):62-70; Li Z, Zhang Y, Wurtz W, Lee JK, Malinin VS, Durwas-Krishnan S, et al. Characterization of nebulized liposomal amikacin (Arikace) as a function of droplet size. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2008;21(3):245-54). Кроме того, показано, что препарат на основе липида, содержащий мРНК, может забивать распылитель во время распыления, и что при распылении препарат теряет эффективность.

Соответственно, задачей, лежащей в основе настоящего изобретения, являлось получение композиции, содержащей нуклеиновую кислоту, эта композиция является подходящей для доставки нуклеиновой кислоты в клетку, находящуюся в дыхательных путях субъекта, при распылении и вдыхании указанной композиции, таким образом, что после вдыхания нуклеиновая кислота эффективным образом осуществляет свою функцию, это приводит к получению белка в клетках легких, приводящее к понижению или повышению уровня экспрессии эндогенного гена, или приводящее к исправлению гена. Кроме того, необходимо обеспечить возможность распыления эффективной дозы композиции в течение разумного промежутка времени и во время распыления компоненты композиции должны оставаться неповрежденными.

Согласно настоящему изобретению было обнаружено, что препарат суспензии, содержащие липидные или липидоподобные наночастицы (ЛНЧ), которые содержат нуклеиновую кислоту и ионизируемый липид или

ионизируемый липидоид, и которые суспендированы в водном растворе разбавителя, содержащего блок-сополимер поли(этиленоксид)-поли(пропиленоксид), можно эффективно распылить и при этом предотвратить неблагоприятное воздействие процедуры распыления на целостность наночастиц и содержащейся в них нуклеиновой кислоты. В частности, применение этого препарата для получения аэрозоля, обеспечивает существенно улучшенную устойчивость частиц по отношению к агрегированию во время процедуры распыления и обеспечивает благоприятное сохранение эффективности трансфицирования нуклеиновой кислоты после проведения процедуры распыления.

Краткое описание объектов настоящего изобретения представлено в приведенных ниже параграфах.

1. Препарат водной суспензии, предназначенный для получения аэрозоля, указанный препарат суспензии содержит липидные или липидоподобные наночастицы, которые суспендированы в водном растворе разбавителя, где липидные или липидоподобные наночастицы содержат следующие компоненты (а) и (b):

(а) нуклеиновая кислота и

(b) ионизируемый липид или ионизируемый липидоид;

и где водный раствор разбавителя содержит триблок-сополимер, который включает один поли(пропиленоксидный) блок и два поли(этиленоксидных) блока.

2. Препарат суспензии, соответствующий параграфу 1, где нуклеиновая кислота выбрана из числа следующих: РНК и плазмидная ДНК.

3. Препарат суспензии, соответствующий параграфу 1 или 2, где нуклеиновая кислота выбрана из числа следующих: мРНК, киРНК, миРНК (микро-РНК), антисмысловая РНК, тРНК (транспортная РНК) и некодирующая РНК, и более предпочтительно, если нуклеиновой кислотой является мРНК.

4. Препарат суспензии, соответствующий любому из параграфов 1-3, где концентрация нуклеиновой кислоты, содержащейся в препарате суспензии, находится в диапазоне от 0,01 до 10 мг/мл, более предпочтительно от 0,02 до 10 мг/мл и наиболее предпочтительно от 0,05 до 5 мг/мл в пересчете на полный объем препарата суспензии.

5. Препарат суспензии, соответствующий любому из параграфов 1-4, где отношение массы наночастиц к объему водной суспензии, выраженное в г/л, находится в диапазоне от 0,5 до 100 г/л, предпочтительно от 10 до 100 г/л, более предпочтительно от 10 до 50 г/л и наиболее предпочтительно от 10 до 75 г/л.

5 6. Препарат суспензии, соответствующий любому из параграфов 1-5, где наночастицы обладают Z-средним диаметром, определенным с помощью динамического светорассеяния, находящимся в диапазоне от 10 до 500 нм, более предпочтительно в диапазоне от 10 до 250 нм, еще более предпочтительно от 20 до 200 нм.

10 7. Препарат суспензии, соответствующий любому из параграфов 1-6, где наночастицы обладают индексом полидисперсности, определенным с помощью динамического светорассеяния, находящимся в диапазоне от 0,05 до 0,4, более предпочтительно в диапазоне от 0,05 до 0,2.

15 8. Препарат суспензии, соответствующий любому из параграфов 1-7, где наночастицы дополнительно содержат один или большее количество следующих компонентов (с1) - (с6):

(с1) неионизируемый липид, обладающий структурой стерина;

(с2) глицерофосфолипид;

(с3) конъюгированный с ПЭГ (полиэтиленгликоль) липид;

20 (с4) конъюгированный с полисаркозином липид:

(с5) ПАСилированный липид (ПАС = пролин/аланин/серин); и

(с6) катионогенный полимер.

9. Препарат суспензии, соответствующий любому из параграфов 1-8, где наночастицы содержат:

25 от 30 до 65 мол.% ионизируемого липида или ионизируемого липидоида (b) и один или большее количество следующих компонентов:

от 10 до 50 мол.% липида, обладающего структурой стерина (с1),

от 4 до 50 мол.% глицерофосфолипид (с2),

от 0,5 до 10 мол.% одного из следующих: конъюгированный с ПЭГ липид (с3),

30 конъюгированный с полисаркозином липид (с4) и ПАСилированный липид (с5), или любой их комбинации,

от 0,5 до 10 мол.% катионогенного полимера (с6),

при этом сумма содержаний (b) и (с1) - (с6) составляет 100 мол.%.

10. Препарат суспензии, соответствующий любому из параграфов 1-9, где наночастицы дополнительно содержат следующие компоненты (с1) - (с3):

(с1) неионизируемый липид, обладающий структурой стерина;

(с2) глицерофосфолипид; и

5 (с3) конъюгированный с ПЭГ липид.

11. Препарат суспензии, соответствующий параграфу 10, где наночастицы содержат:

от 30 до 65 мол.% ионизируемого липида или ионизируемого липидоида (b),

от 10 до 50 мол.% липида, обладающего структурой стерина (с1),

10 от 4 до 50 мол.% глицерофосфолипид (с2), и

от 0,5 до 10 мол.% конъюгированного с ПЭГ липида (с3),

при этом сумма содержаний (b) и (с1) - (с3) составляет 100 мол.%.

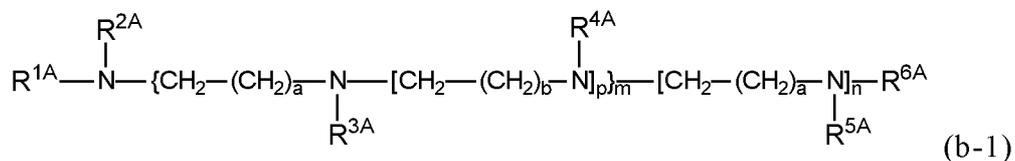
12. Препарат суспензии, соответствующий любому из параграфов 1-11, где наночастицы дополнительно содержат полианионный компонент, который

15 отличается от нуклеиновой кислоты.

13. Препарат суспензии, соответствующий любому из параграфов 1-12, где состав наночастиц является таким, что в наночастицах отношение суммы масс компонентов, отличающихся от нуклеиновой кислоты, к массе нуклеиновой кислоты находится в диапазоне от 30:1 до 1:1, более предпочтительно от 20:1 до

20 2:1 и наиболее предпочтительно от 15:1 до 3:1.

14. Препарат суспензии, соответствующий любому из параграфов 1-13, где наночастицы содержат ионизируемый липидоид (b), описываемый следующей формулой (b-1),



25 в которой:

а равно 1 и b обозначает целое число, равное от 2 до 4; или a обозначает целое число, равное от 2 до 4, и b равно 1,

p равно 1 или 2,

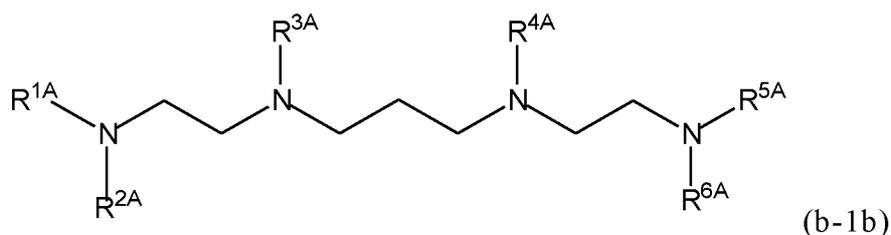
m равно 1 или 2; n равно 0 или 1 и m+n ≥ 2; и

30 R<sup>1A</sup> - R<sup>6A</sup> независимо друг от друга выбраны из числа следующих: водород; -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7A</sup>, -CH(R<sup>7A</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7A</sup>,

$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-\text{R}^{7\text{A}}$ ;  $-\text{CH}_2-\text{R}^{7\text{A}}$ ;  $-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2$ ; цепь поли(этиленгликоля) и лиганд рецептора; где  $\text{R}^{7\text{A}}$  выбран из числа следующих:  $\text{C}_3-\text{C}_{18}$ -алкил и  $\text{C}_3-\text{C}_{18}$ -алкенил, содержащий одну двойную связь  $\text{C}-\text{C}$ ;

при условии, что по меньшей мере два из остатков  $\text{R}^{1\text{A}} - \text{R}^{6\text{A}}$  выбраны из числа  
5 следующих:  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}^{7\text{A}}$ ,  $-\text{CH}(\text{R}^{7\text{A}})-\text{CH}_2-\text{OH}$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-\text{R}^{7\text{A}}$ ,  
 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-\text{R}^{7\text{A}}$  и  $-\text{CH}_2-\text{R}^{7\text{A}}$ , где  $\text{R}^{7\text{A}}$  выбран из числа следующих:  $\text{C}_3-$   
 $\text{C}_{18}$ -алкил и  $\text{C}_3-\text{C}_{18}$ -алкенил, содержащий одну двойную связь  $\text{C}-\text{C}$ ;  
или его протонированную форму, где один или большее количество атомов  
азота, содержащихся в соединении формулы (b-1), являются протонированными,  
10 при этом образуется соединение, обладающее положительным зарядом.

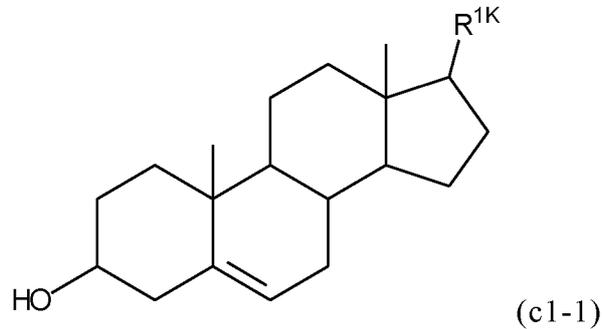
15. Препарат суспензии, соответствующий любому из параграфов 1-14, где наночастицы содержат ионизируемый липидоид (b-1), описывающийся следующей формулой (b-1b),



15 в которой  $\text{R}^{1\text{A}} - \text{R}^{6\text{A}}$  являются такими, как определено в параграфе 14,  
или его протонированную форму, где один или большее количество атомов  
азота, содержащихся в соединении формулы (b-1b), являются  
протонированными, при этом образуется соединение, обладающее  
положительным зарядом.

20 16. Препарат суспензии, соответствующий параграфу 14 или 15, где  $\text{R}^{1\text{A}} -$   
 $\text{R}^{6\text{A}}$  независимо выбраны из числа следующих: водород и  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}^{7\text{A}}$ , где  
 $\text{R}^{7\text{A}}$  выбран из числа следующих:  $\text{C}_8-\text{C}_{18}$ -алкил и  $\text{C}_8-\text{C}_{18}$ -алкенил, содержащий  
одну двойную связь  $\text{C}-\text{C}$ , при условии, что по меньшей мере два из остатков,  
предпочтительно по меньшей мере три из остатков и более предпочтительно по  
25 меньшей мере четыре из остатков  $\text{R}^{1\text{A}} - \text{R}^{6\text{A}}$  представляют собой  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-$   
 $\text{R}^{7\text{A}}$ , где  $\text{R}^{7\text{A}}$  выбран из числа следующих:  $\text{C}_8-\text{C}_{18}$ -алкил и  $\text{C}_8-\text{C}_{18}$ -алкенил,  
содержащий одну двойную связь  $\text{C}-\text{C}$ .

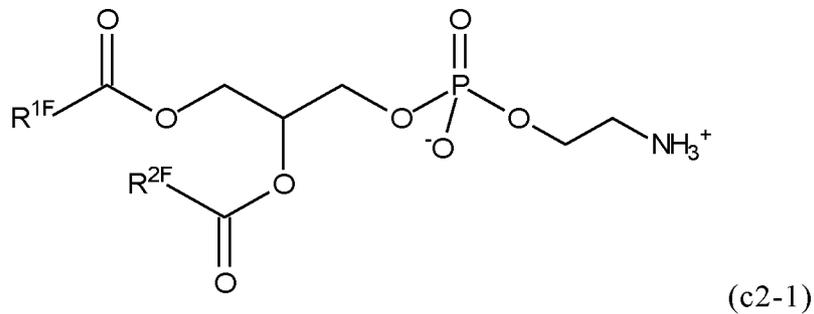
17. Препарат суспензии, соответствующий любому из параграфов 8-16, где наночастицы содержат неионизируемый липид, обладающий структурой стерина (с1) формулы (с1-1):



5 в которой R<sup>1K</sup> обозначает C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>-алкильную группу.

18. Препарат суспензии, соответствующий любому из параграфов 8-17, где неионизируемый липид, обладающий структурой стерина (с1-1), включает холестерин.

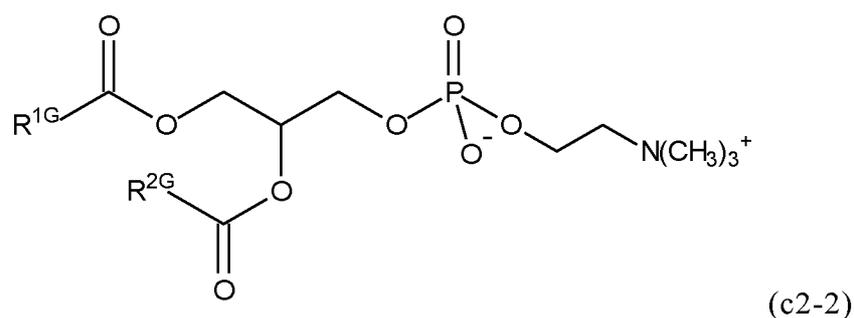
10 19. Препарат суспензии, соответствующий любому из параграфов 8-18, где наночастицы содержат глицерофосфолипид (с2) формулы (с2-1):



в которой

15 R<sup>1F</sup> и R<sup>2F</sup> независимо обозначают C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub>-алкильную группу или C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub>-алкенильную группу, предпочтительно C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>-алкильную группу или C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>-алкенильную группу, или его фармацевтически приемлемую соль;

или глицерофосфолипид (с2) формулы (с2-2):

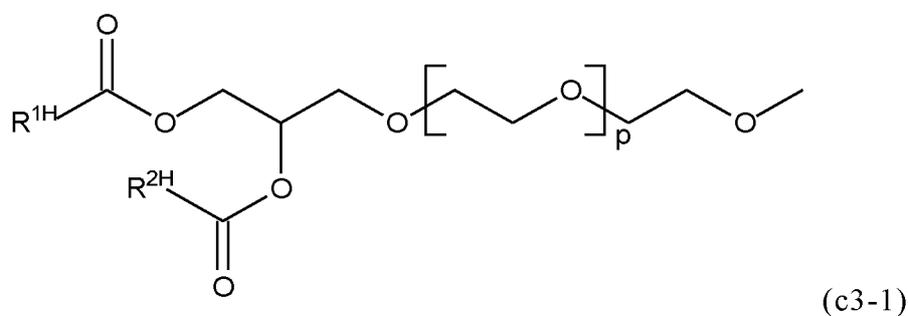


в которой

5  $R^{1G}$  и  $R^{2G}$  независимо обозначают  $C_8$ - $C_{18}$ -алкильную группу или  $C_8$ - $C_{18}$ -алкенильную группу, предпочтительно  $C_{12}$ - $C_{18}$ -алкильную группу или  $C_{12}$ - $C_{18}$ -алкенильную группу, или его фармацевтически приемлемую соль.

10 20. Препарат суспензии, соответствующий любому из параграфов 8-19, где глицерофосфолипид (с2) включает 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДПФХ) или его фармацевтически приемлемую соль.

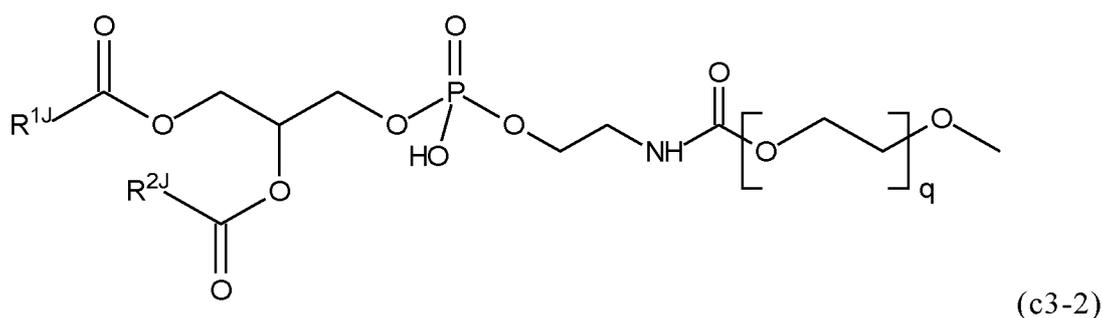
21. Препарат суспензии, соответствующий любому из параграфов 8-20, где наночастицы содержат конъюгированный с ПЭГ липид (с3) формулы (с3-1):



15 в которой

$R^{1H}$  и  $R^{2H}$  независимо обозначают  $C_8$ - $C_{18}$ -алкильную группу или  $C_8$ - $C_{18}$ -алкенильную группу, предпочтительно  $C_{12}$ - $C_{18}$ -алкильную группу или  $C_{12}$ - $C_{18}$ -алкенильную группу, и  $p$  обозначает целое число, равное от 5 до 200, предпочтительно от 10 до 100 и более предпочтительно от 20 до 60;

или конъюгированный с ПЭГ липид (с3) формулы (с3-2):



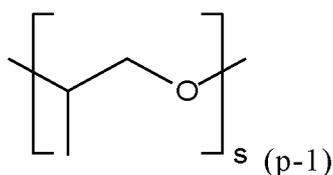
в которой

$R^{1J}$  и  $R^{2J}$  независимо обозначают  $C_8$ - $C_{18}$ -алкильную группу или  $C_8$ - $C_{18}$ -алкенильную группу, предпочтительно  $C_{12}$ - $C_{18}$ -алкильную группу или  $C_{12}$ - $C_{18}$ -алкенильную группу, и  $q$  обозначает целое число, равное от 5 до 200, предпочтительно от 10 до 100 и более предпочтительно от 20 до 60, или его фармацевтически приемлемую соль.

22. Препарат суспензии, соответствующий параграфу 21, где конъюгированный с ПЭГ липид (с3) включает 1,2-димиристоил-sn-глицерометокси(полиэтиленгликоль)-2000 (ДМГ-ПЭГ-2000).

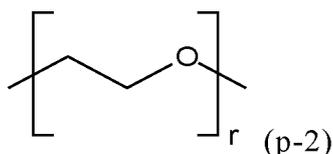
23. Препарат суспензии, соответствующий любому из параграфов 1-22, где в наночастицах отношение N/P находится в диапазоне от 0,5 до 20, более предпочтительно в диапазоне от 0,5 до 10.

24. Препарат суспензии, соответствующий любому из параграфов 1-23, где триблок-сополимером является триблок-сополимер А-В-А, который содержит один поли(пропиленоксидный) блок В формулы (p-1):



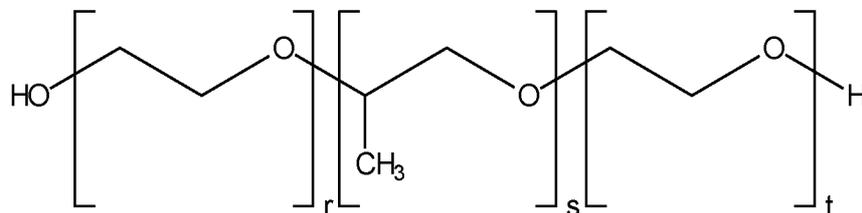
в которой  $s$  обозначает целое число, равное от 15 до 67, предпочтительно от 20 до 40, и

два поли(этиленоксидных) блока А формулы (p-2):



в которой  $g$  для каждого блока независимо обозначает целое число, равное от 2 до 130, предпочтительно от 50 до 100 и более предпочтительно от 60 до 90.

25. Препарат суспензии, соответствующий параграфу 24, где триблок-сополимер обладает следующей структурой:



где  $g$  и  $t$  независимо друг от друга обозначают целые числа, равные от 2 до 130, предпочтительно от 50 до 100 и более предпочтительно от 60 до 90, и  $s$  обозначает целое число, равное от 15 до 67, предпочтительно от 20 до 40.

26. Препарат суспензии, соответствующий параграфу 24 или 25, где триблок-сополимером является полоксамер P188.

27. Препарат суспензии, соответствующий любому из параграфов 1-26, который содержит триблок-сополимер при концентрации, равной от 0,05 до 5%, предпочтительно от 0,1 до 2% (мас./об., при температуре, равной 25°C) в пересчете на полный объем препарата суспензии.

28. Препарат суспензии, соответствующий любому из параграфов 1-27, где раствор разбавителя дополнительно содержит по меньшей мере один из следующих: сахароза или NaCl, более предпочтительно, если он содержит сахарозу и NaCl.

29. Способ получения препарата водной суспензии, предназначенного для получения аэрозоля, содержащего липидные или липидоподобные наночастицы которые суспендированы в водном растворе разбавителя, соответствующего параграфам 1-28, указанный способ включает стадию смешивания раствора, содержащего нуклеиновую кислоту (а), и раствора, содержащего ионизируемый липид или ионизируемый липидоид (b), с получением суспензии, содержащей липидные или липидоподобные наночастицы; стадию добавления к суспензии триблок-сополимера, который включает один поли(пропиленоксидный) блок и два поли(этиленоксидных) блока, определенного в предыдущих параграфах; и стадию тангенциального поточного фильтрования суспензии.

30. Препарат водной суспензии, предназначенный для получения аэрозоля, соответствующий любому из параграфов 1-28, который получают способом, соответствующим параграфу 29.

5 31. Распылитель, который включает отделение, в котором находится предназначенный для получения аэрозоля препарат водной суспензии, соответствующий любому из параграфов 1-28 или 30.

10 32. Распылитель, соответствующий параграфу 31, который выбран из числа следующих: струйный распылитель, мягко распыляющий ингалятор и меш-небулайзер, и который более предпочтительно представляет собой мягко распыляющий ингалятор или меш-небулайзер с вибрирующей сеткой.

15 33. Аэрозоль, включающий капельки аэрозоля, диспергированные в газовой фазе, где капельки аэрозоля содержат липидные или липидоподобные наночастицы и водный раствор разбавителя для наночастиц, где липидные или липидоподобные наночастицы содержат следующие компоненты (а) и (b):

(а) нуклеиновая кислота и

(b) ионизируемый липид или ионизируемый липидоид;

20 и где водный раствор разбавителя содержит триблок-сополимер, который включает один поли(пропиленоксидный) блок и два поли(этиленоксидных) блока.

34. Аэрозоль, соответствующий параграфу 33, где газовой фазой является воздух.

25 35. Аэрозоль, соответствующий параграфу 33 или 34, где среднемассовый аэродинамический диаметр (СМАД) капелек аэрозоля находится в диапазоне от 2 до 10 мкм, предпочтительно от 3 до 8 мкм.

36. Аэрозоль, соответствующий любому из параграфов 33-35, где нуклеиновая кислота выбрана из числа следующих: РНК и плазмидная ДНК.

30 37. Аэрозоль, соответствующий любому из параграфов 33-36, где нуклеиновая кислота выбрана из числа следующих: мРНК, киРНК, миРНК, антисмысловая РНК, тРНК и некодирующая РНК, и более предпочтительно, если нуклеиновой кислотой является мРНК.

38. Аэрозоль, соответствующий любому из параграфов 33-37, где наночастицы обладают Z-средним диаметром, определенным с помощью

динамического светорассеяния, находящимся в диапазоне от 10 до 500 нм, более предпочтительно в диапазоне от 10 до 250 нм, еще более предпочтительно от 20 до 200 нм.

39. Аэрозоль, соответствующий любому из параграфов 33-38, где  
5 наночастицы обладают индексом полидисперсности, определенным с помощью динамического светорассеяния, находящимся в диапазоне от 0,05 до 0,4, более предпочтительно в диапазоне от 0,05 до 0,2.

40. Аэрозоль, соответствующий любому из параграфов 33-39 где  
10 наночастицы дополнительно содержат один или большее количество следующих компонентов (с1) - (с6):

(с1) неионизируемый липид, обладающий структурой стерина;

(с2) глицерофосфолипид;

(с3) конъюгированный с ПЭГ липид;

(с4) конъюгированный с полисаркозином липид:

15 (с5) ПАСилированный липид; и

(с6) катиногенный полимер.

41. Аэрозоль, соответствующий любому из параграфов 33-40, где наночастицы содержат:

20 от 30 до 65 мол.% ионизируемого липида или ионизируемого липидоида (b) и один или большее количество следующих компонентов:

от 10 до 50 мол.% липида, обладающего структурой стерина (с1),

от 4 до 50 мол.% глицерофосфолипид (с2),

от 0,5 до 10 мол.% одного из следующих: конъюгированный с ПЭГ липид (с3),

конъюгированный с полисаркозином липид (с4) и ПАСилированный липид (с5),

25 или любой их комбинации,

от 0,5 до 10 мол.% катиногенного полимера (с6),

при этом сумма содержаний (b) и (с1) - (с6) составляет 100 мол.%.

42. Аэрозоль, соответствующий любому из параграфов 33-39, где наночастицы дополнительно содержат следующие компоненты (с1) - (с3):

30 (с1) неионизируемый липид, обладающий структурой стерина;

(с2) глицерофосфолипид; и

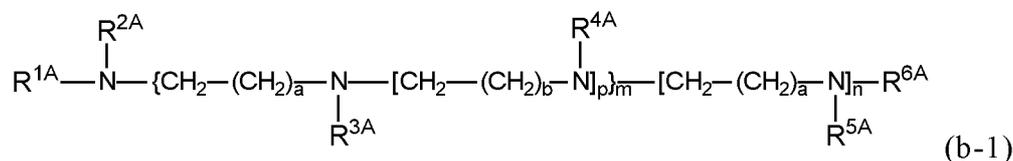
(с3) конъюгированный с ПЭГ липид.

43. Аэрозоль, соответствующий параграфу 42, где наночастицы содержат: от 30 до 65 мол.% ионизируемого липида или ионизируемого липидоида (b), от 10 до 50 мол.% липида, обладающего структурой стерина (с1), от 4 до 50 мол.% глицерофосфолипида (с2), и  
 5 от 0,5 до 10 мол.% конъюгированного с ПЭГ липида (с3), при этом сумма содержаний (b) и (с1) - (с3) составляет 100 мол.%.

44. Аэрозоль, соответствующий любому из параграфов 33-43, где наночастицы дополнительно содержат полианионный компонент, который отличается от нуклеиновой кислоты.

10 45. Аэрозоль, соответствующий любому из параграфов 33-44, где состав наночастиц является таким, что в наночастицах отношение суммы масс компонентов, отличающихся от нуклеиновой кислоты, к массе нуклеиновой кислоты находится в диапазоне от 30:1 до 1:1, более предпочтительно от 20:1 до 2:1 и наиболее предпочтительно от 15:1 до 3:1.

15 46. Аэрозоль, соответствующий любому из параграфов 33-45, где наночастицы содержат ионизируемый липидоид (b), описываемый следующей формулой (b-1),



в которой:

20 а равно 1 и b обозначает целое число, равное от 2 до 4; или а обозначает целое число, равное от 2 до 4, и b равно 1,

р равно 1 или 2,

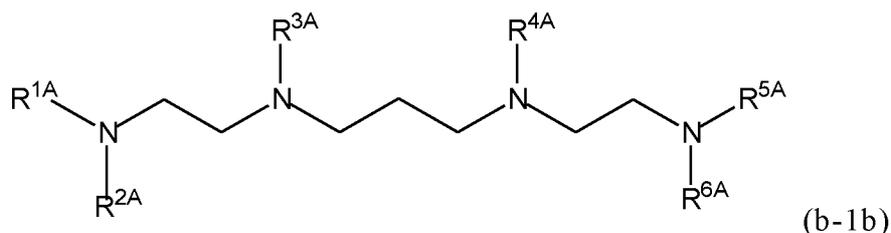
m равно 1 или 2; n равно 0 или 1 и m+n ≥ 2; и

25 R<sup>1A</sup> - R<sup>6A</sup> независимо друг от друга выбраны из числа следующих: водород; -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7A</sup>, -CH(R<sup>7A</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7A</sup>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-NH-R<sup>7A</sup>; -CH<sub>2</sub>-R<sup>7A</sup>; -C(NH)-NH<sub>2</sub>; цепь поли(этиленгликоля) и лиганд рецептора; где R<sup>7A</sup> выбран из числа следующих: C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub>-алкил и C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub>-алкенил, содержащий одну двойную связь C=C;

30 при условии, что по меньшей мере два из остатков R<sup>1A</sup> - R<sup>6A</sup> выбраны из числа следующих: -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7A</sup>, -CH(R<sup>7A</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7A</sup>,

$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-\text{R}^{7\text{A}}$  и  $-\text{CH}_2-\text{R}^{7\text{A}}$ , где  $\text{R}^{7\text{A}}$  выбран из числа следующих:  $\text{C}_3$ - $\text{C}_{18}$ -алкил и  $\text{C}_3$ - $\text{C}_{18}$ -алкенил, содержащий одну двойную связь  $\text{C}-\text{C}$ ;  
или его протонированную форму, где один или большее количество атомов азота, содержащихся в соединении формулы (b-1), являются протонированными,  
5 при этом образуется соединение, обладающее положительным зарядом.

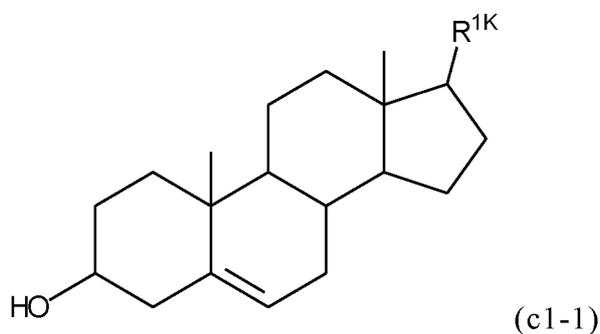
47. Аэрозоль, соответствующий параграфу 46, где наночастицы содержат ионизируемый липидоид (b), описываемый следующей формулой (b-1b),



в которой  $\text{R}^{1\text{A}} - \text{R}^{6\text{A}}$  являются такими, как определено в параграфе 46,  
10 или его протонированную форму, где один или большее количество атомов азота, содержащихся в соединении формулы (b-1b), являются протонированными, при этом образуется соединение, обладающее положительным зарядом.

48. Аэрозоль, соответствующий параграфу 46 или 47, где  $\text{R}^{1\text{A}} - \text{R}^{6\text{A}}$   
15 независимо выбраны из числа следующих: водород и  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}^{7\text{A}}$ , где  $\text{R}^{7\text{A}}$  выбран из числа следующих:  $\text{C}_8$ - $\text{C}_{18}$ -алкил и  $\text{C}_8$ - $\text{C}_{18}$ -алкенил, содержащий одну двойную связь  $\text{C}-\text{C}$ , при условии, что по меньшей мере два из остатков, предпочтительно по меньшей мере три из остатков и более предпочтительно по меньшей мере четыре из остатков  $\text{R}^{1\text{A}} - \text{R}^{6\text{A}}$  представляют собой  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}^{7\text{A}}$ ,  
20 где  $\text{R}^{7\text{A}}$  выбран из числа следующих:  $\text{C}_8$ - $\text{C}_{18}$ -алкил и  $\text{C}_8$ - $\text{C}_{18}$ -алкенил, содержащий одну двойную связь  $\text{C}-\text{C}$ .

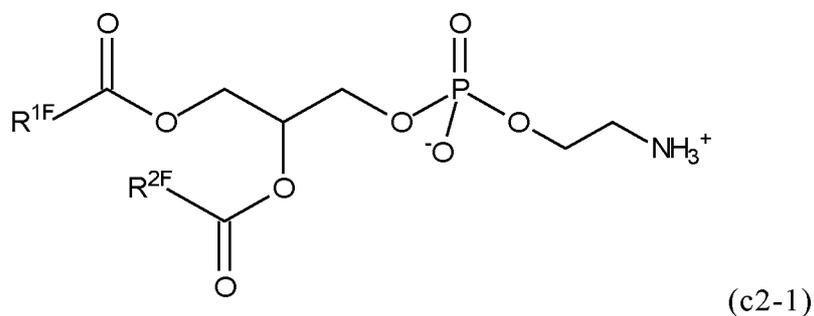
49. Аэрозоль, соответствующий любому из параграфов 40-48, где наночастицы содержат неионизируемый липид, обладающий структурой стерина (с1) формулы (с1-1):



5 в которой  $R^{1K}$  обозначает  $C_3$ - $C_{12}$ -алкильную группу.

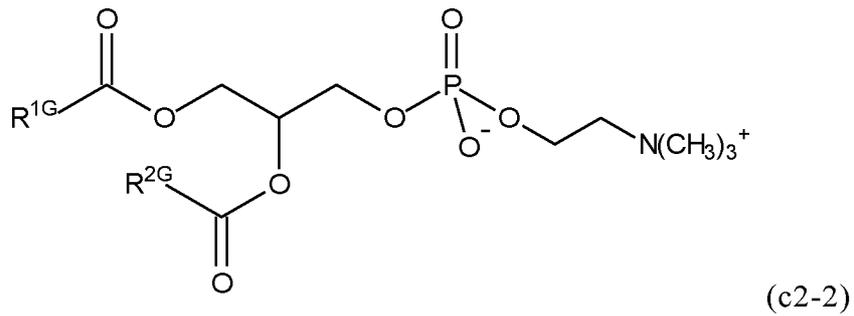
50. Аэрозоль, соответствующий любому из параграфов 40-49, где неионизируемый липид, обладающий структурой стерина (с1), включает холестерин.

10 51. Аэрозоль, соответствующий любому из параграфов 40-50, где наночастицы содержат глицерофосфолипид (с2) формулы (с2-2):



15 в которой  $R^{1F}$  и  $R^{2F}$  независимо обозначают  $C_8$ - $C_{18}$ -алкильную группу или  $C_8$ - $C_{18}$ -алкенильную группу, предпочтительно  $C_{12}$ - $C_{18}$ -алкильную группу или  $C_{12}$ - $C_{18}$ -алкенильную группу, или его фармацевтически приемлемую соль;

или глицерофосфолипид (с2) формулы (с2-2):

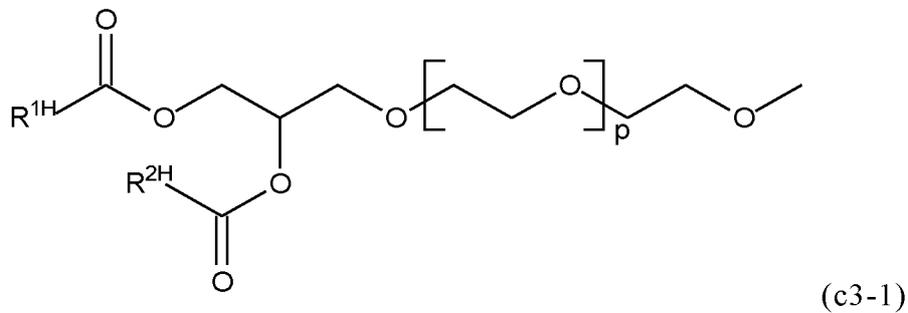


в которой

5  $R^{1G}$  и  $R^{2G}$  независимо обозначают  $C_8$ - $C_{18}$ -алкильную группу или  $C_8$ - $C_{18}$ -алкенильную группу, предпочтительно  $C_{12}$ - $C_{18}$ -алкильную группу или  $C_{12}$ - $C_{18}$ -алкенильную группу, или его фармацевтически приемлемую соль.

10 52. Аэрозоль, соответствующий любому из параграфов 40-51, где глицерофосфолипид (с2) включает 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДПФХ) или его фармацевтически приемлемую соль.

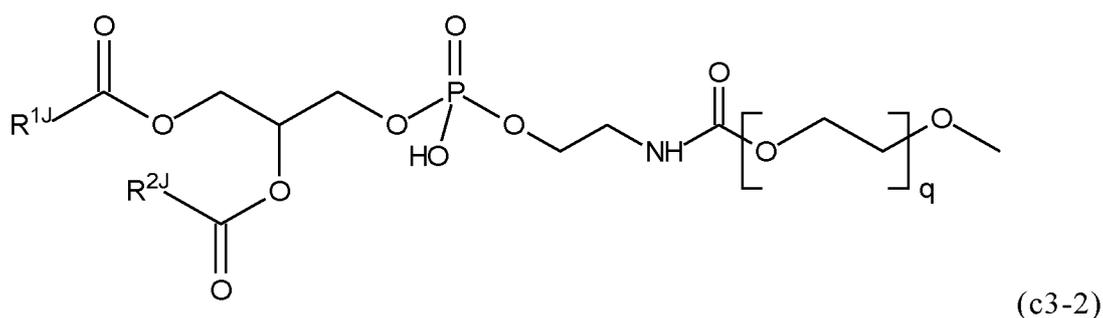
53. Аэрозоль, соответствующий любому из параграфов 40-52, где наночастицы содержат конъюгированный с ПЭГ липид (с3) формулы (с3-1):



15 в которой

$R^{1H}$  и  $R^{2H}$  независимо обозначают  $C_8$ - $C_{18}$ -алкильную группу или  $C_8$ - $C_{18}$ -алкенильную группу, предпочтительно  $C_{12}$ - $C_{18}$ -алкильную группу или  $C_{12}$ - $C_{18}$ -алкенильную группу, и  $p$  обозначает целое число, равное от 5 до 200, предпочтительно от 10 до 100 и более предпочтительно от 20 до 60;

или конъюгированный с ПЭГ липид (с3) формулы (с3-2):



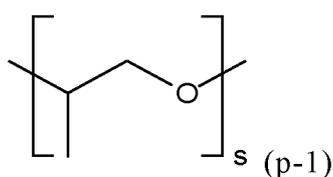
в которой

5  $R^{1J}$  и  $R^{2J}$  независимо обозначают  $C_8$ - $C_{18}$ -алкильную группу или  $C_8$ - $C_{18}$ -алкенильную группу, предпочтительно  $C_{12}$ - $C_{18}$ -алкильную группу или  $C_{12}$ - $C_{18}$ -алкенильную группу, и  $q$  обозначает целое число, равное от 5 до 200, предпочтительно от 10 до 100 и более предпочтительно от 20 до 60, или его фармацевтически приемлемую соль.

10 54. Аэрозоль, соответствующий параграфу 53, где конъюгированный с ПЭГ липид (с3) включает 1,2-димиристоил-sn-глицерометокси(полиэтиленгликоль)-2000 (ДМГ-ПЭГ-2000).

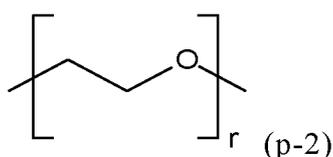
55. Аэрозоль, соответствующий любому из параграфов 33-54, где в наночастицах отношение N/P находится в диапазоне от 0,5 до 20.

15 56. Аэрозоль, соответствующий любому из параграфов 33-55, где триблок-сополимером является триблок-сополимер А-В-А, который содержит один поли(пропиленоксидный) блок В формулы (p-1):



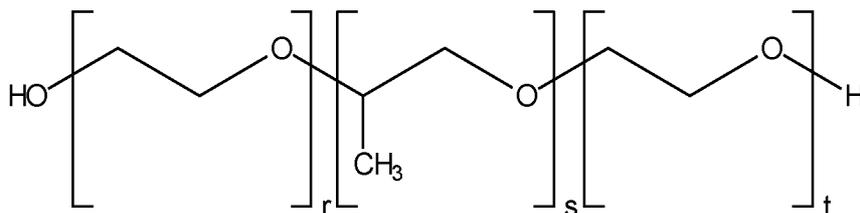
в которой  $s$  обозначает целое число, равное от 15 до 67, предпочтительно от 20 до 40 и

20 два поли(этиленоксидных) блока А формулы (p-2):



в которой  $r$  для каждого блока независимо обозначает целое число, равное от 2 до 130, предпочтительно от 50 до 100 и более предпочтительно от 60 до 90.

57. Аэрозоль, соответствующий параграфу 56, где триблок-сополимер обладает следующей структурой:



5 где r и t независимо друг от друга обозначают целые числа, равные от 2 до 130, предпочтительно от 50 до 100 и более предпочтительно от 60 до 90, и s обозначает целое число, равное от 15 до 67, предпочтительно от 20 до 40.

58. Аэрозоль, соответствующий параграфу 56 или 57, где триблок-сополимером является полуксамер P188.

10 59. Аэрозоль, соответствующий любому из параграфов 33-58, где раствор разбавителя дополнительно содержит по меньшей мере один из следующих: сахара или NaCl, более предпочтительно, если он содержит сахарозу и NaCl.

60. Аэрозоль, соответствующий любому из параграфов 33-59, который является получаемым путем распыления препарата водной суспензии, соответствующего любому из параграфов 1-28 и 30.

15 61. Способ получения аэрозоля, указанный способ включает стадию распыления препарата водной суспензии, предназначенного для получения аэрозоля, соответствующего любому из параграфов 1-28 и 30.

62. Способ, соответствующий параграфу 61, где аэрозолем является аэрозоль, соответствующий любому из параграфов 33-60.

20 63. Способ, соответствующий параграфу 61 или 62, где распыление проводят с помощью ингалятора, выбранного из числа следующих: струйный распылитель, мягко распыляющий ингалятор и меш-небулайзер, более предпочтительно с помощью мягко распыляющего ингалятора или меш-небулайзера с вибрирующей сеткой.

25 64. Препарат водной суспензии, соответствующий любому из параграфов 1-28 и 30, предназначенный для применения в качестве лекарственного средства, где препарат суспензии следует распылять и аэрозоль, полученный путем распыления, следует вводить субъекту.

30 65. Аэрозоль, соответствующий любому из параграфов 33-60, предназначенный для применения в качестве лекарственного средства.

66. Препарат водной суспензии, соответствующий любому из параграфов 1-28 и 30, предназначенный для применения для лечения или предупреждения заболевания или нарушения с помощью терапии на основе нуклеиновой кислоты, где лечение или предупреждение включает распыление препарата водной суспензии и введение аэрозоля, полученного путем распыления, в или через дыхательные пути субъекта, предпочтительно посредством введения в легкие или назального введения.

67. Аэрозоль, соответствующий любому из параграфов 33-60, предназначенный для применения для лечения или предупреждения заболевания или нарушения с помощью терапии на основе нуклеиновой кислоты, где лечение или предупреждение включает введение аэрозоля в или через дыхательные пути субъекта, предпочтительно посредством введения в легкие или назального введения.

68. Препарат водной суспензии, предназначенный для применения, соответствующего параграфу 66, или аэрозоль, предназначенный для применения, соответствующего параграфу 67, где заболеванием или нарушением, которое лечат или предупреждают, является заболевание легких.

69. Способ лечения, включающий распыление препарата водной суспензии, соответствующего любому из параграфов 1-28 и 30, и введение аэрозоля, полученного путем распыления, в или через дыхательные пути субъекта, предпочтительно посредством введения в легкие или назального введения.

70. Способ лечения, включающий введение аэрозоля, соответствующего любому из параграфов 33-60, в или через дыхательные пути субъекта, предпочтительно посредством введения в легкие или назального введения.

71. Способ, соответствующий параграфу 69 или 70, предназначенный для лечения заболевания легких.

Следует понимать, что краткое описание, приведенное в представленных выше параграфах, является частью общего раскрытия настоящего изобретения, при этом сведения, приведенные в представленном ниже подробном описании, например, в отношении других предпочтительных вариантов осуществления или необязательных характеристик, также применимы к приведенным выше параграфам, и наоборот.

Ниже приведено подробное описание настоящего изобретения. Для специалиста в данной области техники должно быть очевидно, что, если в конкретном контексте не указано иное, сведения, приведенные в этом контексте применимы ко всем объектам настоящего изобретения, включая препарат водной суспензии, предназначенный для получения аэрозоля, предлагаемый в настоящем изобретении (который в настоящем изобретении может называться "препаратом водной суспензии" или просто "препаратом суспензии"), аэрозоль, предлагаемый в настоящем изобретении, и способы и случаи применения, которые относятся к препарату суспензии или аэрозолю.

Сначала будут описаны наночастицы и их компоненты. Препарат водной суспензии, предназначенный для получения аэрозоля, и аэрозоль, предлагаемые в настоящем изобретении, содержат липидные наночастицы или липидоподобные наночастицы. Таким образом, если явно не указано иное, в контексте настоящего изобретения указание на "наночастицы" или на "ЛНЧ" включает указание на липидные наночастицы, а также липидоподобные наночастицы. Кроме того, поскольку аэрозоль, предлагаемый в настоящем изобретении, обычно можно получить с использованием препарата водной суспензии, следует понимать, что в контексте настоящего изобретения сведения, приведенные для компонентов наночастиц, применимы к наночастицам, содержащимся в препарате, предназначенном для получения аэрозоля, предлагаемом в настоящем изобретении, и к наночастицам, содержащимся в аэрозоле, предлагаемом в настоящем изобретении.

Наночастицы, содержащиеся в препарате, предназначенном для получения аэрозоля, предлагаемом в настоящем изобретении, и наночастицы, содержащиеся в аэрозоле, предлагаемом в настоящем изобретении в качестве компонента (а) содержат нуклеиновую кислоту, которая обычно является фармацевтически активным ингредиентом наночастиц.

На природу нуклеиновой кислоты не налагаются особые ограничения. В принципе, в контексте настоящего изобретения можно применять нуклеиновую кислоту любого типа. Нуклеиновые кислоты известны специалисту в данной области техники и они означают биополимеры или малые биомолекулы, состоящие из нуклеотидов, которые являются мономерами, состоящими из трех

компонентов: содержащий 5 атомов углерода сахар, фосфатная группа и азотистое основание.

Термин "нуклеиновая кислота" является общим для обозначения ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) и РНК (рибонуклеиновая кислота), т. е. 5 представителей указано выше семейства биополимеров. Если сахаром является рибоза, то полимером является РНК, если сахар образован из такой рибозы, как дезоксирибоза, то полимером является ДНК. Термин "нуклеиновая кислота" включает олигонуклеотиды или полинуклеотиды. Поскольку нуклеиновая кислота представляет собой полимер, состоящий из нуклеотидов, термин 10 "нуклеиновая кислота" часто означает "последовательность нуклеотидов" и, соответственно, для специалиста в данной области техники должно быть очевидно, что термины "нуклеиновая кислота" и "последовательность нуклеотидов" часто используют взаимозаменяемым образом.

В предпочтительном варианте осуществления наночастицы, содержащиеся 15 в препарате водной суспензии, предлагаемом в настоящем изобретении, и в аэрозоле, предлагаемом в настоящем изобретении, в качестве нуклеиновой кислоты содержат рибонуклеиновую кислоту (РНК), более предпочтительно одноцепочечную РНК и наиболее предпочтительно мРНК.

Термин "нуклеиновая кислота" включает все формы природных 20 нуклеиновых кислот, а также нуклеиновые кислоты, полученные путем химического и/или ферментативного синтеза, термин также включает аналоги нуклеиновых кислот и производные нуклеиновых кислот. В частности, термин включает любые включающие модифицированную основную цепь, модифицированный сахар или модифицированное основание одноцепочечные 25 или двухцепочечные нуклеиновые кислоты, такие как, например, замкнутые нуклеиновые кислоты (ЗНК), пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК), тиофосфаты и трифосфаты олигонуклеозидов, морфолиноолигонуклеотиды, катионогенные олигонуклеотиды (US 6017700 A, WO 2007/069092), замещенные рибоолигонуклеотиды или фосфоротиоатолигонуклеотиды. Кроме того, термин 30 "нуклеиновая кислота" также означает любую молекулу, которая содержит нуклеотиды или аналоги нуклеотидов. На последовательность или размер нуклеиновой кислоты, содержащейся в наночастицах, предлагаемых в настоящем изобретении, не накладываются ограничения. Нуклеиновая кислота

главным образом определена биологическим воздействием, которое необходимо обеспечить в биологической мишени, в которую доставляют наночастицы, предлагаемые в настоящем изобретении. Так, например, как это более подробно описано ниже, в случае применения в генной терапии или терапии с помощью нуклеиновой кислоты, нуклеиновая кислота или последовательность нуклеиновой кислоты может быть определена геном или фрагментом гена, который необходимо экспрессировать, или необходимой заменой или исправлением дефектного гена, или любой целевой последовательностью гена или целевой последовательностью гена, который необходимо ингибировать, удалить, понизить или повысить уровень его экспрессии

Наночастицы, содержащиеся в суспензии и аэрозоле, предлагаемых в настоящем изобретении, могут содержать нуклеиновую кислоту, которой является молекула ДНК. Предпочтительным вариантом осуществления такой молекулы ДНК является молекула ДНК, которую можно транскрибировать в молекулу мРНК. Транскрипция является первой стадией процесса экспрессии гена, на которой определенный сегмент молекулы ДНК копируется в молекулу мРНК с помощью фермента, РНК-полимеразы. Во время транскрипции последовательность ДНК считывается РНК-полимеразой и формирует комплементарную антипараллельную цепь РНК, называемую первичным транскриптом.

Молекулу ДНК, предлагаемую в настоящем изобретении, можно включить в вектор, предпочтительно в вектор экспрессии, по стандартным методикам молекулярной биологии (см., например, публикацию Sambrook et al., *Molecular Cloning, A laboratory manual*, 2nd Ed, 1989). В контексте настоящего изобретения термин "вектор", такой как "вектор экспрессии" или "клонированный вектор", означает кольцевой двухцепочечный фрагмент ДНК, который предпочтительно может реплицироваться в клетке независимо от хромосомной ДНК, и который используют в качестве средства переноса генетического материала в клетку, в которой он может (реплицироваться и/или) экспрессироваться (т. е. транскрибироваться в РНК и транслироваться в последовательность аминокислот). Вектор, содержащий чужеродную ДНК, называется рекомбинантной ДНК. Сам вектор обычно представляет собой последовательность ДНК, которая обычно состоит из вставки (например,

молекула нуклеиновой кислоты/молекула ДНК, предлагаемая в настоящем изобретении) и более крупной последовательности, которая выступает в роли "основной цепи" вектора. Плазмиды наиболее часто встречаются в бактериях и их используют в исследованиях с использованием рекомбинантной ДНК для переноса генов между клетками и при использовании в настоящем изобретении они представляют собой подгруппу "векторов".

Для специалиста в данной области техники должно быть очевидно, что в молекулу ДНК, предлагаемую в настоящем изобретении, можно ввести другие регуляторные последовательности. Так, например, можно использовать усилители транскрипции и/или последовательности, которые обеспечивают возможность индуцирования экспрессии. Подходящей вводимой системой является, например, система, основанная на регулируемой тетрациклином экспрессии гена, описанная, например, в публикациях Gossen and Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 5547-5551, и Gossen, Trends Biotech. 12 (1994), 58-62, или система, основанная на индуцируемой дексаметазоном экспрессии гена, описанная, например, в публикации Crook, EMBO J. 8 (1989), 513-519. В настоящем изобретении также можно использовать вектор, такой как вектор экспрессии, содержащий молекулу ДНК. Вектором может являться, например, плазмид, космид, вирус, бактериофаг или другой вектор, обычно использующийся, например, в генной инженерии, и он может включать дополнительные гены, такие как геномные маркеры, которые обеспечивают возможность селекции указанного вектора в подходящей клетке-хозяине и при подходящих условиях.

Если нуклеиновой кислотой, используемой в контексте настоящего изобретения, является молекула ДНК, то ей может являться молекула плазмидной ДНК (пДНК).

Как отмечено выше, наночастицы, содержащиеся в препарате водной суспензии, предлагаемом в настоящем изобретении, и в аэрозоле, предлагаемом в настоящем изобретении, в качестве нуклеиновой кислоты содержат предпочтительно содержат рибонуклеиновую кислоту (РНК), более предпочтительно одноцепочечную РНК и наиболее предпочтительно мРНК.

В отношении РНК, в контексте настоящего изобретения, в принципе, можно использовать РНК любого типа. В предпочтительном варианте

осуществления РНК представляет собой одноцепочечную РНК. Термин "одноцепочечная РНК" означает одну цепь последовательно расположенных рибонуклеотидов, в отличие от молекул РНК, в которых две или большее количество отдельных цепей вследствие гибридизации отдельных цепей образуют двухцепочечную молекулу. Термин "одноцепочечная РНК" не исключает случаи, когда одноцепочечные структуры образуют внутри себя двухцепочечные структуры, такие как вторичные (например, петли или ствольные петли) или третичные структуры. Примерами являются тРНК и мРНК, а также одноцепочечная РНК любого другого типа, такая как антисмысловая РНК, киРНК и т. п.

Термин "РНК" включает РНК, которая кодирует последовательность аминокислот, а также РНК, которая не кодирует последовательность аминокислот. Полагают, что более 80% генома содержит функциональные элементы ДНК, которые не кодируют белки. Эти некодирующие последовательности включают регуляторные элементы ДНК (сайты связывания с факторами транскрипции, регуляторы и сорегуляторы и т. п.) и последовательности, которые кодируют транскрипты, которые никогда не транслируются с образованием белков. Эти транскрипты, которые кодируются геномом и транскрибируются в РНК, но не транслируются с образованием белков, называются некодирующими РНК (нкРНК). Таким образом, в одном варианте осуществления РНК представляет собой некодирующую РНК. Предпочтительно, если некодирующая РНК представляет собой одноцепочечную молекулу. Результаты исследований показывают, что нкРНК играют критически важную роль в регуляции гена, сохранении целостности генома, дифференциации клеток и развитии, и они неправильно регулируются при различных заболеваниях человека. Существуют нкРНК различных типов: короткие (20-50 нуклеотидов), обладающие средней длиной (50-200 нуклеотидов) и длинные (>200 нуклеотидов) нкРНК. Короткие нкРНК включают микро-РНК (миРНК), короткую интерферирующую РНК (киРНК), взаимодействующую с Рiwi РНК (рiRNA) и иницирующую транскрипцию РНК (итРНК). Примерами обладающих средней длиной нкРНК являются малые ядерные РНК (мяРНК), малые ядрышковые РНК (мякРНК), транспортные РНК (тРНК), связанные с сайтом начала транскрипции РНК (ССНТ-РНК), связанные с

промотором малые РНК (ССП-РНК) и образующиеся после промотора транскрипты (PROMPT). Длинные некодирующие РНК (днкРНК) включают длинную межгенную некодирующую РНК (дмнкРНК), антисмысловую днкРНК, интронную днкРНК, транскрибированные высококонсервативные РНК (Т-UCR) и другие (Bhan A, Mandal SS, ChemMedChem. 2014 Mar 26. doi: 10.1002/cmdc.201300534). Из числа указанных выше некодирующих РНК только киРНК является двухцепочечной. Таким образом, поскольку в предпочтительном варианте осуществления некодирующая РНК является одноцепочечной, предпочтительно, если некодирующей РНК не является киРНК. В другом варианте осуществления РНК представляет собой кодирующую РНК, т. е. РНК, которая кодирует последовательность аминокислот. Такие молекулы РНК также называются мРНК (матричная (информационная) РНК) и они являются одноцепочечными молекулами РНК. РНК можно получить с использованием методологий химического и ферментативного синтеза, известных специалисту с общей подготовкой в данной области техники, или с использованием рекомбинантной технологии, или их можно выделить из природных источников, или с использованием комбинации этих подходов .

Матричные РНК (мРНК) представляют собой сополимеры, которые состоят из структурных фрагментов - нуклеозидфосфатов, в качестве нуклеозидов в основном содержащих аденозин, цитидин, уридин и гуанозин, которые, выступая в роли промежуточных носителей, переносят генетическую информацию от ДНК, содержащейся в ядре клетки, в цитоплазму, где они транслируются с образованием белков. Поэтому они являются подходящими альтернативными средствами для экспрессии гена.

В контексте настоящего изобретения "мРНК" означает любую молекулу полирибонуклеотида, которая при попадании в клетку является подходящей для экспрессии белка или его фрагмента, или может транслироваться с образованием белка или его фрагмента. В настоящем изобретении термин "белок" включает последовательность аминокислот любого типа, т. е. цепи, состоящие из двух или большего количества аминокислот, которые все связаны пептидными связями, а также включает пептиды и гибридные белки.

мРНК содержит последовательность рибонуклеотидов, которая кодирует белок или его фрагмент, действие которого в клетке или в окружающей клетку

среде является необходимым или благоприятным, например, белок, отсутствие или наличие дефектной формы которого, вызывает заболевание или расстройство, наличие которого может ослабить или предупредить заболевание или нарушение, или белок, который может способствовать протекающему в

5 клетке или в окружающей клетку среде процессу, который является благоприятным для организма. мРНК может содержать последовательность, необходимую для получения полноразмерного белка или его функционального варианта. Кроме того, последовательность рибонуклеотидов может кодировать белок, который действует, как фактор, индуцирующий фактор, регулятор,

10 стимулятор или фермент, или его функциональный фрагмент, где этот белок представляет собой такой, действие которого является необходимым для устранения нарушения, в частности, метаболического нарушения, или для инициирования процессов *in vivo*, таких как образования новых кровеносных сосудов, тканей и т. п. Примеры белков, которые могут кодироваться с помощью

15 мРНК, включают антитела, цитокины или хемокины. В настоящем изобретении функциональный вариант означает фрагмент, который в клетке может выполнять функцию белка, действие которого в клетке является необходимым, или отсутствие или наличие дефектной формы которого является патогенным. Кроме того, мРНК также может содержать дополнительные функциональные участки

20 и/или 3'- или 5'-некодирующие участки, в частности 3'- и/или 5'- НТО (нетранслируемая область). 3'- или 5'-Некодирующие участки могут представлять собой участки, которые по своей природе примыкают к кодирующей белок последовательности, или искусственные последовательности, например, последовательности, которые способствуют стабилизации РНК.

25 Специалисты в данной области техники могут определить последовательность, подходящую в каждом случае для этой цели, путем проведения стандартных экспериментов.

В предпочтительном варианте осуществления мРНК содержит кэп-структуру на 5'-конце (пять-штрих-кэп; кэп-0), состоящую из m<sup>7</sup>GpppG,

30 соединенных с мРНК с помощью 5'-5'-трифосфатного мостика, дополнительную метильную группу, присоединенную к предпоследнему нуклеотиду, начиная с 5'-конца мРНК (кэп-1, антиинвертированный аналог кэп-структуры (ARCA)), и/или внутренний участок внутренней посадки рибосомы (IRES) и/или поли(А)-

хвост на 3'-конце, в частности для улучшения трансляции. мРНК может содержать другие участки, способствующие трансляции, такие как, например, структуры кэп-2 или гистоновые структуры типа ствол-петля.

РНК, которая может содержаться в препарате суспензии и аэрозоле, предлагаемых в настоящем изобретении, может включать немодифицированные и модифицированные нуклеотиды. Термин "немодифицированный нуклеотид" при использовании в настоящем изобретении означает нуклеотиды А, С, G и U. Термин "модифицированный нуклеотид" при использовании в настоящем изобретении означает любые природные или синтетические изомеры нуклеотидов А, С, G и U, а также их любые природные или синтетические аналоги, измененный или модифицированный нуклеотид или его изомер, содержащий, например, химически модифицированные или замещенные остатки. Модифицированные нуклеотиды могут содержать модифицированное основание и/или модифицированный сахар. Модифицированные нуклеотиды также могут содержать модифицированные фосфатные группы, например, в кэп-структуре на 5'-конце молекулы мРНК. Модифицированные нуклеотиды также включают нуклеотиды, которые синтезированы после транскрипции путем ковалентной модификации нуклеотидов. Кроме того, возможна любая подходящая смесь немодифицированных и модифицированных нуклеотидов. Неограниченное количество примеров модифицированных нуклеотидов описано в литературе (например, US 2013/0123481 A1; Cantara et al., *Nucleic Acids Res*, 2011, 39 (Issue suppl\_1):D195-D201; Helm and Alfonzo, *Chem Biol*, 2014, 21 (2):174-185; или Carell et al., *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51 (29):7110-31) и ниже в качестве примера приведены некоторые предпочтительные модифицированные нуклеотиды с учетом их соответствующего нуклеозидного остатка:

1-метиладенозин, 2-метилтио- $N_6$ -гидроксинорвалилкарбамоиладенозин, 2-метиладенозин, 2'-О-рибозиладенозинфосфат,  $N_6$ -метил- $N_6$ -треонилкарбамоиладенозин,  $N_6$ -ацетиладенозин,  $N_6$ -глицинилкарбамоиладенозин,  $N_6$ -изопентиладенозин,  $N_6$ -метиладенозин,  $N_6$ -треонилкарбамоиладенозин,  $N_6, N_6$ -диметиладенозин,  $N_6$ -(цис-гидроксиизопентил)аденозин,  $N_6$ -гидроксинорвалилкарбамоиладенозин, 1,2'-О-диметиладенозин,  $N_6, 2'$ -О-диметиладенозин, 2'-О-метиладенозин,  $N_6, N_6, 2'$ -О-

триметиладенозин, 2-метилтио-N6-(цис-гидроксиизопентил)аденозин, 2-метилтио-N6-метиладенозин, 2-метилтио-N6-изопентиладенозин, 2-метилтио-N6-треонилкарбамоиладенозин, N6-2-метилтио-N6-треонилкарбамоиладенозин, 2-метилтио-N6-(цис-гидроксиизопентил)аденозин, 7-метиладенозин, 2-метилтиоаденозин, 2-метоксиаденозин, 2'-амино-2'-дезоксияденозин, 2'-азидо-2'-дезоксияденозин, 2'-фтор-2'-дезоксияденозин, 2-аминопурин, 2,6-диаминопурин, 7-дезааденозин, 7-деза-8-азааденозин, 7-деза-2-аминопурин, 7-деза-8-аза-2-аминопурин, 7-деза-2,6-диаминопурин, 7-деза-8-аза-2,6-диаминопурин; 2-тиоцитидин, 3-метилцитидин, N4-ацетилцитидин, 5-формилцитидин, N4-метилцитидин, 5-метилцитидин, 5-гидроксиметилцитидин, 5-гидроксицитидин, лизидин, N4-ацетил-2'-О-метилцитидин, 5-формил-2'-О-метилцитидин, 5,2'-О-диметилцитидин, 2-О-метилцитидин, N4,2'-О-диметилцитидин, N4,N4,2'-О-триметилцитидин, изоцитидин, псевдоцитидин, псевдоизоцитидин, 2-тиоцитидин, 2'-метил-2'-дезоксияцитидин, 2'-амино-2'-дезоксияцитидин, 2'-фтор-2'-дезоксияцитидин, 5-йодцитидин, 5-бромцитидин, 2'-азидо-2'-дезоксияцитидин, 2'-амино-2'-дезоксияцитидин, 2'-фтор-2'-дезоксияцитидин, 5-азацитидин, 3-метилцитидин, 1-метилпсевдоизоцитидин, пирролоцитидин, пирролопсевдоизоцитидин, 2-тио-5-метилцитидин, 4-тиопсевдоизоцитидин, 4-тио-1-метилпсевдоизоцитидин, 4-тио-1-метил-1-дезапсевдоизоцитидин, 1-метил-1-дезапсевдоизоцитидин, 2-метоксицитидин, 2-метокси-5-метилцитидин, 4-метоксипсевдоизоцитидин, 4-метокси-1-метилпсевдоизоцитидин, цебуларин, 5-азацебуларин, 5-метилцебуларин, 5-аза-2-тиоцебуларин, 2-тиоцебуларин; 1-метилгуанозин, N2,7-диметилгуанозин, N2-метилгуанозин, 2'-О-рибозилгуанозинфосфат, 7-метилгуанозин, гидроксивибутозин, 7-аминометил-7-дезагуанозин, 7-циано-7-дезагуанозин, N2,N2-диметилгуанозин, N2,7,2'-О-триметилгуанозин, N2,2'-О-диметилгуанозин, 1,2'-О-диметилгуанозин, 2'-О-метилгуанозин, N2,N2,2'-О-триметилгуанозин, N2,N2,7-триметилгуанозин, изогуанозин, 4-диметилвиозин, эпоксиквеуозин, полностью модифицированный гидроксивибутозин, метилированный полностью модифицированный гидроксивибутозин, изовиозин, перроксивибутозин, галактозилквеуозин, маннозилквеуозин, квеуозин, археозин, вибутозин, метилвиозин, виозин, 7-аминокарбокситропилдиметилвиозин, 7-аминокарбокситропилвиозин,

метилловый эфир 7-аминокарбоксивпропилвиозина, 7-деазагуанозин, 7-деаза-8-азагуанозин, 6-тиогуанозин, 6-тио-7-деазагуанозин, 6-тио-7-деаза-8-азагуанозин, 7-метилгуанозин, 6-тио-7-метилгуанозин, 7-метиринозин, 6-метоксигуанозин, 1-метилгуанозин, 8-оксогуанозин, 7-метил-8-оксогуанозин, 1-метил-6-тиогуанозин, N2-метил-6-тиогуанозин, N2,N2-диметил-6-тиогуанозин, N1-метилгуанозин, 2'-амино-3'-дезоксигуанозин, 2'-азидо-2'-дезоксигуанозин, 2'-фтор-2'-дезоксигуанозин, 2-тиоурин, 3-(3-амино-3-карбоксивпропил)урин, 3-метилурин, 4-тиоурин, 5-метил-2-тиоурин, 5-метиламинометилурин, 5-карбоксивметилурин, 5-карбоксивметиламинометилурин, 5-гидроксиурин, 5-метилурин, 5-тауринметилурин, 5-карбамоилметилурин, метилловый эфир 5-(карбоксивгидроксиметил)уридина, дигидроурин, 5-метилдигидроурин, 5-метиламинометил-2-тиоурин, 5-(карбоксивгидроксиметил)урин, метилловый эфир 5-(карбоксивгидроксиметил)-2'-О-метилуридина, 5-(изопентиламинометил)урин, 5-(изопентиламинометил)-2-тиоурин, 3,2'-О-диметилурин, 5-карбоксивметиламинометил-2'-О-метилурин, 5-карбамоилгидроксиметилурин, 5-карбамоилметил-2'-О-метилурин, 5-карбамоилметил-2-тиоурин, 5-метоксикарбонилметил-2'-О-метилурин, 5-(изопентиламинометил)-2'-О-метилурин, 5,2'-О-диметилурин, 2'-О-метилурин, 2'-О-метил-2-тиоурин, 2-тио-2'-О-метилурин, урин-5-оксиуксесная кислота, 5-метоксикарбонилметилурин, метилловый эфир урин-5-оксиуксесной кислоты, 5-метоксиурин, 5-аминометил-2-тиоурин, 5-карбоксивметиламинометил-2-тиоурин, 5-метиламинометил-2-селенурин, 5-метоксикарбонилметил-2-тиоурин, 5-тауринметил-2-тиоурин, псевдоурин, 1-метил-3-(3-амино-3-карбоксивпропил)псевдоурин, 1-метилпсевдоурин, 3-метилпсевдоурин, 2'-О-метилпсевдоурин, 5-формилурин, 5-аминометил-2-геранилурин, 5-тауринметилурин, 5-йодурин, 5-бромурин, 2'-метил-2'-дезоксидурин, 2'-амино-2'-дезоксидурин, 2'-азидо-2'-дезоксидурин, 2'-фтор-2'-дезоксидурин, инозин, 1-метиринозин, 1,2'-О-диметиринозин, 2'-О-метиринозин, 5-азаурин, 2-тио-5-азаурин, 4-тиопсевдоурин, 2-тиопсевдоурин, 5-карбоксивметилурин, 1-карбоксивметилпсевдоурин, 5-пропинилурин, 1-пропинилпсевдоурин, 1-тауринметилпсевдоурин, 5-тауринметил-2-тиоурин, 1-тауринметил-4-тиоурин, 5-метилурин, 1-

метил-псевдоурдин, 4-тио-1-метилпсевдоурдин, 2-тио-1-метилпсевдоурдин, 1-метил-1-деазапсевдоурдин, 2-тио-1-метил-1-деазапсевдоурдин, дигидропсевдоурдин, 2-тиодигидроурдин, 2-тиодигидропсевдоурдин, 2-метоксиурдин, 2-метокси-4-тиоурдин, 4-метоксипсевдоурдин, 4-метокси-2-тиопсевдоурдин, 1,2'-О-диметиладенозин, 1,2'-О-диметилгуанозин, 1,2'-О-диметилинозин, 2,8-диметиладенозин, 2-метилтиометилентио-N6-изопентениладенозин, 2-геранилтиоурдин, 2-лизидин, циклический 2-метилтио-N6-треонилкарбамоиладенозин, 2-метилтио-N6-(цис-гидроксиизопентил)аденозин, 2-метилтио-N6-гидроксинорвалилкарбамоиладенозин, 2-метилтио-N6-треонилкарбамоиладенозин, 2-селенуридин, 2-тио-2'-О-метилуридин, 2'-О-метиладенозин, 2'-О-метилцитидин, 2'-О-метилгуанозин, 2'-О-метилюридин, 2'-О-метилпсевдоурдин, 2'-О-метилуридин, метиловый эфир 2'-О-метилуридин 5-оксиуксусной кислоты, 2'-О-рибозиладенозинфосфат, 2'-О-рибозилгуанозинфосфат, 3,2'-О-диметилуридин, 3-(3-амино-3-карбоксыпропил)-5,6-дигидроурдин, 3-(3-амино-3-карбоксыпропил)псевдоурдин, 5,2'-О-диметилцитидин, 5,2'-О-диметилуридин, метиловый эфир 5-(карбоксихидроксиметил)-2'-О-метилуридина, 5-(изопентиламинометил)-2'-О-метилуридин, 5-аминометил-2-геранилтиоурдин, 5-аминометил-2-селенуридин, 5-аминометилуридин, 5-карбамоилметил-2'-О-метилуридин, 5-карбоксихидроксиметилуридин, 5-карбоксиметил-2-тиоурдин, 5-карбоксиметиламинометил-2-геранилтиоурдин, 5-карбоксиметиламинометил-2-селенуридин, 5-карбоксиметиламинометил-2'-О-метилуридин, 5-цианометилуридин, 5-формил-2'-О-метилцитидин, 5-метоксикарбонилметил-2'-О-метилуридин, 5-метиламинометил-2-геранилтиоурдин, 7-аминокаръоксыпропилдиметилвиозин, 7-метилгуанозин, 8-метиладенозин, N2,2'-О-диметилгуанозин, N2,7,2'-О-триметилгуанозин, N2,7-диметилгуанозин, N2,N2,2'-О-триметилгуанозин, N2,N2,7-триметилгуанозин, N2,N2,7-триметилгуанозин, N4,2'-О-диметилцитидин, N4,N4,2'-О-триметилцитидин, N4,N4-диметилцитидин, N4-ацетил-2'-О-метилцитидин, N6,2'-О-диметиладенозин, N6,N6,2'-О-триметиладенозин, N6-формиладенозин, N6-гидроксиметиладенозин, агматидин, циклический 2-метилтио-N6-треонилкарбамоиладенозин, глутамилквеуозин, гуанозин, присоединенный к

любому нуклеотиду, гуанилированный 5'-конец, гидроксигуанидин, 5-метилцитидин, 5-метилуридин, 5-метилпсевдоуридин, 2'-фтор-2'-дезоксидеоксицитидин, 5-йодцитидин, 5-метилцитидин, 2-тиоуридин, 5-йодуридин и/или 5-метилуридин.

5 Кроме того, термин "модифицированный нуклеотид" включает нуклеотиды, содержащие изотопы, такие как дейтерий. Термин "изотопы" означают элементы, содержащие одинаковое количество протонов, но разное количество нейтронов, это обеспечивает разные массовые числа. Таким образом, изотопы водорода, например, не ограничиваются дейтерием, но также включают тритий.

10 Кроме того, полирибонуклеотид также может содержать изотопы других элементов, включая, например, изотопы углерода, кислорода, азота и фосфора. Модифицированные нуклеотиды также могут являться дейтерированными или содержать другой изотоп водорода или кислорода, углерода, азота или фосфора.

15 В отношении нуклеотидов U, C, A и G, ни один из них, один, два, три или все они могут являться модифицированными. Поэтому в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один нуклеотид, входящий в число нуклеотидов одного типа, например, по меньшей мере один нуклеотид U, может являться модифицированным нуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один нуклеотид, входящий в число

20 нуклеотидов двух типов, например, по меньшей мере один нуклеотид U и по меньшей мере один нуклеотид C, может являться модифицированным нуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один нуклеотид, входящий в число нуклеотидов трех типов, например, по меньшей мере один нуклеотид G, по меньшей мере один нуклеотид U и по меньшей мере

25 один нуклеотид C, может являться модифицированным нуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один нуклеотид, входящий в число нуклеотидов всех четырех типов, может являться модифицированным нуклеотидом. Во всех этих вариантах осуществления один или большее количество нуклеотидов из числа нуклеотидов каждого типа могут являться

30 модифицированными, выраженное в процентах количество указанных модифицированных нуклеотидов из числа нуклеотидов каждого типа составляет 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 100%.

В некоторых вариантах осуществления полное выраженное в процентах количество модифицированных нуклеотидов, содержащихся в молекулах мРНК, составляет 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 100%.

5 В предпочтительном варианте осуществления мРНК представляет собой мРНК, которая содержит комбинацию модифицированных и немодифицированных нуклеотидов. Предпочтительно, если она представляет собой мРНК, содержащую комбинацию модифицированных и немодифицированных нуклеотидов, описанную в WO 2011/012316. Сообщали, что мРНК, описанная в этом документе, обладает повышенной стабильностью и 10 пониженной иммуногенностью. В предпочтительном варианте осуществления в такой модифицированной мРНК от 5 до 50% содержащих цитидин нуклеотидов и от 5 до 50% содержащих уридин нуклеотидов являются модифицированными. Содержащие аденозин и гуанозин нуклеотиды могут являться 15 немодифицированными. Содержащие аденозин и гуанозин нуклеотиды могут являться немодифицированными или частично модифицированными, и предпочтительно, если они содержатся в немодифицированной форме.

В некоторых вариантах осуществления любых описанных выше положений, выраженное в процентах количество аналогов заданного нуклеотида означает 20 выраженное в процентах вводимое количество (например, выраженное в процентах количество аналогов, использующееся в начальной реакции, такой как реакция транскрипции *in vitro*). В некоторых вариантах осуществления любых описанных выше положений, выраженное в процентах количество аналогов заданного нуклеотида означает выраженное в процентах полученное 25 количество (например, выраженное в процентах количество, содержащееся в синтезированном или транскрибированном соединении). Обе возможности предусмотрены в равной степени.

Молекулы РНК, предпочтительно мРНК, предлагаемые в настоящем изобретении, можно получить искусственным образом в системах *in vivo* по 30 методикам, известным специалисту в данной области техники.

Альтернативно, молекулы модифицированной РНК, предпочтительно мРНК, предлагаемые в настоящем изобретении, можно получить в системе *in vitro* с использованием, например, системы транскрипции *in vitro*, которая

известна специалисту в данной области техники. Для системы транскрипции *in vitro*, в которой можно получить РНК, предпочтительно мРНК, необходима вводимая смесь модифицированных и немодифицированных нуклеозидтрифосфатов, предназначенная для получения молекул модифицированной РНК, предпочтительно мРНК, обладающих необходимыми характеристиками, соответствующими настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления от 5 до 50% цитидинов в такой вводимой смеси являются аналогами цитидина и от 5 до 50% уридинов в такой вводимой смеси являются аналогами уридина. В некоторых вариантах осуществления от 5 до 40% цитидинов в такой вводимой смеси являются аналогами цитидина и от 5 до 40% уридинов в такой вводимой смеси являются аналогами уридина. В некоторых вариантах осуществления от 5 до 30% цитидинов в такой вводимой смеси являются аналогами цитидина и от 5 до 30% уридинов в такой вводимой смеси являются аналогами уридина. В некоторых вариантах осуществления от 5 до 30% цитидинов в такой смеси являются аналогами цитидина и от 10 до 30% уридинов в такой смеси являются аналогами уридина. В некоторых вариантах осуществления от 5 до 20% цитидинов в такой вводимой смеси являются аналогами цитидина и от 5 до 20% уридинов в такой вводимой смеси являются аналогами уридина. В некоторых вариантах осуществления от 5 до 10% цитидинов в такой вводимой смеси являются аналогами цитидина и от 5 до 10% уридинов в такой вводимой смеси являются аналогами уридина. В некоторых вариантах осуществления 25% цитидинов в такой вводимой смеси являются аналогами цитидина и 25% уридинов в такой вводимой смеси являются аналогами уридина. В некоторых вариантах осуществления вводимая смесь не содержит аналоги аденозина и/или гуанозина. В других вариантах осуществления вводимая смесь необязательно содержит один или большее количество аналогов аденозина и/или гуанозина (или не содержит аналоги любого из них или обоих).

В некоторых вариантах осуществления выраженное в процентах количество цитидинов во вводимой смеси, которые являются аналогами цитидина, не является таким же, как выраженное в процентах количество уридинов во вводимой смеси, которые являются аналогами уридина. В некоторых вариантах осуществления выраженное в процентах количество аналогов цитидина во

вводимой смеси, является меньшим, чем выраженное в процентах количество аналогов уридина во вводимой смеси. Как отмечено выше, во вводимой смеси могут присутствовать или отсутствовать аналоги аденозина и гуанозина, однако в некоторых вариантах осуществления во вводимой смеси отсутствуют аналоги аденозина и аналоги гуанозина.

В некоторых вариантах осуществления вводимая смесь нуклеотидов, предназначенная для системы транскрипции *in vitro*, с помощью которой получают РНК, предпочтительно мРНК, предлагаемую в настоящем изобретении, содержит аналоги цитидина и аналоги уридина, и от 5 до 20% цитидинов во вводимой смеси являются аналогами цитидина и от 25 до 45% уридинов во вводимой смеси являются аналогами уридина. Другими словами, вводимая смесь содержит модифицированные и немодифицированные цитидины и модифицированные и немодифицированные уридины, и от 5 до 20% цитидинов во вводимой смеси являются аналогами цитидина, при этом от 25 до 45% уридинов во вводимой смеси являются аналогами уридина. В других вариантах осуществления вводимая смесь содержит от 5 до 10% аналогов цитидина и от 30 до 40% аналогов уридина, например, 7-9%, например, 7, 7,5 или 8% аналогов цитидина, и, например 32-38%, например 33, 34, 35, 36% аналогов уридина.

В некоторых вариантах осуществления можно использовать любой из аналогов уридина и аналогов цитидина, описанных в настоящем изобретении, необязательно за исключением псевдоуридина. В некоторых вариантах осуществления аналог цитидина включает 5-йодцитидин или состоит из него (например, если используют один аналог типа С) и аналог уридина включает 5-йодуридин или состоит из него (например, если используют только один аналог типа U).

Типичные аналоги описаны выше. Следует понимать, что в случае модифицированных полирибонуклеотидов, кодирующих необходимый полипептид, аналогичность и степень модификации, если не указано иное, обеспечена во всем полирибонуклеотиде, кодирующем необходимый полипептид, включая 5' - и 3' -нетранслируемые области (например, степень модификации основана на отношении количеств вводимых аналогов при проведении реакции транскрипции *in vitro*, при этом аналоги могут быть включены на участках, которые транскрибированы).

Кроме того, молекулы модифицированной РНК, предпочтительно мРНК, можно получить путем химического синтеза, например, путем обычного химического синтеза с помощью автоматического синтезатора последовательности нуклеотидов с использованием твердофазной подложки и стандартных методик, или путем химического синтеза соответствующих последовательностей ДНК и их последующей транскрипции *in vitro* или *in vivo*.

В другом предпочтительном варианте осуществления мРНК можно объединить с целевыми сайтами связывания, направленно действующими последовательностями и/или сайтами связывания микро-РНК, для обеспечения активности необходимой мРНК только в соответствующих клетках. В другом предпочтительном варианте осуществления РНК можно объединить с микро-РНК или мшРНК (малая образующая шпильки РНК), расположенными в нетранслируемой области.

Терапевтическое воздействие обычно можно обеспечить путем взаимодействия рибонуклеиновой кислоты с находящимися в клетке молекулами и органеллами. Такое взаимодействие само по себе может, например, активировать врожденный иммунитет, как это происходит в случае определенных олигонуклеотидов CpG и последовательностей, специально созданных для взаимодействия с Toll-подобным рецептором и другими вне- и внутриклеточными рецепторами. Кроме того, включение или введение нуклеиновых кислот (предпочтительно рибонуклеиновых кислот, более предпочтительно мРНК) в клетки может быть предназначено для обеспечения экспрессии последовательностей нуклеотидов, таких как гены, содержащиеся в нуклеиновой кислоте (предпочтительно в рибонуклеиновых кислотах, более предпочтительно в мРНК), может быть предназначено для понижения уровня экспрессии, выключения или устранения экспрессии эндогенного гена вследствие присутствия в клетке введенной эндогенной нуклеиновой кислоты, или может быть предназначено для модификации последовательностей эндогенных нуклеиновых кислот, например, для исправления, вырезания, вставки или замены выбранных оснований или целых участков последовательностей эндогенных нуклеиновых кислот, или может быть предназначено для воздействия фактически на любой протекающий в клетке процесс вследствие присутствия и воздействия в клетке введенной эндогенной

рибонуклеиновой кислоты (предпочтительно мРНК). Сверхэкспрессирование введенных эндогенных нуклеиновых кислот (предпочтительно рибонуклеиновых кислот, более предпочтительно мРНК) может быть предназначено для компенсации или дополнения уровня экспрессии эндогенного гена, в частности, в случаях, когда эндогенный ген является дефектным или молчащим, что приводит отсутствию экспрессии гена, недостаточной экспрессии гена или образованию дефектного или дисфункционального продукта экспрессии гена, например, как это происходит в случае многих метаболических и наследственных заболеваний, таких как, в частности муковисцидоз, гемофилия или мышечная дистрофия. Сверхэкспрессирование введенных эндогенных нуклеиновых кислот (предпочтительно рибонуклеиновых кислот, более предпочтительно мРНК) также может быть предназначено для обеспечения воздействия продукта экспрессии на любые эндогенные клеточные процессы, такие как регуляция экспрессии гена, сигнальная трансдукция и другие клеточные процессы, или его вмешательства в них. Сверхэкспрессирование введенных эндогенных нуклеиновых кислот (предпочтительно рибонуклеиновых кислот, более предпочтительно мРНК) также может быть предназначено для обеспечения усиления иммунного ответа организма, в котором находится трансфицированная или трансдуцированная клетка, или в который ее ввели. Примером является генетическая модификация содержащих антиген клеток, таких как дендритные клетки, для включения в них антигена с целью вакцинации. Другим примером является сверхэкспрессирование цитокинов в опухолях для обеспечения специфичного по отношению к опухоли иммунного ответа. Кроме того, сверхэкспрессирование введенных эндогенных рибонуклеиновых кислот (предпочтительно мРНК) также может быть предназначено для временного образования *in vivo* или *ex vivo* генетически модифицированных клеток, предназначенных для клеточной терапии, таких как модифицированные Т-клетки, НК-клетки и другие лимфоциты или предшественники, или стволы или другие клетки, предназначенные для восстанавливающего лечения.

Понижения уровня экспрессии, выключение или устранение экспрессии эндогенного гена в терапевтических целях можно обеспечить, например, с помощью РНК-интерференции (РНКи), рибозим, антисмысловых

олигонуклеотидов, тРНК, длинных двухцепочечных РНК, где такая понижающая регуляция может являться специфичной или неспецифичной по отношению к последовательности, а также может привести к гибели клетки, как в случае, когда длинные двухцепочечные РНК вводят в клетки. Понижения уровня экспрессии, выключение или устранение экспрессии эндогенного или существующего гена, может являться подходящим для лечения приобретенных, наследственных или внезапно возникших заболеваний, включая вирусные инфекции и рак. Также можно предположить, что введение нуклеиновых кислот в клетки можно применять в качестве предупредительных мер для предупреждения, например, вирусной инфекции или неоплазии. Понижения уровня экспрессии, выключение или устранение экспрессии эндогенного гена можно осуществить на уровне транскрипции или на уровне трансляции. Специалисту в данной области техники известны многочисленные механизмы и они включают, например, эпигенетические модификации, изменения в структуре хроматина, селективное связывание факторов транскрипции с помощью введенной нуклеиновой кислоты, гибридизация введенной нуклеиновой кислоты с комплементарными последовательностями геномной ДНК, мРНК или РНК других видов путем спаривания оснований, включая механизмы спаривания неклассических оснований, такие как образование тройной спирали. Аналогичным образом, исправление гена, внесение изменений в основания и последовательность можно осуществить на уровне генома и на уровне мРНК, включая пропуск экзонов. Внесение изменений в основания и последовательность можно осуществить, например, путем управляемого с помощью РНК специфичного по отношению к участку расщепления ДНК, по механизмам "вырезать-вставить", в котором используют транс-сплайсинг, транс-сплайсинг с использованием рибозим, химерапласты, опосредуемый сплайсингосомой транс-сплайсинг РНК, или путем использования интронов группы II или перенацеленных интронов, или путем проводимого по методике микроинъекций мутагенеза, опосредуемого вирусами, или путем использования целевой геномной вставки с помощью прокариотических, эукариотических или вирусных систем на основе интегразы. Поскольку нуклеиновые кислоты являются носителями плана создания живых систем, и поскольку они прямым или косвенным образом участвуют во многих клеточных процессах,

теоретически, на протекание любого клеточного процесса можно влиять путем введения нуклеиновых кислот в клетки извне. Следует отметить, что это введение можно осуществить непосредственно *in vivo* и *ex vivo* в клеточную или органную культуру с последующей трансплантацией реципиенту

5 модифицированных таким образом органов или клеток. Частицы, предназначенные для применения в контексте настоящего изобретения, содержащие в качестве терапевтически активного средства нуклеиновые кислоты, могут являться подходящими для всех описанных выше целей.

10 Как отмечено выше, РНК, предпочтительно мРНК, может содержать последовательность рибонуклеотидов, которая кодирует белок или его фрагмент, действие которого в клетке или в окружающей клетку среде является необходимым или благоприятным, например, белок, отсутствие или наличие дефектной формы которого, вызывает заболевание или расстройство, наличие которого может ослабить или предупредить заболевание или расстройство, или

15 белок, который может способствовать протекающему в клетке или в окружающей клетку среде процессу, который является благоприятным для организма.

В действительности, в последние годы РНК (в частности, мРНК) становится все более подходящей для использования в качестве нового лекарственного

20 средства. В противоположность генной терапии с использованием ДНК отсутствует необходимость транспорта мРНК в ядро, она непосредственно транслируется в цитоплазме с образованием белка (J Control Release, 2011, 150:238-247, и Eur J Pharm Biopharm, 2009, 71:484-489).

Кроме того, многочисленные генетические нарушения, вызванные

25 мутацией одного гена, являются известными и возможными для терапевтических подходов с использованием РНК, предпочтительно мРНК. Нарушения, вызванные мутациями одного гена, такие как муковисцидоз, гемофилия и многие другие, могут являться, доминантными или рецессивными в отношении вероятности, с которой определенный признак проявится в потомстве. Тогда как

30 доминантный аллель, проявляется в фенотипе индивидуумов, которые содержат только одну копию аллеля, для проявления рецессивного аллеля индивидуум должен содержать две копии, по одной от каждого родителя. В отличие от этого, полигенные нарушения вызваны двумя или большим количеством генов и

вероятность проявления соответствующего заболевания часто меняется и связана с экологическими факторами. Примерами полигенных нарушения являются гипертензия, повышенный уровень холестерина, рак, нейродегенеративные нарушения, психическое заболевание и другие. В этих случаях терапия с помощью РНК, предпочтительно мРНК, представляющей один или большее количество этих генов, также может являться благоприятной для таких субъектов. Кроме того, генетическое нарушение необязательно передается посредством генов родителей, но также может быть вызвано новыми мутациями. В этих случаях терапия с помощью РНК, предпочтительно мРНК, представляющей правильную последовательность гена, также может являться благоприятной для субъектов.

Каталог, в настоящее время включающий 22993 описания генов и генетических нарушений человека вместе с их соответствующими генами и описаниями их фенотипов, приведен в базе данных ONIM (Менделевское наследование у человека) в интернете (<http://onim.org>); последовательности каждого гена приведены в базе данных Uniprot в интернете (<http://www.uniprot.org>). В качестве неограничивающих примеров в приведенной ниже таблице А перечислены некоторые врожденные заболевания и нарушения и соответствующий им ген (гены). Вследствие интенсивного взаимодействия путем передачи сигналов в клетке мутации определенного гена вызывают множество симптомов заболевания, из числа которых в таблице А указан только характерный.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения оказывающий терапевтическое воздействие белок, который кодируется с помощью РНК, предпочтительно с помощью мРНК, которая может содержаться в препарате суспензии и аэрозоле, предлагаемых в настоящем изобретении, выбран из числа клеточных белков, перечисленных в таблице А. Таким образом, молекула РНК, предпочтительно молекула мРНК, может кодировать оказывающий терапевтическое воздействие клеточный белок, где кодируемый оказывающий терапевтическое воздействие белок представляет собой указанный в таблице А или его гомолог.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения оказывающий терапевтическое воздействие белок, который кодируется с помощью РНК,

предпочтительно с помощью мРНК, выбран из числа секреторных белков, перечисленных в таблице А. Таким образом, РНК, предпочтительно мРНК, может кодировать оказывающий терапевтическое воздействие гибридный белок, где кодируемый оказывающий терапевтическое воздействие белок или его

5 гомолог представляет собой указанный в таблице А. и второй белок представляет собой сигнальный пептид, который обеспечивает секрецию оказывающего терапевтическое воздействие белка. Сигнальный пептид является коротким, обычно содержащим последовательность 5-30 аминокислот, находящимся на N-конце указанного оказывающего терапевтическое

10 воздействие белка пептидом, который направляет гибридные белки к клеточному секреторному пути посредством определенных органелл (т. е. посредством эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи или эндосом). Таким образом, такой гибридный белок выделяется из клетки или образует клеточную органеллу, или включается в клеточную мембрану (например,

15 политопические трансмембранные белки) в клеточном компартменте или на поверхности клетки.

Таким образом, в предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, предпочтительно мРНК, может кодировать один или большее количество, не ограничиваясь только ими, приведенные ниже белки генов,

20 которые вызывают заболевания, приводят к предрасположенности к заболеванию или защищают от заболевания. Неограничивающие примеры таких заболеваний и нарушений, которые можно лечить (или предупреждать), включают такие, при которых указанный полипептид, белок или пептид выбран из группы, состоящей из перечисленных в приведенной ниже таблице А.

25 В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность РНК, предпочтительно мРНК, может быть транскрибирована или транслирована в укороченный или полноразмерный белок, обладающий активностью в клетке, такой же, как активность нативного белка, или превышающей ее. В некоторых вариантах осуществления РНК, предпочтительно мРНК, кодирует

30 терапевтически или фармацевтически активный полипептид, белок или пептид, обеспечивающий терапевтическое или предупредительное воздействие, где указанный полипептид, белок или пептид выбран из группы, состоящей из перечисленных в приведенной ниже таблице А. РНК, предпочтительно мРНК,

5 точнее, ее кодирующую последовательность, можно использовать для экспрессирования укороченного или полноразмерного белка, обладающего активностью в клетке, такой же, как активность нативного белка, или превышающей ее. Это может обеспечить возможность лечения заболеваний, для которых может быть показано введение молекулы РНК.

Таблица А: Неограничивающие примеры генов человека и генетические заболевания или нарушения

Заболевание	Патология	Ген, тип наследования
Заболевания крови		
Анемия Фанкони	анемия и нейтропения, признак нарушения механизма репарации ДНК	FANCA, аутосомно-рецессивный
Гемофилия А	аномальное кровотечение	фактор коагуляции VIII, сцепленный с X-хромосомой рецессивный
Гемофилия В	аномальное кровотечение	фактор коагуляции IX, сцепленный с X-хромосомой рецессивный
Наследственный сфероцитоз (разные типы)	обладающие сферической формой эритроциты (сфероцит)	анкирин (ANK1)
Пароксизмальная ночная гемоглобинурия	анемия и наличие крови в моче	PIG-A, сцепленный с X-хромосомой
Хроническая гематопорфирия	сверхпродуцирование гема, избыток железа	уропорфириногендекарбоксилаза (UROD), аутосомно-рецессивный
Тяжелый комбинированный иммунодефицит (ТКИД)	тяжелый дефицит гуморального и клеточного иммунитета вследствие нарушения синтеза ДНК	аденозиндезаминаза, аутосомно-рецессивный, IL-2R- $\gamma$ , JAK3, (IL-7R- $\alpha$ , RAG1/2, Artemis, CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$
Серповидно-клеточная анемия	аномальный гемоглобин (HbS)	$\beta$ -гемоглобин (Hb), аутосомно-рецессивный
Талассемия ( $\alpha$ - и $\beta$ -форма)	недостаток $\alpha$ - или $\beta$ -гемоглобина, приводящий к анемии	делеция в генах HBA1 и/или HBA2
Болезнь фон Виллебранда (известны три типа, наиболее тяжелой является болезнь типа III)	аномальное кровотечение, кровоизлияние, сходное с гемофилией А и В	аутосомно-доминантный и -рецессивный

Заболевание	Патология	Ген, тип наследования
<b>Рак</b>		
Злокачественная меланома	мутация гена Р16 приводит к нерегулируемой пролиферации фибробластов	ингибитор циклинзависимой киназы 2 (CDKN2)
Нейрофиброматоз (2 типа)	доброкачественные опухоли слуховых нервов приводят к глухоте	NF1, NF2, аутосомно-доминантный
<b>Глухота (ухо)</b>		
Глухота	тугоухость	глухота-1А (DFNB1), аутосомно-рецессивный
Синдром Пендреда	тугоухость	пендрин (PDS), аутосомно-рецессивный
<b>Сердце</b>		
Атаксия-телеангиэктазия	нарушение репарации повреждений ДНК	ATM
Атеросклероз	увеличение содержания холестерина в крови	apoE
Синдром удлиненного интервала QT (СУИ-QT)	дефект калиевого канала	LQT1 и другие гены
Синдром Гиппеля-Линдау	аномальный рост кровеносных сосудов, может привести к возникновению рака	VHL, аутосомно-доминантный
Синдром Вильямса-Бойрена	делеция в гене эластина приводит к дефектам в сосудах, надклапанному стенозу устья аорты	делеция в генах эластина и киназы LIM
<b>Метаболические нарушения и болезни накопления гликогена</b>		
Адренолейкодистрофия	нарушения транспорта и метаболизма жирных кислот	ABCD1, сцепленный с X-хромосомой
Алкаптонурия	нарушение метаболизма азота, моча становится темной при воздействии кислорода	оксидаза гомогентизиновой кислоты, аутосомно-рецессивный
Диабет типа I	нарушение продуцирования инсулина	IDDM1, IDDM2, GCK и т. п.
Галактоземия	нарушение метаболизма галактозы	ген галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы (GALT), аутосомно-рецессивный
Болезнь Гоше	нарушение метаболизма жира	глюкоцереброзидаза
Недостаточное всасывание глюкозы и галактозы	нарушение транспорта глюкозы и галактозы из кишечной полости,	SGLT1, аутосомно-рецессивный

Заболевание	Патология	Ген, тип наследования
	приводящее к диарее	
Болезнь накопления гликогена типа I, болезнь фон Гирке	накопление глюкозы в печени и почках	глюкозо-6-фосфатаза, ауtosомно-рецессивный
Болезнь накопления гликогена типа II, болезнь Помпе	накопление гликогена в печени, сердце, скелетных мышцах, кардиомегалия	$\alpha$ -1-глюкозидаза, ауtosомно-рецессивный
Болезнь накопления гликогена типа III, болезнь Кори	накопление гликогена в печени, сердце, скелетных мышцах, гепатомегалия	деветвящий фермент, ауtosомно-рецессивный
Болезнь накопления гликогена типа V, болезнь МакАрдля	неспособность утилизации гликогена в клетках мышц	мышечная фосфорилаза, ауtosомно-рецессивный
Дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы	неспособность поддержания содержания глутатиона приводит к гемолитической анемии	G6PD, сцепленный с X-хромосомой рецессивный
Наследственный гемохроматоз (4 типа)	избыток железа в организме (в особенности, в печени) вследствие избыточного всасывания железа в кишечнике	гемохроматоз (HFE)
Гомоцистинурия	нарушение метаболизма азота	дефект цистатионинсинтазы, ауtosомно-рецессивный
Синдром Леша-Нихена	накопление мочевой кислоты, приводящее к подагре, камням мочевой кислоты и потере мышечной массы	HPRT1, сцепленный с X-хромосомой
Болезнь мочи с запахом кленового сиропа (лейциноз)	нарушение метаболизма аминокислот приводит к накоплению $\alpha$ -кетокислот и при отсутствии лечения к смерти в первые месяцы	обладающая разветвленной цепью альфа-дегидрогеназа (BCKDH)
Синдром Менкеса	ухудшенная способность всасывания меди, при отсутствии лечения приводит к смерти в младенчестве	ATP7A, сцепленный с X-хромосомой рецессивный
Ожирение	увеличенная масса тела	множество генов, может играть роль повышенное содержание лептина
Фенилкетонурия	неспособность расщепления фенилаланина с образованием тирозина приводит задержке умственного развития	фенилаланингидроксилаза (ПАН), ауtosомно-рецессивный
Болезнь Танжера	пониженное содержание обладающих высокой плотностью липопротеинов в	ген АТФ-связывающего кассетного транспортера 1 (АТФ =

Заболевание	Патология	Ген, тип наследования
	плазме	аденозинтрифосфат) (ABCA1)
Синдром Цельвегера (приводит к гибели младенцев)	высокое содержание железа и меди в крови	PXR1 (рецептор, находящийся на поверхности пероксисом)
Болезнь Вильсона	накопление меди в головном мозге и печени	ATP7B (АТФаза Р-типа), аутосомно-рецессивный
<b>Опорно-двигательная система</b>		
Ахондроплазия	маленький рост и большая голова вследствие медленной пролиферации хондроцитов	рецептор фактора роста фибробластов 3 (FGF3R)
Синдром Шарко- Мари-Тута и его более тяжелая форма - синдром Дежерина- Соттаса	дегенерация мышц в конечностях	различные формы, вызванные мутациями разных генов, аутосомно- рецессивный и сцепленный с X- хромосомой
Синдром Коккейна (2 типа)	преждевременное старение и маленький рост, утрата способности "немедленной" репарации ДНК	белок эксцизионной репарации кросс- комплементарной группы 8 (ERCC8)
Хондрэктодермальна я дисплазия	нарушение формирования костей и полидактилия	EVC, аутосомно- рецессивный
Диастрофическая дисплазия (ДД)	нарушение формирования рук, дефект переносчика сульфата	ген DTDST
Мышечная дистрофия Дюшенна	увеличение размера мышечной ткани с последующей потерей функции	DMD, сцепленный с X- хромосомой рецессивный
Прогрессирующая оссифицирующая фибродисплазия	гетеротопическое образование кости	NOG, BMP, аутосомно- доминантный
Атаксия Фридрейха	увеличение размера сердца и прогрессирующая утрата мышечной координации	фратаксин, аутосомно- рецессивный
Гипофосфатазия	продуцирование аномальной щелочной фосфатазы, воздействующее на минерализацию	ALPL, аутосомно- рецессивный
Синдром Марфана	нарушение соединительной ткани вследствие дефицита фибрилина	фибриллин 1 (FBN), аутосомно-доминантный
Миотоническая дистрофия (проявляется в подростковом возрасте)	дефект протеинкиназы в клетках скелетных мышц	протеинкиназа миотонической дистрофии (DMPK), аутосомно-доминантный
Несовершенный	дефект образования коллагена	COL1A1, COL1A2

Заболевание	Патология	Ген, тип наследования
остеогенез (различные типы)	типа I приводит к множественным переломам после рождения	
Синдром Прадера-Вилли	ослабление мышечного тонуса и задержка умственного развития	SNRPN (малый рибонуклеопротеин N), отсутствует вследствие делеции хромосомы 15
<b>Нейроны и головной мозг</b>		
Болезнь Альцгеймера	увеличенное продуцирование амилоида, прогрессирующая неспособность помнить события	множество генов, PS1, PS2 и т. п.
Боковой амиотрофический склероз (БАС) (различные формы)	прогрессирующая дегенерация двигательных нейронов (нарушение выведения супероксидных радикалов)	супероксиддисмутаза 1 (SOD1), вовлечены различные гены
Синдром Ангельмана	задержка умственного развития с неадекватной веселостью	геномный импринтинг в хромосоме 15
Дефицит пируватдегидрогеназы	неврологические повреждения при отсутствии лечения	пируватдегидрогеназа, аутосомно-рецессивный
Болезнь Рефсума	накопление фитановой кислоты приводит к периферической невропатии	фитаноил-СоА гидроксилаза (PHYH), аутосомно-рецессивный
Синдром Ретта	задержка умственного развития с задержкой развития в возрасте от 6 до 18 месяцев	метил-СрG-связывающий белок 2 (MECP2), сцепленный с X-хромосомой, доминантный
Болезнь Тея-Сакса (различной степени тяжести)	нарушение разрушения ганглиозида GM2 приводит к неврологическому повреждению	HEXA ( $\beta$ -гексозаминидаза А), аутосомно-рецессивный
Болезнь Лафоры	агрессивная форма эпилепсии	EPH2A, аутосомно-рецессивный
Эссенциальный тремор (различные формы)	неконтролируемое дрожание	ETM1, ETM2, аутосомно-доминантный
Синдром ломкой X-хромосомы	отсутствие связывающего РНК белка FMR1, задержка умственного развития	ген FMR1 не экспрессируется вследствие амплификации CGG на участке 5'UTR
Болезнь Гентингтона	прогрессирующее слабоумие, проявляющееся в зрелом возрасте	HTT (гентингтин), аутосомно-доминантный

Заболевание	Патология	Ген, тип наследования
<b>Кишечник</b>		
Синдром Барттера (3 типа)	заболевание почек	ген хлоридного канала В почек (CLCNKB), аутосомно-рецессивный
Поликистозное заболевание почек (2 типа)	заболевание почек	PDK1, PDK2, аутосомно-доминантный, известен также аутосомно-рецессивный тип (ARPKD)
<b>Легкие</b>		
Дефицит альфа-1-антитрипсина	дефекты альвеол вследствие нерегулируемого выделения эластазы	SERPINA1, аутосомно-доминантный
Астма	хроническое воспалительное нарушение дыхательных путей	множество генов
Муковисцидоз	избыточно вязкая слизь вследствие нарушения транспорта иона Cl <sup>-</sup>	CFTR (регулятор трансмембранной проводимости при муковисцидозе), аутосомно-рецессивный
Нарушение метаболизма сурфактанта (различные типы)	новорожденные обладают нормальной массой тела, однако у всех нарушена дыхательная функция	АТФ-связывающий кассетный транспортер (ABCA3)
Первичная цилиарная дискинезия	избыточно вязкая слизь вследствие нарушения/отсутствия функции ресничек	в частности, DNAI1, CCNO, CCDC40
<b>Лизосомные болезни накопления</b>		
болезнь Фабри	в частности, повреждения кожи вследствие накопления керамид-тригексозида	α-галактозидаза А, сцепленный с X-хромосомой, рецессивный
Болезнь Гоше: тип I: у взрослых (нормальная продолжительность жизни при лечении), тип II: у младенцев (смерть до достижения возраста 1 года), типа III: ювенильный (проявления в раннем детстве, менее	накопление глюкоцереброзидов (ганглиозидов, сфинголипидов)	глюкоцереброзидаза, аутосомно-рецессивный

Заболевание	Патология	Ген, тип наследования
тяжелая форма, чем типа II)		
Синдром Хантера	накопление мукополисахаридов	L-идуроносульфатсульфатаза, сцепленный с X-хромосомой рецессивный
Синдром Гурлера (смерть до достижения возраста 10 лет)	накопление мукополисахаридов	$\alpha$ -L-идуронидаза, аутосомно-рецессивный
Болезнь Ниманна-Пика (три разные формы: А, В, С)	нарушение выделения холестерина из лизосом, накопление сфингомиелина	сфингомиелиназа, аутосомно-рецессивный
Болезнь Тея-Сакса (смерть до достижения возраста 4 лет)	накопление ганглиозида GM2 в нервных клетках	гексозаминидаза А, аутосомно-рецессивный
<b>Кожа</b>		
Альбинизм	нарушение метаболизма азота	дефицит тирозиназы, аутосомно-рецессивный
Окулокутанный альбинизм типа II	биосинтез уменьшенного количества пигмента-меланина	ОСА2, аутосомно-рецессивный
Синдром Элерса-Данлоса (различные типы)	диафрагмальная грыжа., обычно отслоение сетчатки	различные дефекты синтеза коллагена
Буллезный эпидермолиз (различные типы, включая простой БЭ, пограничный БЭ, дистрофический БЭ и синдром Киндлер)	нарушения поддержания стабильности структуры кератиноцита или адгезии кератиноцита к находящейся под ним коже	буллезный эпидермолиз с пятнистой пигментацией (БЭП), прогрессирующий буллезный эпидермолиз 3 (ПБЭ-3), псевдограничный буллезный эпидермолиз 4 (ППБЭ 4), десмоплакин (DSP), плакофилин-1 (PKP1), креатин (KRT5, KRT14), плектин (PLEC), ITGA6, субединица интегрина (ITGB4), субединицы ламинина (LAMA3, LAMP3, LAMB3, LAMC2), коллаген (COL17A1, COL7A1 (аутосомно-доминантный), FERMT1, аутосомно-рецессивный
Болезнь Хартнупа	нарушение всасывания	SLC6A19, аутосомно-

Заболевание	Патология	Ген, тип наследования
	триптофана в желудочно-кишечном тракте, чувствительная к свету кожа	рецессивный
Наследственная геморрагическая телеангиэктазия, синдром Ослера-Вебера-Рандю	Телеангиэктазия кожи и слизистых оболочек	эндоглин (ENG), аутосомно-доминантный
Семейная гиперхолестеринемия	повышение содержания холестерина в сыворотке, связанное с липопротеином низкой плотности, и его накопление в коже артериосклероз	рецептор липопротеина низкой плотности (LDLR), аполипопротеин В (APOB), аутосомно-доминантный
Пигментная ксеродерма	повреждение кожи и меланома вследствие воздействия УФ-лучей	дефект репарации ДНК, аутосомно-рецессивный
Облысение по мужскому типу	нарушение превращения тестостерона в дигидротестостерон в коже	5- $\alpha$ -редуктаза
<b>Генетические заболевания печени</b>		
Нарушения метаболизма аминокислот	нарушение многостадийного процесса, в котором происходит разрушение аминокислот - тирозина и фенилаланина	FAH, TAT, HPD, аутосомно-рецессивный
Бета-талассемия средней тяжести	недостаток зрелых эритроцитов	HBB, аутосомно-рецессивный
Синдром Криглера-Найяра	недостаточная глюкуронидация, при которой билирубин становится растворимым в воде	UGT1A1, аутосомно-рецессивный
Нарушения окисления жирных кислот	недостаточный метаболизм обладающих длинной цепью жирных кислот и обладающих чрезвычайно длинной цепью жирных кислот, приводящая летаргии и гипогликемии	HADHA, ACADVL аутосомно-рецессивный
Нарушения метаболизма фруктозы	нарушенный гликонеогенез, вызывающий гипогликемию	FBP1, ALDOB, аутосомно-рецессивный
Галактоземия	недостаточный метаболизм галактозы	GALT, GALK1, GALE, аутосомно-рецессивный
Болезни накопления гликогена	нарушение разрушения глюкозо-6-фосфата и гликогена приводит к накоплению гликогена, а	G6PC, SLC37A4, AGL, GBE1, аутосомно-рецессивный

Заболевание	Патология	Ген, тип наследования
	также аномальных молекул гликогена, вызывающему повреждение клеток	
Нарушение биосинтеза гема	уменьшение содержания уропорфириногендекарбоксил азы, приводящее к накоплению соединений, называемых порфиринами, вызывающее их токсическую к	UROD (аутосомно-доминантный), ALAS2 (X-сцепленный доминантный), ALAD (аутосомно-рецессивный)
Нарушения метаболизма (транспорта) липидов	недостаток функционального белка, который предотвращает перемещение холестерина и других липидов, приводящий к их накоплению в клетках	NPC1, NPC2 (аутосомно-рецессивный), LDLR, (аутосомно-доминантный)
Нарушения метаболизма металлов	нарушения накопления и транспорта железа и меди, приводящие к их накоплению в тканях и органах	ATP7B, HAMP, HFE, HFE2, аутосомно-рецессивный
Нарушения метаболизма органических кислот (ацидурии/ацидемии)	нарушение разрушения некоторых структурных фрагментов белков (аминокислот), некоторых липидов и холестерина	BCKDHA, BCKDHB и DBT, PCCA PCCB, MUT, MMAA, MMAB, MMADHC, MCEE, IVD, MCCC1 или MCCC2, аутосомно-рецессивный
Первичная гипероксалурия типа 1	нарушение разрушения глиоксилата, приводящее к повреждению почек	AGXT, GRHPR, аутосомно-рецессивный
Прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаз	накопление желчных кислот в клетках печени, приводящее к повреждению печени	ATP8B1, аутосомно-рецессивный
Нарушение активности тромбоцитов	отсутствие активности фермента нарушает обычный баланс кровотечение/свертываемость крови	ADAMTS13, аутосомно-рецессивный
Нарушения цикла образования мочевины	нарушение цикла образования мочевины, который вызывает разновидность гипераммониемии	OTC (X-сцепленное нарушение), CPS1, ASS1 и SLC25A13, ASL, аутосомно-рецессивный

В представленной выше таблице А приведены примеры генов, дефекты в которых приводит к возникновению заболевания, которое можно лечить с помощью РНК, предпочтительно мРНК, которая может содержаться в препарате суспензии и аэрозоле, предлагаемых в настоящем изобретении, РНК, предпочтительно мРНК, включает последовательность рибонуклеотидов,

которая кодирует неповрежденную версию белка или его функционального фрагмента, содержащегося в раскрытом выше дефектном гене. В особенно предпочтительных вариантах осуществления можно рассматривать наследственные заболевания, которые, например, поражают легкие, такие как дефицит SPB (белок В сурфактанта), дефицит ABCA3, муковисцидоз и дефицит  $\alpha$ 1-антитрипсина, или которые поражают белки плазмы (например, врожденный гемохроматоз (дефицит гепсидина), тромбоцитопеническая тромбогемолитическая пурпура (ТТП, недостаток ADAMTS 13) и вызывают нарушения свертываемости крови (например, гемофилия А и В) и нарушения комплементарности (например, дефицит белка С), нарушения иммунитета, такие как, например, ТКИД (вызванный мутациями в различных генах, таких как RAG1, RAG2, JAK3, IL7R, CD45, CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ ), нарушения вследствие недостатка аденозиндезаминазы, например, (ADA-ТКИД), септический гранулематоз (например, вызванный мутациями гена *gp-91-phox*, гена *p47-phox*, гена *p67-phox* или гена *p33-phox*) и болезни накопления, такие как болезнь Гоше, болезнь Фабри, болезнь Краббе, МПС (мукополисахаридоз) типа I, МПС типа II (синдром Хантера), МПС типа VI, болезнь накопления гликогена типа II или мукополисахаридоз.

Другие нарушения, при которых может являться применимой РНК, предпочтительно мРНК, предлагаемая в настоящем изобретении, включают такие нарушения, как связанная с SMN1 спинальная мышечная атрофия (СМА); боковой амиотрофический склероз (БАС); связанная с GALT галактоземия; муковисцидоз (МВ); связанные с SLC3A1 нарушения, включая цистинурию; связанные с COL4A5 нарушения, включая синдром Альпорта; дефицит галактоцереброзидазы; X-сцепленная адренолейкодистрофия и адреномиелоневропатия; атаксия Фридрейха; болезнь Пелицеуса-Мерцбахера; связанный с TSC1 и TSC2 туберозный склероз; синдром Санфилиппо В (МПС IIВ); связанный с CTNS цистиноз; связанные с FMR1 нарушения, которые включают синдром ломкой X-хромосомы, связанный с синдромом ломкой X-хромосомы синдром тремора/атаксии и связанный с синдромом ломкой X-хромосомы синдром преждевременного угасания функции яичников; синдром Прадера-Вилли; наследственная геморрагическая телеангиэктазия (НГТ); болезнь Ниманна-Пика типа C1; связанное с восковидным липофусцинозом

нейронов заболевание, включая ювенильную форму восковидного  
липофусциноза нейронов (ЮВЛН), ювенильную форму болезни Баттена, болезнь  
Сантавуори-Халтия, болезнь Янского-Бильшовского, и дефицит РТТ-1 и TRP1;  
связанная с EIF2B1, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B4 и EIF2B5 детская атаксия с  
5 гипомиелинизацией центральной нервной системы/изчезновением белого  
вещества мозга; связанная с SACNA1A и SACNB4 эпизодическая атаксия типа  
2; связанные с MECR2 нарушения, включая классический Синдром Ретта,  
связанную с MECR2 тяжелую энцефалопатию новорожденных и синдром PPM-X  
(психоз, пирамидные знаки и макроорхидизм, сцепленные с хромосомой X);  
10 связанный с CDKL5 атипичный синдром Ретта; болезнь Кеннеди (БСМА,  
бульбоспинальная мышечная атрофия); связанная с Notch-3 церебральная  
аутосомно-доминантная артериопатия с субкортикальными инфарктами и  
лейкоэнцефалопатией (ЦАДАСИЛ); связанная с SCN1A и SCN1B эпилепсия;  
связанные с полимеразой G нарушения, которые включают синдром Альперса-  
15 Гуттенлохера, связанную с POLG сенсорную атактическую невропатию,  
дизартрию и офтальмопарез, и аутосомно-доминантная и -рецессивная  
прогрессирующая внешняя офтальмоплегия с делециями в митохондриальной  
ДНК; X-сцепленная гипоплазия надпочечников; X-сцепленная  
агаммаглобулинемия; болезнь Фабри и болезнь Вильсона.

20 При всех этих заболеваниях белок, например, фермент, содержит дефект,  
который можно исправить с помощью РНК, предпочтительно мРНК,  
кодирующей любой из белков, указанных выше в настоящем изобретении, это  
приводит к тому, что белок, кодируемый дефектным геном его функциональным  
фрагментом, становится доступным. С помощью транскрипционной  
25 заместительной терапии/белковой заместительной терапии не воздействуют на  
основной генетический дефект, а увеличивают концентрацию белка, недостаток  
которого наблюдается у субъекта. В качестве примера, в случае болезни Помпе с  
помощью транскрипционной заместительной терапии/ферментной  
заместительной терапии проводят замену обладающей недостатком лизосом  
30 фермента - кислой альфа-глюкозидазы (GAA).

Таким образом, неограничивающими примерами белков, которые можно  
кодировать с помощью мРНК, предлагаемой в настоящем изобретении, являются  
эритропоэтин (EPO), гормон роста (соматотропин, hGH), регулятор

трансмембранной проводимости при муковисцидозе (CFTR), факторы роста, такие как GM-SCF, G-CSF, MPS, белок C, гепсидин, ABCA3 и белок В сурфактанта. Другими примерами заболеваний, которые можно лечить с помощью РНК, предлагаемой в настоящем изобретении, являются гемофилия А/В, болезнь Фабри, ХГ (хронический гранулематоз), ADAMTS13, болезнь Гурлера, опосредуемая X-хромосомой А-γ-глобулинемия, связанный с аденозиндезаминазой иммунодефицит и респираторный дистресс-синдром новорожденных, который связан с SP-B (белок В сурфактанта). Особенно предпочтительно, если РНК, предпочтительно мРНК, предлагаемая в настоящем изобретении, содержит последовательность, кодирующую белок В сурфактанта (SP-B) или эритропоэтин. Другие примеры белков, которые можно кодировать с помощью РНК, предпочтительно мРНК, предлагаемой в настоящем изобретении, являются факторы роста, такие как гормон роста человека hGH, BMP-2 или факторы, регулирующие ангиогенез.

15 Хотя приведенные выше варианты осуществления описаны применительно к молекуле РНК, предпочтительно мРНК, которая может содержаться в наночастицах, применяющихся в настоящем изобретении, как отмечено выше, настоящее изобретение не ограничивается применением РНК, предпочтительно мРНК, и в нем можно применять другие молекулы нуклеиновых кислот, такие как молекулы ДНК.

20 Указанная молекула ДНК может кодировать указанную выше РНК, предпочтительно указанную выше мРНК, и, соответственно, может содержать генетическую информацию соответствующим образом транскрибированной молекулы РНК.

25 Поэтому предпочтительные варианты осуществления, приведенные выше и ниже применительно к молекуле РНК, предпочтительно молекуле мРНК, которая может содержаться в наночастицах, применяющихся в настоящем изобретении, с соответствующими изменениями применимы к молекуле ДНК, предлагаемой в настоящем изобретении.

30 Альтернативно, РНК, предпочтительно мРНК, может содержать последовательность рибонуклеотидов, которая кодирует полноразмерные антитела или обладающие меньшим размером антитела (например, обладающие и тяжелыми, и легкими цепями), которые можно использовать в терапевтических

целях, например, для придания субъекту иммунитета. Соответствующие антитела и их применение в терапии известны в данной области техники. Антитела могут кодироваться одной цепью мРНК или более, чем одной цепью мРНК.

5 В другом варианте осуществления РНК, предпочтительно мРНК, может кодировать функциональные моноклональные или поликлональные антитела, которые могут быть применимы для направленного действия на биологическую мишень и/или для инактивации биологической мишени (например, стимулирующего цитокина, такого как фактор некроза опухоли). Аналогичным образом, последовательность РНК, предпочтительно мРНК, может кодировать, например, функциональные антитела к фактору некроза, применимые для 10 лечения мембранозно-пролиферативного гломерулонефрита типа II или острого гемолитико-уремического синдрома, или, альтернативно, она может кодировать антитела к сосудистому эндотелиальному фактору роста (VEGF), применимые для лечения опосредуемых с помощью VEGF заболеваний, таких как рак. 15

В другом варианте осуществления РНК, предпочтительно мРНК, может кодировать функциональные моноклональные или поликлональные антитела, которые могут быть применимы для нейтрализации или происходящего другим образом подавления вируса или репликации вируса.

20 Альтернативно, РНК, предпочтительно мРНК, может содержать последовательность рибонуклеотидов, которая кодирует антиген, который предпочтительно можно использовать в предупредительных или терапевтических целях.

В другом варианте осуществления мРНК может кодировать белок или 25 белки, которые вызывают иммуномодуляцию, такие как цитокины, включая хемокины, интерфероны (такие как интерферон лямбда), интерлейкины, лимфокины и факторы некроза опухоли.

В другом варианте осуществления РНК, предпочтительно мРНК, может 30 содержать последовательность рибонуклеотидов, которая кодирует полипептид или белок, который можно использовать в технологиях редактирования генома. Редактирование генома является типом генной инженерии, в котором проводят включение, удаление или замену фрагментов ДНК в геноме организма с использованием нуклеаз. Эти нуклеазы создают сайт-специфичные разрывы на

необходимых участках генома. Возникшие разрывы репарируются путем негомологичного соединения концов или путем гомологичной рекомбинации, это обеспечивает целевые мутации в геноме, при этом происходит "редактирование" генома. Разрывами могут являться одноцепочечные разрывы или двухцепочечные разрывы (ДЦР), причем предпочтительными являются двухцепочечные разрывы (ДЦР). В данной области техники известны многочисленные системы, предназначенные для редактирования генома, в которых используют разные полипептиды или белки, т. е., например, систему CRISPR-Cas, мегануклеазы, нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN) и эффекторную нуклеазу, подобную активатору транскрипции (TALEN). Обзор методик редактирования генома приведен в публикации Trends in Biotechnology, 2013, 31 (7), 397-405.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления РНК, предпочтительно мРНК, может содержать последовательность рибонуклеотидов, которая кодирует полипептид или белок семейства белков Cas (связанный с CRISPR белок), предпочтительно Cas9 (связанный с CRISPR белок 9). Белки семейства белков Cas, предпочтительно Cas9, можно использовать в методиках на основе CRISPR/Cas9 и/или в технологиях редактирования генома CRISPR/Cas9. Обзор систем CRISPR-Cas, предназначенные для редактирования, регулирования генома и направленного действия на геном, приведен в публикации Nat. Biotechnol., 2014, 32 (4):347-355.

В другом предпочтительном варианте осуществления РНК, предпочтительно мРНК, может содержать последовательность рибонуклеотидов, которая кодирует мегануклеазу. Мегануклеазы представляют собой эндодезоксирибонуклеазы, которые, в отличие от "обычных" эндодезоксирибонуклеаз, распознают большой сайт распознавания (например, последовательность двухцепочечной ДНК, содержащей от 12 до 40 пар оснований). В результате этого, в любом заданном геноме соответствующий сайт встречается лишь несколько раз, предпочтительно только один раз. Поэтому мегануклеазы считаются наиболее специфичными природными рестриктивными ферментами и, соответственно, являются средствами, подходящими для использования в технологиях редактирования генома.

В другом предпочтительном варианте осуществления РНК, предпочтительно мРНК, содержит последовательность рибонуклеотидов, которая кодирует нуклеазу с цинковым пальцем (ZFN). ZFN представляют собой искусственные рестриктивные ферменты, полученные путем слияния связывающего ДНК домена цинкового пальца с расщепляющим ДНК доменом. Можно создать домены цинковых пальцев, направленно действующие на конкретные необходимые последовательности ДНК, и это обеспечивает возможность того, что нуклеазы с цинковыми пальцами направленно действуют на особые последовательности, содержащиеся в сложных геномах. Пользуясь преимуществом наличия собственного механизма репарации ДНК, ZFN можно использовать для точного изменения генома высших организмов и поэтому они являются средствами, подходящими для использования в технологиях редактирования генома.

В другом предпочтительном варианте осуществления РНК, предпочтительно мРНК, может содержать последовательность рибонуклеотидов, которая кодирует эффекторную нуклеазу, подобную активатору транскрипции (TALEN). TALEN представляют собой рестриктивные ферменты, которые можно создать для разрезания специфической последовательности ДНК. TALEN представляют собой белки слияния, в которых связывающий ДНК домен эффектора TAL слит с расщепляющим ДНК доменом нуклеазы. Можно создать эффекторы, подобные активатору транскрипции (TALE), которые связывают практически любую необходимую последовательность ДНК. Таким образом, при использовании вместе с нуклеазой с их помощью можно разрезать ДНК на конкретных необходимых участках.

Хотя приведенные выше варианты осуществления описаны применительно к молекуле РНК, предпочтительно мРНК, предлагаемой в настоящем изобретении, как отмечено выше, настоящее изобретение не ограничивается применением только РНК, предпочтительно мРНК, и в нем можно применять любые молекулы нуклеиновых кислот, такие как молекула ДНК.

Указанная молекула ДНК может кодировать указанную выше РНК, предпочтительно указанную выше мРНК, и, соответственно, может содержать генетическую информацию соответствующим образом транскрибированной молекулы РНК.

Поэтому предпочтительные варианты осуществления, приведенные выше и ниже в отношении молекулы РНК, предпочтительно молекулы мРНК, которая может содержаться в наночастицах, применяющихся в настоящем изобретении, с соответствующими изменениями применимы к молекуле ДНК, предлагаемой в настоящем изобретении.

Альтернативно указанному выше, РНК содержит последовательность рибонуклеотидов, которая не экспрессируется в виде белка или полипептида. Таким образом, термин "РНК" означает не только молекулу полинуклеотида, которая при введении в клетку может транслироваться в полипептид/белок или его фрагмент. Точнее, также предусмотрено, что РНК содержит последовательность рибонуклеотидов, которая не транслируется с образованием белков. В этом контексте предусмотрено, что РНК содержит последовательность рибонуклеотидов, которая предпочтительно предоставляет генетическую информацию для последовательности антисмысловой РНК, киРНК или миРНК, или другой необходимой некодирующей последовательности рибонуклеотидов.

Таким образом, РНК также может представлять собой последовательность антисмысловой РНК, киРНК или миРНК. Последовательности антисмысловой РНК, киРНК или миРНК можно использовать для обеспечения на некотором этапе выключения действия определенной молекулы РНК. В частности, это может являться желательным и подходящим при использовании в определенных медицинских целях и для лечения определенного заболевания и, в частности, в терапиях на основе РНК, описанных выше и ниже в настоящем изобретении.

Выключение действия молекулы РНК можно обеспечить с помощью механизма РНКи (РНК-интерференции) с использованием цепи нуклеиновой кислоты, которая комплементарна определенной последовательности РНК. Термин "РНК-интерференция" или "ингибирующая РНК" (РНКи/иРНК) описывает использование двухцепочечной РНК для направленного разложения конкретных мРНК, при этом обеспечивается выключение их трансляции. Предпочтительные молекулы ингибирующих РНК могут быть выбраны из группы, состоящей из следующих: двухцепочечная РНК (дцРНК), киРНК, мшРНК и мвРНК (малая временная РНК). дцРНК, соответствующую последовательности гена, можно синтезировать *in vitro* и ввести в клетку. дцРНК также можно ввести в клетку в форме вектора, экспрессирующего целевую

последовательность гена, обладающего смысловой и антисмысловой ориентацией, например, в форме образующей шпильку мРНК. Смысловые и антисмысловые последовательности также могут экспрессироваться из отдельных векторов, при этом при экспрессии отдельных антисмысловых и смысловых молекул образуются двухцепочечная РНК. В данной области техники известно, что в некоторых случаях экспрессия последовательности в смысловой ориентации или даже последовательности промотора обеспечивает образование дцРНК и затем киРНК вследствие внутренних механизмов амплификации в клетке. Соответственно, в соответствии с настоящим изобретением применимы все средства и методики, которые приводят к уменьшению активности полипептида или белка, кодируемого кодирующим участком,. Так, например, для получения/включения этих киРНК можно использовать смысловые конструкции, антисмысловые конструкции, шпилечные конструкции, смысловые и антисмысловые молекулы и их комбинации. дцРНК включается в естественный процесс, включающий высококонсервативную нуклеазу Dicer, которая разрезает молекулы предшественника дцРНК на короткие интерферирующие РНК (киРНК). Образование и получение киРНК, а также способ подавления экспрессии целевого гена описаны, в частности в WO 02/055693, в публикациях Wei (2000) *Dev. Biol.* 15:239-255; La Count (2000) *Biochem. Paras.* 111:67-76; Baker (2000) *Curr. Biol.* 10:1071-1074; Svoboda (2000) *Development* 127:4147-4156 или Marie (2000) *Curr. Biol.* 10:289-292. Затем эти киРНК образуют специфичную по отношению к последовательности часть РНК-индуцируемого комплекса выключения гена (RISC), мультикомплекс нуклеазы, который разрушает матричные РНК, гомологичные обеспечивающим выключение. В публикации Elbashir (2001) *EMBO J.* 20:6877-6888, показано, что двойные спирали РНК, содержащие 21 нуклеотид, можно использовать в клеточных культурах для вмешательства в экспрессию гена в клетках млекопитающих.

Методики получения и конструирования киРНК известны в данной области техники и они описаны в публикации Elbashir (2002) *Methods* 26:199-213, в интернете на веб-сайтах поставщиков киРНК, например, Qiagen GmbH (<https://www1.qiagen.com/GeneGlobe/Default.aspx>); Dharmacon ([www.dharmacon.com](http://www.dharmacon.com)); Xeragon Inc. (<http://www.dharmacon.com/Default.aspx>) и

Ambion ([www.ambion.com](http://www.ambion.com)), или на веб-сайте исследовательской группы Tom Tuschl (<http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html>). Кроме того, в интернете существуют программное обеспечение для получения киРНК из заданной последовательности мРНК (например, [http://www.ambion.com/techlib/misc/киРНК\\_finder.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/киРНК_finder.html) или <http://katahdin.cshl.org:9331/RNAi/html/rnai.html>). Остатки уридина во втором нуклеотиде на выступающем 3'-конце можно заменить 2'-дезокситимидином без потери активности, это существенно уменьшает стоимость синтеза РНК и также может улучшить устойчивость двойных спиралей киРНК при введении в клетки млекопитающих (публикация Elbashir (2001), указанная выше). киРНК также можно получить путем ферментативного синтеза с использованием РНК-полимеразы T7 или других РНК-полимераз (Donze (2002) *Nucleic Acids Res* 30:e46). Короткие двойные спирали РНК, которые могут опосредовать эффективную РНК-интерференцию (экиРНК (полученные с помощью эндорибонуклеазы киРНК)), также можно получить путем гидролиза с помощью рибонуклеазы III *Escherichia coli* (Yang (2002) *PNAS* 99:9942-9947). Кроме того, разработаны векторы экспрессии, предназначенные для экспрессирования в эукариотических клетках двухцепочечных киРНК, соединенных петлями малой образующей шпильки РНК (см., например, публикацию Brummelkamp (2002) *Science* 296:550-553). Все эти конструкции можно разработать с помощью программного обеспечения, указанного выше. Кроме того, для прогнозирования последовательности киРНК можно использовать имеющиеся в продаже средства прогнозирования последовательности, включенные программное обеспечение для анализа последовательности, или имеющиеся в продаже отдельно, например, siRNA Design Tool, выпускающееся фирмой Oligoengine, [www.oligoEngine.com](http://www.oligoEngine.com) (Seattle, WA).

микро-РНК (миРНК) сходна с короткими интерферирующими РНК (киРНК), описанными выше. микро-РНК (миРНК) представляет собой короткую некодирующую молекулу РНК (содержащую примерно 22 нуклеотида), содержащуюся в растениях, организмах животных и некоторых вирусах, которая участвует в выключении РНК и посттранскрипционной регуляции экспрессии гена. Действие миРНК осуществляется путем спаривания оснований с комплементарными последовательностями внутри молекул мРНК. В результате

этого, происходит выключение этих молекул мРНК вследствие протекания одного или большего количества следующих процессов: (1) разрезание цепи мРНК на две части, (2) дестабилизация мРНК путем укорачивания ее поли(А)-хвоста и (3) менее эффективная трансляция мРНК рибосомами с образованием белков. Как указано выше, миРНК сходны с короткими интерферирующими РНК (киРНК), участвующими в пути РНК-интерференции (РНКи), за исключением того, что миРНК образованы из участков транскриптов РНК, которые сворачиваются с образованием коротких шпилек, тогда как киРНК образованы из более длинных участков двухцепочечной РНК.

10 Молекула ДНК, применяющаяся в препаратах суспензии и аэрозоле, предлагаемых в настоящем изобретении, также может являться такой, которая кодирует указанную выше РНК, например, указанную выше киРНК или миРНК, и, соответственно, может содержать генетическую информацию соответствующим образом транскрибированной молекулы РНК. Поэтому  
15 предпочтительные варианты осуществления, приведенные выше и ниже применительно к молекуле РНК, предпочтительно молекуле мРНК, которая может содержаться в наночастицах, применяющихся в настоящем изобретении, с соответствующими изменениями применимы к молекуле ДНК.

Следует понимать, что в контексте настоящего изобретения наночастицы  
20 могут содержать нуклеиновую кислоту одного типа, предпочтительно РНК, такую как мРНК, и, альтернативно, она могут содержать комбинацию нуклеиновых кислот двух или большего количества типов, предпочтительно РНК, например, в форме частиц, содержащих в отдельных частицах нуклеиновые кислоты двух или большего количества типов, предпочтительно РНК, или в  
25 форме частиц, которые различаются типом содержащейся в них нуклеиновой кислоты, предпочтительно РНК, такой как мРНК.

Как это разъяснено выше, наночастицы, содержащиеся в препарате водной суспензии, предлагаемом в настоящем изобретении, и в аэрозоле, предлагаемом в настоящем изобретении, дополнительно содержат ионизируемый липид или  
30 ионизируемый липидоид, использующийся в качестве компонента (b). Следует понимать, что это включает возможность того, что наночастицы содержат комбинацию различных ионизируемых липидов, комбинацию различных ионизируемых липидоидов или комбинацию одного или большего количества

ионизируемых липидов и одного или большего количества ионизируемых липидоидов. Наночастицы, применяющиеся в контексте настоящего изобретения, обычно содержат нуклеиновую кислоту (а) и ионизируемый липид или ионизируемый липидоид (b) в виде смеси этих компонентов.

5 Термины "ионизируемый липид" и "ионизируемый липидоид" используют в области техники, относящейся к липидным наночастицам и липидоподобным наночастицам, для описания липида или липидоида, который является протонированным для обеспечения положительного заряда, или который может  
10 являться протонированным для обеспечения положительного заряда. Таким образом, ионизируемые липиды и липидоиды соответственно также называются "протонируемыми липидами" и "протонируемыми липидоидами" или "титруемыми липидами" и "титруемыми липидоидами" соответственно. Для  
15 специалиста в данной области техники должно быть очевидно, что указание на "ионизируемый липид" или "ионизируемый липидоид" включает указание на ионизируемый липид или липидоид, находящийся в протонированной или в  
непротонированной форме. Кроме того, следует понимать, что протонированное или непротонированное состояние липида или липидоида обычно определяется  
20 значением рН среды, окружающей липид или липидоид, например, значением рН водного раствора разбавителя, содержащегося в препарате водной суспензии и в аэрозоле, предлагаемых в настоящем изобретении,.

В контексте настоящего изобретения противоионы (анионы) для  
положительных зарядов положительно заряженных ионизируемых липидов или  
ионизируемых липидоидов обычно предоставлены анионными фрагментами,  
содержащимися в нуклеиновой кислоте. Если положительно заряженные группы  
25 содержатся в избытке по отношению к количеству анионных фрагментов, содержащихся в нуклеиновой кислоте, то положительные заряды можно  
нейтрализовать с помощью других фармацевтически приемлемых анионов, таких как хлорид, бромид или йодид, сульфат, нитрат, фосфат, гидрофосфат,  
дигидрофосфат, карбонат или гидрокарбонат, или с помощью полианионного  
30 компонента, отличающегося от нуклеиновой кислоты, который может содержаться в наночастицах в качестве необязательного компонента.

Ионизируемые липиды и ионизируемые липидоиды хорошо известны, как компоненты липидных наночастиц или липидоподобных наночастиц. В

контексте настоящего изобретения на тип ионизируемого липида или ионизируемого липидоида, содержащегося в наночастицах, не налагаются особые ограничения.

5 Обычно ионизируемый липид или липидоид соответственно содержит первичную, вторичную или третичную аминогруппу, которая может выступать в роли акцептора протона, и которая, таким образом, может являться протонированной или непротонированной. Ионизируемый липидоид обычно содержит множество таких аминогрупп, например, две или большее количество, предпочтительно три или большее количество.

10 Предпочтительно, если ионизируемым липидом, который может содержаться в наночастицах, применяющихся в препарате суспензии и в аэрозоле, предлагаемых в настоящем изобретении, является липид, который содержит протонируемую головную группу, которая в качестве протонируемой или протонированной группы содержит одну или большее количество  
15 первичных, вторичных или третичных аминогрупп, предпочтительно одну такую группу, и один или большее количество, предпочтительно один или два гидрофобных фрагмента, связанных с головной группой.

Примерами этих предпочтительных ионизируемых липидов являются

20 i) липид, который содержит протонируемую головную группу, которая в качестве протонируемой или протонированной группы содержит одну или большее количество первичных, вторичных или третичных аминогрупп, предпочтительно одну такую группу, и один гидрофобный фрагмент, связанный с головной группой;

25 ii) липид, который в качестве протонируемой или протонированной головной группы содержит одну вторичную или третичную аминогруппу и два гидрофобных фрагмента, связанных с головной группой.

Гидрофобный фрагмент, содержащийся в этих предпочтительных липидах, предпочтительно содержит один или большее количество следующих:  
30 обладающий линейной цепью алифатический остаток, например, обладающий линейной цепью алифатический остаток, содержащий от 8 до 18 атомов углерода, обладающий разветвленной цепью алифатический остаток, например, обладающий разветвленной цепью алифатический остаток, содержащий от 8 до 18 атомов углерода, или алициклическая кольцевая структура, которая может

являться конденсированной кольцевой структурой, например, алициклическая кольцевая структура, содержащая от 10 до 18 атомов углерода. Кроме того, гидрофобный фрагмент может содержать одну или большее количество мостиковых групп, которые способствуют связыванию фрагмента с головной группой, или которые обеспечивают возможность связывания двух или большего количества указанных выше алифатических остатков друг с другом. Кроме того, он может содержать один или большее количество заместителей, их количество является таким, что сохраняются гидрофобные характеристики фрагмента.

Предпочтительно, если ионизируемым липидоидом, который может содержаться в наночастицах, применяющихся в препарате суспензии и в аэрозоле, предлагаемых в настоящем изобретении, является олигоамин, более предпочтительно олигоалкиламин, который содержит по меньшей мере две, предпочтительно по меньшей мере три аминокруппы, выбранные из числа протонируемых или протонированных вторичных и третичных аминокрупп, каждая из которых может содержать присоединенный к ней гидрофобный фрагмент. В дополнение к аминокруппам, поддерживающим гидрофобный остаток, липидоид может содержать дополнительные протонируемые или протонированные аминокруппы, выбранные из числа первичных, вторичных и третичных аминокрупп. Предпочтительно, если полное количество аминокрупп равно от 3 до 10, более предпочтительно от 3 до 6. Предпочтительно, если полное количество гидрофобных фрагментов, присоединенных к аминокруппам, равно от 3 до 6. Предпочтительно, если в олигоалкиламине отношение количества гидрофобных фрагментов, присоединенных к аминокруппам, к полному количеству аминокрупп составляет от 0,75 до 1,5.

Гидрофобный фрагмент, содержащийся в таком предпочтительном липидоиде, предпочтительно содержит один или большее количество следующих: обладающий линейной цепью алифатический остаток, например, обладающий линейной цепью алифатический остаток, содержащий от 8 до 18 атомов углерода, и обладающий разветвленной цепью алифатический остаток, например, обладающий разветвленной цепью алифатический остаток, содержащий от 8 до 18 атомов углерода. Кроме того, гидрофобный фрагмент может содержать одну или большее количество мостиковых групп, которые способствуют связыванию фрагмента с аминокруппой, или которые



p равно 1 или 2,

m равно 1 или 2; n равно 0 или 1 и  $m+n \geq 2$ ; и

$R^{1A}$  -  $R^{6A}$  независимо друг от друга выбраны из числа следующих: водород; -  
CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7A</sup>, -CH(R<sup>7A</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7A</sup>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-

5 NH-R<sup>7A</sup>; -CH<sub>2</sub>-R<sup>7A</sup>; -C(NH)-NH<sub>2</sub>; цепь поли(этиленгликоля) и лиганд рецептора;  
где R<sup>7A</sup> выбран из числа следующих: C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub>-алкил и C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub>-алкенил, содержащий  
одну двойную связь C-C;

при условии, что по меньшей мере два из остатков  $R^{1A}$  -  $R^{6A}$  выбраны из числа  
следующих: -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7A</sup>, -CH(R<sup>7A</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7A</sup>, -CH<sub>2</sub>-  
10 CH<sub>2</sub>-(C=O)-NH-R<sup>7A</sup> и -CH<sub>2</sub>-R<sup>7A</sup>, где R<sup>7A</sup> выбран из числа следующих: C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub>-  
алкил и C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub>-алкенил, содержащий одну двойную связь C-C;

или его протонированную форму, или состоит из нее, где один или большее  
количество атомов азота, содержащихся в соединении формулы (b-1), являются  
протонированными, при этом образуется соединение, обладающее

15 положительным зарядом.

Предпочтительно, если  $R^{1A}$  -  $R^{6A}$  независимо выбраны из числа следующих:  
водород; группа -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7A</sup>, -CH(R<sup>7A</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7A</sup>, -  
CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-NH-R<sup>7A</sup> и -CH<sub>2</sub>-R<sup>7A</sup>, где R<sup>7A</sup> выбран из числа следующих: C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub>-  
алкил и C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub>-алкенил, содержащий одну двойную связь C-C; при условии, что

20 по меньшей мере два из остатков  $R^{1A}$  -  $R^{6A}$ , более предпочтительно по меньшей  
мере три из остатков  $R^{1A}$  -  $R^{6A}$  и еще более предпочтительно по меньшей мере  
четыре из остатков  $R^{1A}$  -  $R^{6A}$  представляют собой группу, выбранную из числа  
следующих: -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7A</sup>, -CH(R<sup>7A</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7A</sup>, -CH<sub>2</sub>-  
CH<sub>2</sub>-(C=O)-NH-R<sup>7A</sup> и -CH<sub>2</sub>-R<sup>7A</sup>, где R<sup>7A</sup> выбран из числа следующих: C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub>-  
25 алкил и C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub>-алкенил, содержащий одну двойную связь C-C. Более

предпочтительно, если  $R^{1A}$  -  $R^{6A}$  независимо выбраны из числа следующих:  
водород и группа -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7A</sup>, где R<sup>7A</sup> выбран из числа следующих: C<sub>3</sub>-  
C<sub>18</sub>-алкил и C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub>-алкенил, содержащий одну двойную связь C-C; при условии,  
что по меньшей мере два из остатков  $R^{1A}$  -  $R^{6A}$ , более предпочтительно по

30 меньшей мере три из остатков  $R^{1A}$  -  $R^{6A}$  и еще более предпочтительно по  
меньшей мере четыре из остатков  $R^{1A}$  -  $R^{6A}$  представляют собой группу -CH<sub>2</sub>-  
CH(OH)-R<sup>7A</sup>, где R<sup>7A</sup> выбран из числа следующих: C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub>-алкил и C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub>-  
алкенил, содержащий одну двойную связь C-C.

Предпочтительно, если  $R^{7A}$  выбран из числа следующих:  $C_8$ - $C_{18}$ -алкил и  $C_8$ - $C_{18}$ -алкенил, содержащий одну двойную связь С-С, и более предпочтительно, если он из числа следующих:  $C_8$ - $C_{12}$ -алкил и  $C_8$ - $C_{12}$ -алкенил, содержащий одну двойную связь С-С. Алкильные группы обычно являются более

5 предпочтительными в качестве  $R^{7A}$ , чем алкенильные группы.

Если любая из групп  $R^{1A}$  -  $R^{6A}$  представляет собой защитную группу аминогруппы, такую как описанная, например, в WO2006/138380, их предпочтительными вариантами осуществления являются трет-бутоксикарбонил (Boc), 9-флуоренилметоксикарбонил (Fmoc) или карбобензилокси группу (Cbz).

10 Если любая из групп  $R^{1A}$  -  $R^{6A}$  представляет собой лиганд рецептора, то подходящие примеры приведены в публикации Philipp and Wagner in "Gene and Cell Therapy - Therapeutic Mechanisms and Strategy", 3<sup>rd</sup> Edition, Chapter 15. CRC Press, Taylor & Francis Group LLC, Boca Raton 2009. Предпочтительные лиганды рецепторов для легочной ткани описаны в публикации Pfeifer et al. 2010, Ther  
15 Deliv. 1 (1):133-48. Предпочтительные лиганды рецепторов включают синтетические циклические или линейные пептиды, такие как полученные при скрининге пептидных библиотек, предназначенные для связывания с конкретной находящейся на поверхности клетки структурой или с клеткой конкретного типа, циклические или линейные пептиды, содержащие последовательность RGD  
20 (аргинин-глицин-аспарагиновая кислота), синтетические или природные углеводы, такие как сиаловая кислота, галактоза или манноза, или синтетические лиганды, образованные при реакции, например, углевода с пептидом, антитела, специфическим образом распознающие находящиеся на поверхности клетки структуры, фолиевую кислоту, эпидермальный фактор роста и образованные из  
25 него пептиды, трансферрин, антитела к рецептору трансферрина, нанотела и фрагменты антител, или утвержденные к применению лекарственные средства, которые связываются с известными находящимися на поверхности клетки молекулами.

Если любая из групп  $R^{1A}$  -  $R^{6A}$  представляет собой цепь  
30 поли(этиленгликоля), то предпочтительная молекулярная масса цепи поли(этиленгликоля) равна 100-20000 г/моль, более предпочтительно 1000-10000 г/моль и наиболее предпочтительно 1000-5000 г/моль.

В формуле (b-1) переменная  $p$  предпочтительно равна 1.

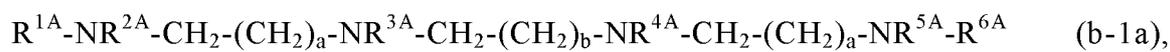
В формуле (b-1)  $m$  равно 1 или 2;  $n$  равно 0 или 1 и  $m+n \geq 2$ . Другими словами, если  $m$  равно 1, то  $n$  должен быть равно 1, и если  $m$  равно 2, то  $n$  может быть равно 0 или 1. Если  $n$  равно 0, то  $m$  должен быть равно 2. Если  $n$  равно 1, то  $m$  может быть равно 1 или 2.

5 В формуле (b-1) переменная  $n$  предпочтительно равна 1. более предпочтительно, если  $m$  равно 1 и  $n$  равно 1.

Таким образом, комбинация  $p = 1$ ,  $m = 1$  и  $n = 1$  также является предпочтительной.

10 В формуле (Ib-1) в отношении переменных  $a$  и  $b$  предпочтительно, если один из  $a$  и  $b$  равно 1 и другой равно 2 или 3. Более предпочтительно, если  $a$  равно 1 и  $b$  равно 2, или если  $a$  равно 2 и  $b$  равно 1. Наиболее предпочтительно,  $a$  равно 1 и  $b$  равно 2.

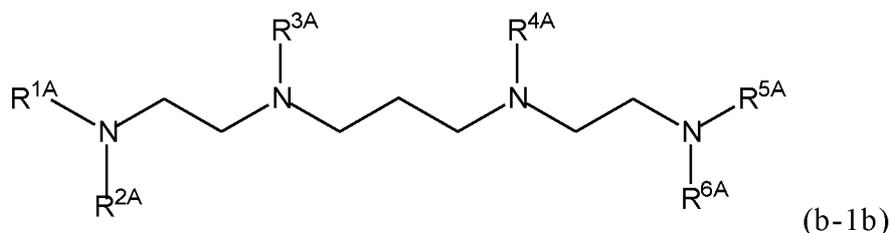
15 С учетом вышеизложенного, кроме того, предпочтительно, если соединением формулы (b-1) является соединение формулы (b-1a), и если компонент (b) предпочтительно содержит липидоид, описывающийся следующей формулой (b-1a):



в которой  $a$ ,  $b$  и  $R^{1A} - R^{6A}$  являются такими, как определено для формулы (b-1), включая их предпочтительные варианты осуществления;

20 или его протонированную форму, или состоит из нее, где один или большее количество атомов азота, указанных в формуле (b-1a), являются протонированными, при этом образуется соединение, обладающее положительным зарядом.

25 В другом еще более предпочтительном варианте осуществления соединением формулы (b-1) является соединение формулы (b-1b) и компонент (b) содержит липидоподобное соединение следующей формулы (b-1b):

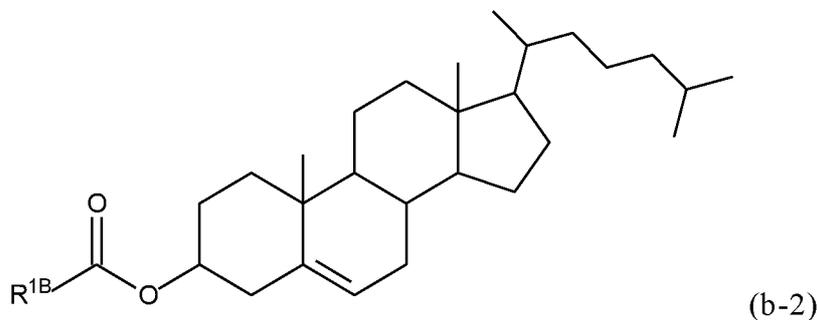


в которой  $R^{1A} - R^{6A}$  являются такими, как определено для формулы (b-1), включая их предпочтительные варианты осуществления;

или его протонированную форму, или состоит из нее, где один или большее количество атомов азота, указанных в формуле (b-1b), являются протонированными, при этом образуется соединение, обладающее положительным зарядом.

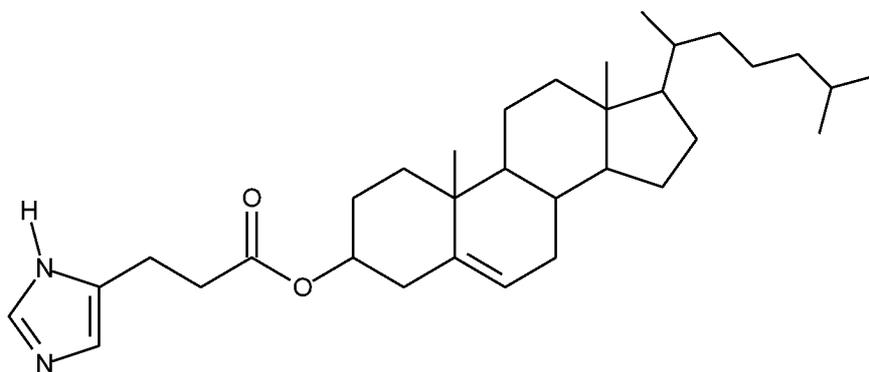
5 Таким образом, в особенно предпочтительном варианте осуществления компонент (b) содержит липидоподобное соединение, описываемое приведенной выше формулой (b-1b), или его протонированную форму, или состоит из нее, и  $R^{1A}$  -  $R^{6A}$  независимо выбраны из числа следующих: водород и  $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$ , где  $R^{7A}$  выбран из числа следующих:  $C_8-C_{18}$ -алкил и  $C_8-C_{18}$ -алкенил, содержащий одну двойную связь C-C, при условии, что по меньшей мере два из остатков  $R^{1A}$  -  $R^{6A}$  представляют собой  $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$ , более предпочтительно по меньшей мере три из остатков  $R^{1A}$  -  $R^{6A}$  и еще более предпочтительно по меньшей мере четыре из остатков  $R^{1A}$  -  $R^{6A}$  представляют собой  $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$ , где  $R^{7A}$  выбран из числа следующих:  $C_8-C_{18}$ -алкил и  $C_8-$   
10  $C_{18}$ -алкенил, содержащий одну двойную связь C-C.  
15

В другом типичном варианте осуществления компонент (b) содержит ионизируемый липид формулы (b-2):

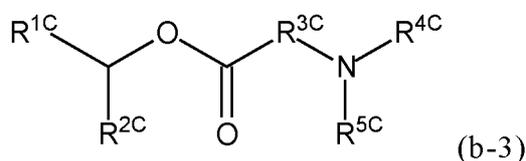


20 в которой  $R^{1B}$  обозначает органическую группу, включающую одну или большее количество первичных, вторичных или третичных аминогрупп, или его протонированную форму, или состоит из нее, где один или большее количество атомов азота, содержащихся в первичных, вторичных или третичных аминогруппах, содержащихся в  $R^{1B}$ , являются протонированными, при этом образуется соединение, обладающее положительным зарядом.

Предпочтительно, если соединение формулы (b-2) обладает следующей структурой:



В другом типичном варианте осуществления компонент (b) содержит  
5 ионизируемый липид формулы (b-3):



в которой

R<sup>1C</sup> и R<sup>2C</sup> независимо друг от друга выбраны из числа следующих: C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub>-  
алкильная группа и C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub>-алкенильная группа, предпочтительно из числа

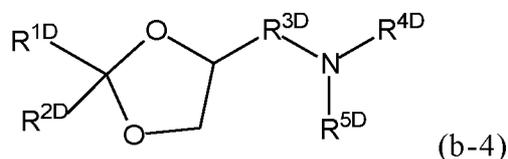
10 следующих: C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>-алкильная группа и C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>-алкенильная группа,

R<sup>3C</sup> обозначает C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкандиильную группу, предпочтительно C<sub>2</sub>- или C<sub>3</sub>-  
алкандиильную группу, и

R<sup>4C</sup> и R<sup>5C</sup> независимо обозначают водород или C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкил и предпочтительно  
обозначают метил;

15 или его протонированную форму, или состоит из нее, где один или большее  
количество атомов азота, содержащихся в соединении формулы (b-3), являются  
протонированными, при этом образуется соединение, обладающее  
положительным зарядом. В качестве примера ионизируемого липида формулы  
(b-3) можно привести следующий: DLin-MC3-DMA (6Z,9Z,28Z,31Z)-  
20 гептатриаконт-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат).

В еще одном типичном варианте осуществления компонент (b) содержит  
ионизируемый липид формулы (b-4):



в которой

$R^{1D}$  и  $R^{2D}$  независимо друг от друга выбраны из числа следующих:  $C_8$ - $C_{18}$ -алкильная группа и  $C_8$ - $C_{18}$ -алкенильная группа, предпочтительно из числа следующих:  $C_{12}$ - $C_{18}$ -алкильная группа и  $C_{12}$ - $C_{18}$ -алкенильная группа,

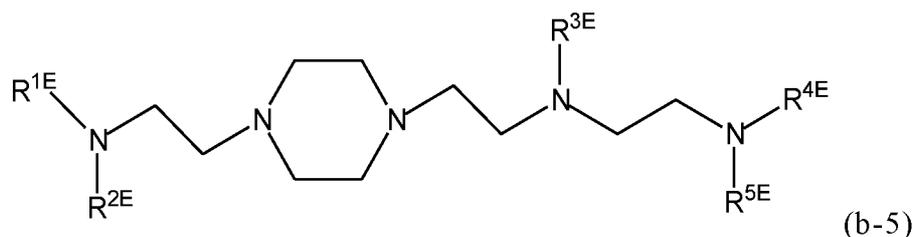
5  $R^{3D}$  обозначает  $C_1$ - $C_6$ -алкандиильную группу, предпочтительно  $C_2$ -алкандиильную группу, и

$R^{4D}$  и  $R^{5D}$  независимо обозначают водород или  $C_1$ - $C_3$ -алкил и предпочтительно обозначают метил;

или его протонированную форму, или состоит из нее, где один или большее

10 количество атомов азота, содержащихся в соединении формулы (b-4), являются протонированными, при этом образуется соединение, обладающее положительным зарядом.

В еще одном типичном варианте осуществления компонент (b) содержит ионизируемый липидоид формулы (b-5):



в которой  $R^{1E}$  -  $R^{5E}$  независимо друг от друга выбраны из числа следующих: водород,  $-CH_2-CH(OH)-R^{7E}$ ,  $-CH(R^{7E})-CH_2-OH$ ,  $-CH_2-CH_2-(C=O)-O-R^{7E}$ ,  $-CH_2-CH_2-(C=O)-NH-R^{7E}$  и  $-CH_2-R^{7E}$ , где  $R^{7E}$  выбран из числа следующих:  $C_3$ - $C_{18}$ -алкил или  $C_3$ - $C_{18}$ -алкенил, содержащий одну двойную связь  $C-C$ , при условии,

20 что по меньшей мере два из остатков  $R^{1E}$  -  $R^{5E}$  выбраны из числа следующих:  $-CH_2-CH(OH)-R^{7E}$ ,  $-CH(R^{7E})-CH_2-OH$ ,  $-CH_2-CH_2-(C=O)-O-R^{7E}$ ,  $-CH_2-CH_2-(C=O)-NH-R^{7E}$  и  $-CH_2-R^{7E}$ , где  $R^{7E}$  выбран из числа следующих:  $C_3$ - $C_{18}$ -алкил или  $C_3$ - $C_{18}$ -алкенил, содержащий одну двойную связь  $C-C$ ;

или его протонированную форму, или состоит из нее, где один или большее

25 количество атомов азота, содержащихся в соединении формулы (b-5), являются протонированными, при этом образуется соединение, обладающее положительным зарядом.

В формуле (b-5) предпочтительно, если  $R^{1E}$  -  $R^{5E}$  независимо обозначают  $-CH_2-CH(OH)-R^{7E}$ , где  $R^{7E}$  выбран из числа следующих:  $C_8$ - $C_{18}$ -алкил или  $C_8$ - $C_{18}$ -алкенил, содержащий одну двойную связь  $C-C$ .

30

Еще одним типичным ионизируемым липидом, подходящим для применения в настоящем изобретении, который может содержаться в компоненте (b), или из которого может состоять компонент (b), является ионизируемый липид, раскрытый, как "катионогенный липид формулы I", в заявке РСТ WO 2012/000104 A1, начиная со стр. 104 этого документа, и все его конкретные варианты осуществления, также приведенные в этом документе.

Другими типичными ионизируемыми липидоидами, подходящими для применения в настоящем изобретении, которые могут содержаться в компоненте (b), или из которых может состоять компонент (b), являются ионизируемые липидоиды, раскрытые и заявленные, как "липидоиды на основе аминоспиртов", в заявке РСТ WO 2010/053572 A2, включая соединения, описываемые всеми общими формулами, приведенными в кратком изложении сущности изобретения на стр. 4 документа, и дополнительно определенные в остальной части заявки.

Другими типичными ионизируемыми липидоидами, подходящими для применения в настоящем изобретении, которые могут содержаться в компоненте (b), или из которых может состоять компонент (b), являются ионизируемые липидоиды, раскрытые, как содержащие аминокгруппу липидоиды формул I - V, в заявке РСТ WO 2014/028487 A1, включая их конкретные варианты осуществления.

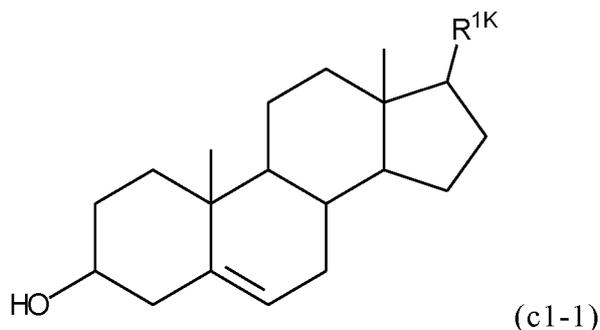
Наночастицы, содержащиеся в препарате водной суспензии и в аэрозоле, предлагаемых в настоящем изобретении, в дополнение к нуклеиновой кислоте и ионизируемому липиду или ионизируемому липидоиду, в качестве предпочтительных необязательных компонентов могут содержать один или большее количество следующих компонентов (с1) - (с6):

- (с1) неионизируемый липид, обладающий структурой стерина;
- (с2) глицерофосфолипид;
- (с3) конъюгированный с ПЭГ липид;
- (с4) конъюгированный с полисаркозином липид;
- (с5) ПАСилированный липид; и
- (с6) катионогенный полимер.

Компонентом (с1) является липид, обладающий структурой стерина. По существу, подходящими липидами являются соединения, которые обладают

основной структурой стероида, содержащие гидроксигруппу в положении 3 кольца А.

Типичный неионизируемый липид, обладающий структурой стерина, который может содержаться в компоненте (с1), или из которого может состоять компонент (с1), обладает структурой формулы (с1-1)



в которой R<sup>1K</sup> обозначает C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>-алкильную группу.

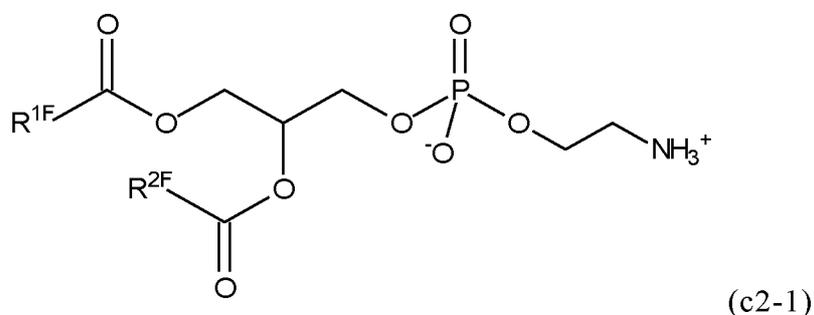
Другие типичные неионизируемые липиды, обладающие структурой стерина, которые могут содержаться в компоненте (с1), или из которых может состоять компонент (с1), включают описанные в публикации S. Patel et al., Naturally-occurring cholesterol analogues in lipid nanoparticles induce polymorphic shape and enhance intracellular delivery of mRNA, Nature Communications, 2020, 11:983, в частности, представленные на фиг. 2, приведенном в этой публикации.

Предпочтительно, если компонент (с1) содержит холестерин или состоит из него.

Компонентом (с2) является фосфолипид.

Предпочтительно, если компонент (с2) содержит фосфолипид, выбранный из числа следующих:

соединение формулы (с2-1):

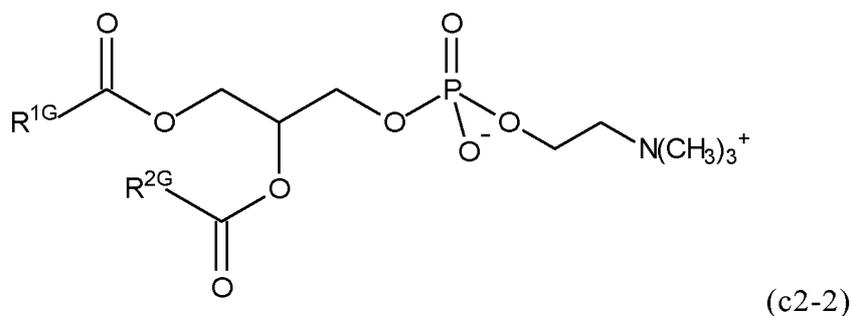


20

в которой

$R^{1F}$  и  $R^{2F}$  независимо друг от друга выбраны из числа следующих:  $C_8$ - $C_{18}$ -алкильная группа и  $C_8$ - $C_{18}$ -алкенильная группа, предпочтительно из числа следующих:  $C_{12}$ - $C_{18}$ -алкильная группа и  $C_{12}$ - $C_{18}$ -алкенильная группа, или его фармацевтически приемлемая соль;

5 и фосфолипид формулы (с2-2):



в которой

$R^{1G}$  и  $R^{2G}$  независимо друг от друга выбраны из числа следующих:  $C_8$ - $C_{18}$ -алкильная группа и  $C_8$ - $C_{18}$ -алкенильная группа, предпочтительно из числа  
10 следующих:  $C_{12}$ - $C_{18}$ -алкильная группа и  $C_{12}$ - $C_{18}$ -алкенильная группа, или его фармацевтически приемлемая соль, или состоит из них.

Более предпочтительно, если компонент (с2) содержит 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ДПФХ) или его фармацевтически приемлемую соль, или состоит из них.

15 Типичные формы солей соединения формулы (с2-1) включают соли, образованные путем взаимодействия кислотной группы -ОН с основанием, или соли, образованные путем взаимодействия аминогруппы с кислотой. В качестве солей, образованных с основанием, можно отметить соли щелочных металлов, такие как натриевые или калиевые соли; щелочноземельных металлов, такие как  
20 кальциевые или магниевые соли, и аммониевые соли. В качестве типичных солей, образованных с кислотой, можно отметить соль, образованную с кислотными группами нуклеиновой кислоты, однако не исключены другие соли, и в качестве примеров можно отметить соли неорганических кислот, такие как хлорид, бромид или йодид, сульфаты, нитраты, фосфаты, гидрофосфаты или  
25 дигидрофосфаты, карбонаты и гидрокарбонаты.

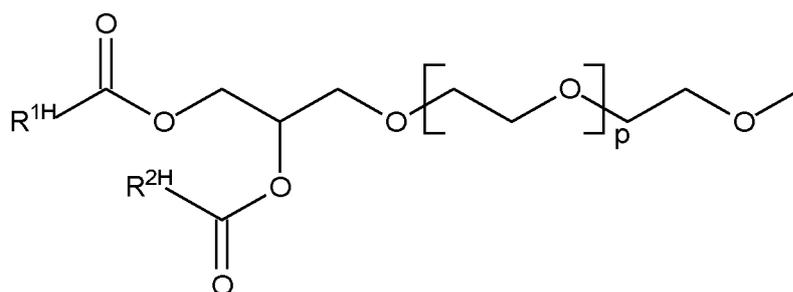
Типичные формы солей соединения формулы (с2-2) включают соли, образованные путем взаимодействия кислотной группы -ОН, присоединенной к атому Р, с основанием, или соли, образованные путем взаимодействия

четвертичной аминогруппы с анионом. В качестве солей, образованных с основанием, можно отметить соли щелочных металлов, такие как натриевые или калиевые соли; щелочноземельных металлов, такие как кальциевые или магниевые соли, и аммониевые соли. В качестве типичных солей, образованных с анионом, можно отметить соль, образованную с кислотными группами нуклеиновой кислоты, однако не исключены другие соли, и в качестве примеров можно отметить соли неорганических кислот, такие как хлорид, бромид или йодид, сульфаты, нитраты, фосфаты, гидрофосфаты или дигидрофосфаты, карбонаты и гидрокарбонаты.

10 Компонентом (с3) является конъюгированный с ПЭГ липид, т. е. липид, который связан ковалентной связью с цепью полиэтиленгликоля.

Предпочтительно, если компонент (с3) содержит конъюгированный с ПЭГ липид выбранный из числа следующих:

соединение формулы (с3-1):



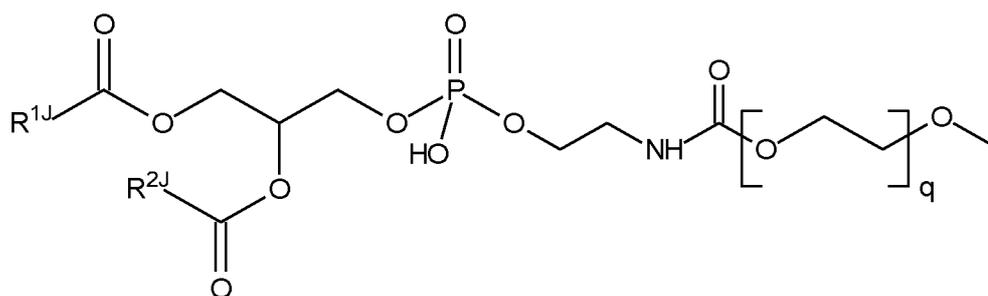
15 (с3-1)

в которой

R<sup>1H</sup> и R<sup>2H</sup> независимо друг от друга выбраны из числа следующих: C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub>-алкильная группа и C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub>-алкенильная группа, предпочтительно из числа следующих: C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>-алкильная группа и C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>-алкенильная группа, и p

20 обозначает целое число, равное от 5 до 200, предпочтительно от 10 до 100, и более предпочтительно от 20 до 60;

и соединение формулы (с3-2):



(с3-2)

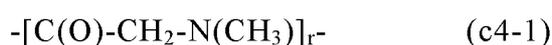
в которой

$R^{1j}$  и  $R^{2j}$  независимо друг от друга выбраны из числа следующих:  $C_8$ - $C_{18}$ -алкильная группа и  $C_8$ - $C_{18}$ -алкенильная группа, предпочтительно из числа следующих:  $C_{12}$ - $C_{18}$ -алкильная группа и  $C_{12}$ - $C_{18}$ -алкенильная группа, и  $q$  обозначает целое число, равное от 5 до 200, предпочтительно от 10 до 100, и более предпочтительно от 20 до 60 или его фармацевтически приемлемую соль, или состоит из них.

Типичные формы солей соединения формулы (с3-2) включают соли, образованные путем взаимодействия кислотной группы -ОН, присоединенной к атому Р, с основанием. В качестве солей, образованных с основанием, можно отметить соли щелочных металлов, такие как натриевые или калиевые соли; щелочноземельных металлов, такие как кальциевые или магниевые соли, и аммониевые соли.

Более предпочтительно, если компонент (с3) содержит 1,2-димиристоил-sn-глицерометокси(полиэтиленгликоль) (ДМГ-ПЭГ) или состоит из него, и еще более предпочтительно, если компонент d) содержит 1,2-димиристоил-sn-глицерометокси(полиэтиленгликоль)-2000 (ДМГ-ПЭГ-2000) или состоит из него.

Компонентом (с4) является конъюгированный с полисаркозином липид, т. е. липид, который связан ковалентной связью с полимерным фрагментом формулы (с4-1):



в которой  $g$  обозначает количество повторяющихся звеньев и предпочтительно равно от 10 до 100.

Компонентом (с5) является ПАСилированный липид, т. е. липид, который связан ковалентной связью полимерным фрагментом, образованным из повторяющихся звеньев пролина (pro)/аланина (ala)/серина (ser).

Компонентом (с6) является катионогенный полимер. Такие полимеры, подходящие для применения для получения наночастиц, содержащих нуклеиновую кислоту, известны в данной области техники. Типичные подходящие катионогенные полимеры описаны в публикации А.С. Silva et al., Current Drug Metabolism, 16, 2015, 3-16, и в цитированной в ней литературе, в публикации J.C. Kasper et al., J. Contr. Rel. 151 (2011), 246-255, в WO



a равно 1 и b обозначает целое число, равное от 2 до 4; или a обозначает целое число, равное от 2 до 4, и b равно 1,

p равно 1 или 2,

m равно 1 или 2; n равно 0 или 1 и  $m+n \geq 2$ ; и

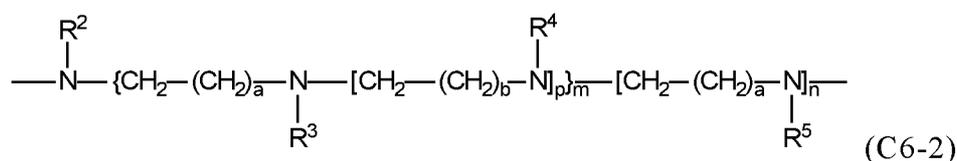
5  $R^2 - R^5$  независимо друг от друга, выбраны из числа следующих: водород, группа  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}^7$ ,  $-\text{CH}(\text{R}^7)-\text{CH}_2-\text{OH}$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-\text{R}^7$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-\text{R}^7$  или  $-\text{CH}_2-\text{R}^7$ , где  $\text{R}^7$  выбран из числа следующих:  $\text{C}_3-\text{C}_{18}$ -алкил или  $\text{C}_3-\text{C}_{18}$ -алкенил, содержащий одну двойную связь C-C; защитная группа аминогруппы и цепь поли(этиленгликоля);

10  $\text{R}^6$  выбран из числа следующих: водород; группа  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}^7$ ,  $-\text{CH}(\text{R}^7)-\text{CH}_2-\text{OH}$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-\text{R}^7$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-\text{R}^7$  или  $-\text{CH}_2-\text{R}^7$ , где  $\text{R}^7$  выбран из числа следующих:  $\text{C}_3-\text{C}_{18}$ -алкил или  $\text{C}_3-\text{C}_{18}$ -алкенил, содержащий одну двойную связь C-C; защитная группа аминогруппы;  $-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2$ ; цепь поли(этиленгликоля) и лиганд рецептора,

15 и где один или большее количество атомов азота, указанных в формуле (сб-1), могут являться протонированными, при этом образуется катионогенная группа формулы (сб-1).

В отношении других предпочтительных определений этих полимеров и переменных, содержащихся в формуле (сб-1), приведенной выше, к настоящему изобретению, описанному в настоящей заявке, также применимо соответствующее раскрытие, приведенное в WO 2014/207231 в отношении групп соединения формулы (II).

Катионогенными полимерами третьего предпочтительного класса являются полимеры, содержащие в качестве повторяющихся звеньев множество групп, описываемых приведенной ниже формулой (сб-2), они раскрыты, как группы формулы (III), в WO 2014/207231 (заявитель: Ethris GmbH):



в которой переменные a, b, p, m, n и  $\text{R}^2 - \text{R}^5$  определены так, как описано ниже, независимо для каждой из множества групп формулы (сб-2):

30 a равно 1 и b обозначает целое число, равное от 2 до 4; или a обозначает целое число, равное от 2 до 4, и b равно 1,

p равно 1 или 2,

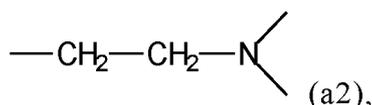
m равно 1 или 2; n равно 0 или 1 и  $m+n \geq 2$ ; и

$R^2 - R^5$  независимо друг от друга, выбраны из числа следующих: водород, группа  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}^7$ ,  $-\text{CH}(\text{R}^7)-\text{CH}_2-\text{OH}$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-\text{R}^7$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-\text{R}^7$  или  $-\text{CH}_2-\text{R}^7$ , где  $\text{R}^7$  выбран из числа следующих:  $\text{C}_3-\text{C}_{18}$ -алкил или  $\text{C}_3-\text{C}_{18}$ -алкенил, содержащий одну двойную связь C-C; защитная группа аминогруппы;  $-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2$ ; и цепь поли(этиленгликоля);

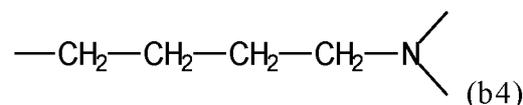
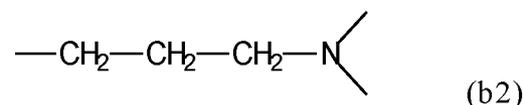
и где один или большее количество атомов азота, указанных в формуле (сб-2), могут являться протонированными, при этом образуется катионогенная группа формулы (сб-2).

В отношении других предпочтительных определений этих полимеров и переменных, содержащихся в формуле (сб-2), приведенной выше, к настоящему изобретению, описанному в настоящей заявке, также применимо соответствующее раскрытие, приведенное в WO 2014/207231 в отношении повторяющихся звеньев формулы (III).

К катионогенным полимерам четвертого предпочтительного класса относится статистический сополимер, раскрытый в WO 2016/097377 (заявитель: Ethris GmbH). Он содержит множество повторяющихся звеньев (a), независимо выбранных из числа повторяющихся звеньев следующих формул (a1) и (a2):



и множество повторяющихся звеньев (b), независимо выбранных из числа повторяющихся звеньев следующих формул (b1) - (b4):



и отношение суммы количеств молей повторяющихся звеньев (a) к сумме количеств молей повторяющихся звеньев (b) находится в диапазоне от 0,7/1,0 до 1,0/0,7, и один или большее количество атомов азота, содержащихся в

повторяющихся звеньях (a) и/или (b), содержащихся в сополимере, могут являться протонированными, при этом образуется катионогенный сополимер.

В отношении других предпочтительных определений этого сополимера к настоящему изобретению, описанному в настоящей заявке, также применимо  
5 соответствующее раскрытие, приведенное в WO 2016/097377. Как отмечено в настоящем изобретении, особенно предпочтительным сополимером является линейный сополимер, который содержит повторяющиеся звенья (a1) и (b1), или который состоит из повторяющихся звеньев (a1) и (b1).

В качестве необязательного компонента наночастиц также может  
10 содержаться полианионный компонент, который отличается от нуклеиновой кислоты. Примерами такого полианиона являются полиглутаминовая кислота и хондроитинсульфат. Если в наночастицах используют такой полианионный компонент, отличающийся от нуклеиновой кислоты, то предпочтительно, если его количество ограничено таким образом, что количество отрицательных  
15 зарядов, обеспечиваемых полианионным компонентом, не превышает количество отрицательных зарядов, обеспечиваемых нуклеиновой кислотой.

Как это разъяснено выше, липидные или липидоподобные наночастицы, которые содержатся в препарате суспензии и в аэрозоле, предлагаемых в настоящем изобретении, содержат (a) нуклеиновую кислоту и (b) ионизируемый  
20 липид или ионизируемый липидоид. Если содержится липидоид, то в настоящем изобретении наночастицы называются липидоподобными наночастицами.

Предпочтительно, если наночастицы содержат следующие, более предпочтительно состоят из следующих,  
нуклеиновая кислота (a),  
25 ионизируемый липид или ионизируемый липидоид (b),  
и необязательно один или большее количество следующих:  
неионизируемый липид, обладающий структурой стерина (c1);  
глицерофосфолипид (c2);  
конъюгированный с ПЭГ липид (c3);  
30 конъюгированный с полисаркозином липид (c4);  
ПАСилированный липид (c5); и  
катионогенный полимер (c6).

Типичные препараты суспензий, содержащие наночастицы, полученные из компонентов, перечисленных выше, которые также являются подходящими для применения в контексте настоящего изобретения, включают описанные в публикации S. Patel et al., Naturally-occurring cholesterol analogues in lipid nanoparticles induce polymorphic shape and enhance intracellular delivery of mRNA, Nature Communications, 2020, 11:983.

Следует понимать, что компоненты наночастиц и, в частности, компоненты (a) и (b), и необязательно один или большее количество компонентов (c1) - (c6) обычно содержатся в наночастицах в виде смеси.

В отношении количеств компонентов, более предпочтительно, если наночастицы содержат следующие, более предпочтительно состоят из следующих:

нуклеиновая кислота, и

от 30 до 65 мол.% ионизируемого липида или ионизируемого липидоида (b),

и один или большее количество следующих компонентов:

от 10 до 50 мол.% липида, обладающего структурой стерина (c1),

от 4 до 50 мол.% глицерофосфолипида (c2),

от 0,5 до 10 мол.% одного из следующих: конъюгированный с ПЭГ липид (c3), конъюгированный с полисаркозином липид (c4) и ПАСилированный липид (c5),

или любой их комбинации,

от 0,5 до 10 мол.% катионогенного полимера (c6),

при этом сумма содержаний (b) и (c1) - (c6) составляет 100 мол.%. Следует понимать, что выраженные в мол.% содержания компонентов (c1) - (c6) указаны при условии, что не все эти компоненты обязательно содержатся в наночастицах.

Так, например, в контексте этого предпочтительного варианта осуществления катионогенный полимер может содержаться или не содержаться, однако, если он содержится, то его используют в количестве, равном от 0,5 до 10 мол.%. Как дополнительно указано выше, в контексте этого предпочтительного варианта осуществления содержание компонента (компонентов) (c1), (c2), (c3), (c4), (c5) и/или (c6) является таким, что сумма содержаний (b) и (c1) - (c6) составляет 100 мол.%.

Еще более предпочтительно, если наночастицы содержат следующие или состоят из следующих:

нуклеиновая кислота (а),

ионизируемый липид или ионизируемый липидоид (b),

5 неионизируемый липид, обладающий структурой стерина (с1),

глицерофосфолипид (с2), и

конъюгированный с ПЭГ липид (с3).

В отношении количеств компонентов, еще более предпочтительно, если наночастицы содержат следующие, более предпочтительно состоят из

10 следующих:

нуклеиновая кислота (а),

от 30 до 65 мол.% ионизируемого липида или ионизируемого липидоида (b),

от 10 до 50 мол.% липида, обладающего структурой стерина (с1),

от 4 до 50 мол.% глицерофосфолипид (с2), и

15 от 0,5 до 10 мол.% конъюгированного с ПЭГ липида (с3),

при этом сумма содержаний (b) и (с1) - (с3) составляет 100 мол.%.

В соответствии с приведенным выше описанием, относящимся к предпочтительным нуклеиновым кислотам, и относящимся к предпочтительным компонентам содержащей липид композиции, отличающимся от нуклеиновой

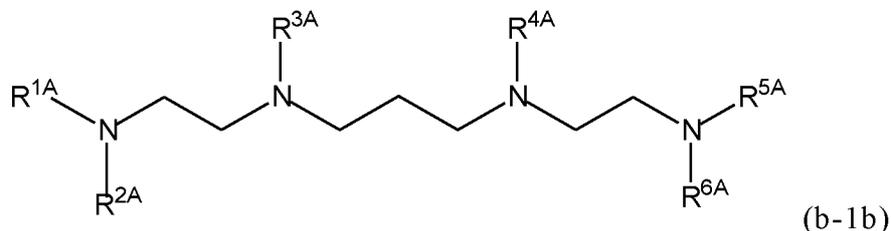
20 кислоты, липидные наночастицы, содержащиеся в препарате суспензии,

предлагаемом в настоящем изобретении, и в аэрозоле, предлагаемом в

настоящем изобретении, соответственно, предпочтительно содержат

(а) мРНК в качестве нуклеиновой кислоты;

(b) ионизируемый липидоид формулы (b-1b):



25 в которой  $R^{1A} - R^{6A}$  независимо выбраны из числа следующих: водород и  $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$ , где  $R^{7A}$  выбран из числа следующих:  $C_8-C_{18}$ -алкил и  $C_8-C_{18}$ -алкенил, содержащий одну двойную связь C-C, при условии, что по меньшей мере два из остатков  $R^{1A} - R^{6A}$  представляют собой  $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$ , более

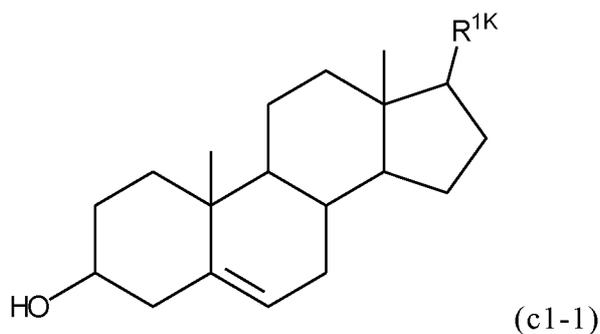
30 предпочтительно по меньшей мере четыре из остатков  $R^{1A} - R^{6A}$  представляют

собой  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}^{7\text{A}}$ , где  $\text{R}^{7\text{A}}$  выбран из числа следующих:  $\text{C}_8-\text{C}_{18}$ -алкил и  $\text{C}_8-\text{C}_{18}$ -алкенил, содержащий одну двойную связь  $\text{C}-\text{C}$ ;

или его протонированную форму, где один или большее количество атомов азота, указанных в формуле (b-1b), являются протонированными, при этом

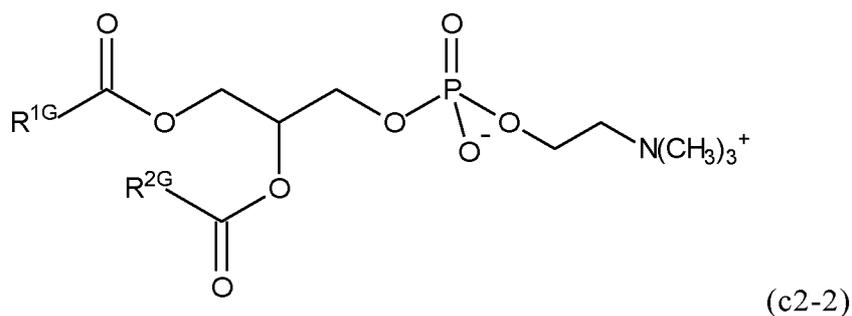
5 образуется катионогенный липидоид;

(c1) неионизируемый липид, обладающий структурой стерина формулы (c1-1):



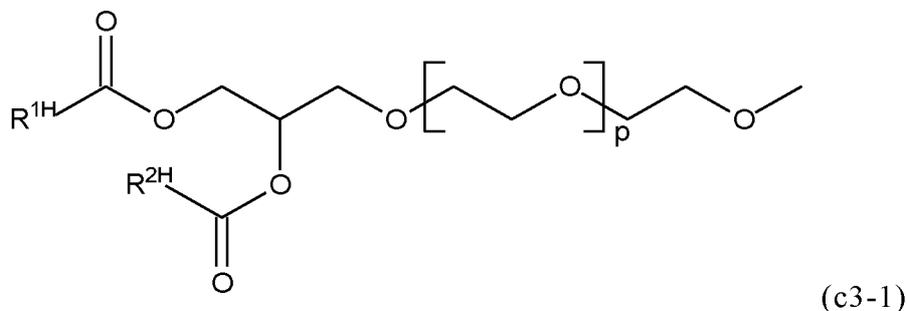
в которой  $\text{R}^{1\text{K}}$  обозначает  $\text{C}_3-\text{C}_{12}$ -алкильную группу;

(c2) фосфоглицерид формулы (c2-2):



10 в которой  $\text{R}^{1\text{G}}$  и  $\text{R}^{2\text{G}}$  независимо друг от друга выбраны из числа следующих:  $\text{C}_8-\text{C}_{18}$ -алкильная группа и  $\text{C}_8-\text{C}_{18}$ -алкенильная группа, предпочтительно из числа следующих:  $\text{C}_{12}-\text{C}_{18}$ -алкильная группа и  $\text{C}_{12}-\text{C}_{18}$ -алкенильная группа, или его фармацевтически приемлемую соль; и

15 (c3) конъюгированный с ПЭГ липид формулы (c3-1)



в которой  $\text{R}^{1\text{H}}$  и  $\text{R}^{2\text{H}}$  независимо друг от друга выбраны из числа следующих:  $\text{C}_8-\text{C}_{18}$ -алкильная группа и  $\text{C}_8-\text{C}_{18}$ -алкенильная группа, предпочтительно из числа

следующих: C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>-алкильная группа и C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>-алкенильная группа, и *p* обозначает целое число, равное от 5 до 200, предпочтительно от 10 до 100 и более предпочтительно от 20 до 60.

5 В случае наночастиц, содержащихся в препарате суспензии и в аэрозоле, предлагаемых в настоящем изобретении, состав наночастиц является таким, что в наночастицах отношение суммы масс компонентов, отличающихся от нуклеиновой кислоты, к массе нуклеиновой кислоты предпочтительно находится в диапазоне от 30:1 до 1:1, более предпочтительно от 20:1 до 2:1 и наиболее предпочтительно от 15:1 до 3:1.

10 В наночастицах отношение N/P, т. е. отношение количества аминных атомов азота, содержащихся в ионизируемом липиде или ионизируемом липидоиде, к количеству фосфатных групп, содержащихся в нуклеиновой кислоте, предпочтительно находится в диапазоне от 0,5 до 20, более предпочтительно в диапазоне от 0,5 до 10.

15 Липидные или липидоподобные наночастицы, содержащиеся в препарате суспензии и в аэрозоле, предлагаемых в настоящем изобретении, предпочтительно обладают Z-средним диаметром, находящимся в диапазоне от 10 до 500 нм, более предпочтительно в диапазоне от 10 до 250 нм, еще более предпочтительно от 20 до 200 нм. Указанный диаметр частиц представляет собой гидродинамический диаметр частиц, определенный с помощью динамического светорассеяния (ДСР). Измерения обычно проводят при 25°C.

20 Индекс полидисперсности наночастиц, содержащихся в препарате суспензии и в аэрозоле, предлагаемых в настоящем изобретении, предпочтительно находится в диапазоне от 0,05 до 0,4, более предпочтительно в диапазоне от 0,05 до 0,2. Индекс полидисперсности можно определить с помощью динамического светорассеяния (ДСР). Измерения обычно проводят при 25°C

30 Можно получить препарат суспензии или аэрозоль, содержащий различные липидные или липидоподобные наночастицы, определенные выше, т. е. частицы, которые состоят из различных компонентов. Однако предпочтительно, если наночастицы, содержащиеся в препарате суспензии предлагаемом в настоящем изобретении, или в аэрозоле, предлагаемом в настоящем изобретении, состоят из одинаковых компонентов.

Липидные наночастицы обычно можно получить путем смешивания раствора, содержащего нуклеиновую кислоту, например, в водном растворителе, содержащем буфер, такой как цитратный буфер, обладающий значением pH, равным 4,5, и необязательно содержащем соль, такую как хлорид натрия, и  
5 раствора, содержащего ионизируемый липид или ионизируемый липидоид, например, в этаноле. Другие необязательные компоненты можно включить, например, путем их добавления к одному или двум растворам. Полученные таким образом липидные наночастицы можно дополнительно обработать с помощью хроматографии и/или диализа, и/или тангенциального поточного  
10 фильтрования для получения липидных наночастицы в необходимой жидкой композиции. До или во время проведения этих последующих стадий обработки для получения необходимой фармацевтической композиции можно добавить другие инертные наполнители, такие как криозащитные средства и другие инертные наполнители. Если наночастицы подвергают тангенциальному  
15 поточному фильтрованию, то из соображений сохранения стабильности предпочтительно проводить фильтрование суспензии наночастиц, содержащей триблок-сополимер, который включает один поли(пропиленоксидный) блок и два поли(этиленоксидных) блока, который определен в настоящем изобретении в качестве компонента раствора разбавителя.

20 Поэтому настоящее изобретение также относится к способу получения препарата водной суспензии, предназначенного для получения аэрозоля, содержащего липидные или липидоподобные наночастицы которые суспендированы в водном растворе разбавителя, указанный способ включает стадию смешивания раствора, содержащего нуклеиновую кислоту (а), и  
25 раствора, содержащего ионизируемый липид или ионизируемый липидоид (b), с получением суспензии, содержащей липидные или липидоподобные наночастицы. Другие компоненты, такие как один или большее количество компонентов (с1) - (с6) обычно можно включить в наночастицы например, путем их добавления к раствору, содержащему ионизируемый липид или  
30 ионизируемый липидоид.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу препарата водной суспензии, предназначенного для получения аэрозоля, содержащего липидные или липидоподобные наночастицы

которые суспендированы в водном растворе разбавителя, указанный способ включает

стадию смешивания раствора, содержащего нуклеиновую кислоту (а), и раствора, содержащего ионизируемый липид или ионизируемый липидоид (b), с  
5 получением суспензии, содержащей липидные или липидоподобные наночастицы;

стадию добавления к суспензии триблок-сополимера, который включает один поли(пропиленоксидный) блок и два поли(этиленоксидных) блока, определенного в настоящем изобретении; и

10 стадию тангенциального поточного фильтрования суспензии с получением препарата водной суспензии, предлагаемого в настоящем изобретении.

Препарат водной суспензии, предназначенный для получения аэрозоля, содержит липидные или липидоподобные наночастицы, описанные выше, и водный раствор разбавителя. Как это указано в отношении препарата суспензии,  
15 наночастицы суспендированы в растворе разбавителя.

Раствор разбавителя представляет собой водный раствор, т. е. раствор, в котором растворителем, содержащимся в наибольшем количестве в пересчете на полный объем растворителя (растворителей), является вода, предпочтительно  
20 раствор, содержащий более 70% воды, более предпочтительно более 90% воды, использующейся в качестве растворителя, количества указаны в объемных процентах воды в пересчете на полный объем растворителя (растворителей), содержащегося в растворе разбавителя (при температуре, равной 25°C).

Наиболее предпочтительно, если вода является единственным растворителем, содержащимся в растворе разбавителя. Таким образом, раствор разбавителя  
25 является жидким при комнатной температуре (например, при 25°C).

В композиции отношение массы наночастиц к объему раствора разбавителя предпочтительно находится в диапазоне 0,5 до 100 г/л, более предпочтительно  
10 до 100 г/л, более предпочтительно 10 до 50 г/л и наиболее предпочтительно 10 до 75 г/л.

30 В препарате суспензии концентрация нуклеиновой кислоты, содержащейся в липидных или липидоподобных наночастицах, предпочтительно находится в диапазоне от 0,01 до 10 мг/мл, более предпочтительно от 0,02 до 5 мг/мл и

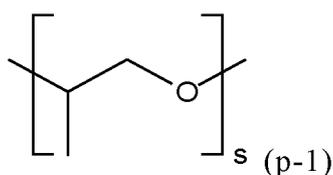
наиболее предпочтительно от 0,1 до 5 мг/мл в пересчете на полный объем препарата суспензии.

5 Как отмечено выше, липидные или липидоподобные наночастицы, содержащиеся в препарате суспензии и в аэрозоле, предлагаемых в настоящем изобретении, предпочтительно обладают Z-средним диаметром, находящимся в диапазоне от 10 до 500 нм, более предпочтительно в диапазоне от 10 до 250 нм еще более предпочтительно от 20 до 200 нм. Указанный диаметр частиц представляет собой гидродинамический диаметр частиц, определенный с помощью динамического светорассеяния (ДСР). Измерения обычно проводит  
10 при 25°C.

Индекс полидисперсности наночастиц, содержащихся в препарате суспензии и в аэрозоле, предлагаемых в настоящем изобретении, предпочтительно находится в диапазоне от 0,05 до 0,4, более предпочтительно в диапазоне от 0,05 до 0,2. Индекс полидисперсности можно определить с  
15 помощью динамического светорассеяния (ДСР). Измерения обычно проводят при 25°C

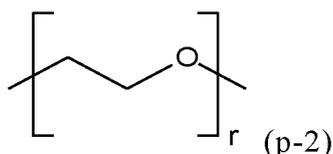
Раствор разбавителя содержит триблок-сополимер, который включает один поли(пропиленоксидный) блок и два поли(этиленоксидных) блока.

20 Предпочтительно, если триблок-сополимером является триблок-сополимер А-В-А, который содержит один поли(пропиленоксидный) блок В формулы (p-1):



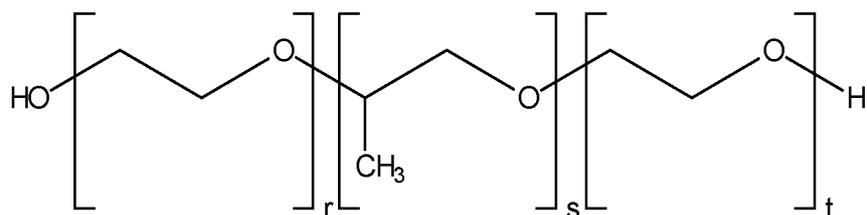
в которой s обозначает целое число, равное от 15 до 67, предпочтительно от 20 до 40, и

25 два поли(этиленоксидных) блока А формулы (p-2):



в которой r для каждого блока независимо обозначает целое число, равное от 2 до 130, предпочтительно от 50 до 100 и более предпочтительно от 60 до 90.

Более предпочтительно, если триблок-сополимер обладает следующей структурой:



- 5 где r и t независимо друг от друга обозначают целые числа, равные от 2 до 130, предпочтительно от 50 до 100 и более предпочтительно от 60 до 90, и s обозначает целое число, равное от 15 до 67, предпочтительно от 20 до 40.

Наиболее предпочтительно, если в качестве триблок-сополимера используют полуксамер P188.

- 10 Раствор разбавителя обычно содержит растворенный в нем триблок-сополимер. Однако, для специалиста в данной области техники должно быть очевидно, что не исключена возможность того, что некоторое количество молекул сополимера адсорбировано липидными или липидоподобными наночастицами, которые содержатся в композиции.

- 15 Предпочтительно, если композиция, предназначенная для получения аэрозоля, содержит триблок-сополимер при концентрации, равной от 0,05 до 5%, предпочтительно от 0,1 до 2% (мас./об.) (т. е. количество граммов в пересчете на 100 мл), в пересчете на полный объем композиции.

- 20 В дополнение к триблок-сополимеру в растворе разбавителя могут содержаться другие инертные наполнители. Предпочтительно, если раствор разбавителя дополнительно содержит по меньшей мере один из следующих: сахара или NaCl, более предпочтительно, если он содержит сахарозу и NaCl.

- 25 Препарат суспензии, предлагаемый в настоящем изобретении, обычно можно получить, например, способом, включающим добавление триблок-сополимера к суспензии, содержащей раствор разбавителя и липидные или липидоподобные наночастицы, или включающим добавление липидных или липидоподобных наночастиц к раствору разбавителя, содержащему триблок-сополимер.

- 30 Препарат водной суспензии, предназначенный для получения аэрозоля, предлагаемый в настоящем изобретении, можно распылить и получить аэрозоль,

предлагаемый в настоящем изобретении. Предпочтительно, если при этом можно свести к минимуму или даже предотвратить неблагоприятное воздействие стадии распыления на наночастицы и нуклеиновую кислоту, содержащуюся в препарате водной суспензии. Кроме того, распыление можно провести

5 эффективным образом в течение разумного промежутка времени, например, составляющего 60 мин или менее, предпочтительно 30 мин или менее для заданной дозы мРНК.

Таким образом, аэрозоль, который является получаемым путем распыления препарата водной суспензии, предназначенный для получения аэрозоля,

10 предлагаемой в настоящем изобретении, включает капельки аэрозоля, диспергированные в газовой фазе. Капельки аэрозоля содержат липидные или липидоподобные наночастицы, описанные выше, включая их любые варианты осуществления, и водный раствор разбавителя для наночастиц. Водный раствор разбавителя содержит триблок-сополимер, который включает один

15 поли(пропиленоксидный) блок и два поли(этиленоксидных) блока, он представляет собой раствор разбавителя, содержащийся в препарате водной суспензии, предлагаемой в настоящем изобретении, и описан выше.

Как это разъяснено выше, согласно изобретению было обнаружено, что наличие триблок-сополимера обеспечивает сохранение благоприятных

20 характеристик наночастиц, которыми обладают наночастицы, содержащиеся в препарате водной суспензии, описанном выше, до проведения распыления.

Таким образом, липидные или липидоподобные наночастицы, содержащиеся в капельках аэрозоля, предлагаемого в настоящем изобретении, предпочтительно обладают Z-средним диаметром, находящимся в диапазоне от

25 10 до 500 нм, более предпочтительно в диапазоне от 10 до 250 нм, еще более предпочтительно от 20 до 200 нм. Указанный диаметр частиц представляет собой гидродинамический диаметр частиц, определенный с помощью динамического светорассеяния (ДСР). Измерения обычно проводят при 25°C.

Индекс полидисперсности липидных или липидоподобных наночастиц, содержащихся в капельках аэрозоля, предлагаемого в настоящем изобретении,

30 предпочтительно находится в диапазоне от 0,05 до 0,4, более предпочтительно в диапазоне от 0,05 до 0,2. Индекс полидисперсности можно определить с

помощью динамического светорассеяния (ДСР). Измерения обычно проводят при 25°C.

5 Раствор разбавителя, содержащийся в капельках аэрозоля, который полечен из препарата суспензии, представляет собой водный раствор, т. е. раствор, в котором растворителем, содержащимся в наибольшем количестве в пересчете на 10 полный объем растворителя (растворителей), является вода. Предпочтительно, если раствор разбавителя содержит более 70% воды, более предпочтительно более 90% воды, используемой в качестве растворителя, количества указаны в объемных процентах воды в пересчете на полный объем растворителя (растворителей), содержащегося в растворе разбавителя (при температуре, 10 равной 25°C). Наиболее предпочтительно, если вода является единственным растворителем, содержащимся в растворе разбавителя.

15 Как отмечено выше, аэрозоль, предлагаемый в настоящем изобретении, включает капельки, диспергированные в газовой фазе, обычно диспергированные в воздухе. Капельки являются получаемыми путем 20 распыления композиции, предназначенной для получения аэрозоля, предлагаемой в настоящем изобретении. Они включают жидкую фазу, которая образована из раствора разбавителя, содержащегося в композиции, подробно описанного выше, и липидные или липидоподобные наночастицы. Обычно 25 липидные или липидоподобные наночастицы диспергированы в растворе разбавителя. Кроме того, капельки аэрозоля обычно включают множество липидных или липидоподобных наночастиц, диспергированных в одной капелке.

25 Как это дополнительно разъяснено выше, аэрозоль, предлагаемый в настоящем изобретении, можно вводить субъекту, в частности, в или через дыхательные пути субъекта, предпочтительно посредством введения в легкие или назального введения. Обычно введение осуществляется путем вдыхания аэрозоля субъектом.

30 Капельки аэрозоля можно охарактеризовать с помощью их аэродинамического диаметра, при определении которого учитываются их плотность и форма. Аэродинамический диаметр определен, как диаметр сферической частицы или капельки, обладающей плотностью, равной 1 г/см<sup>3</sup>, которая обладает такой же скоростью снижения в воздухе, как рассматриваемая

капелька (Luftbeschaffenheit - Festlegung von Partikelgrößenverteilungen für die gesundheitsbezogene Schwebstaubprobenahme, (1995); Vincent JH. Aerosol Sampling - Science, Standards, Instrumentation and Applications. Chichester, England: John Wiley & Sons, Ltd.; 2007). Распределение аэродинамических диаметров по размеру часто выражают с помощью среднемассового аэродинамического диаметра (СМАД), т. е. среднего связанного с массой аэродинамического диаметра. Таким образом, СМАД представляет собой диаметр, при котором масса частиц, обладающих диаметром, который меньше или больше этого значения, составляет 50% от полной массы, и, таким образом, он является мерой среднего размера частиц. СМАД можно определить с помощью каскадного импактора или импактора следующего поколения (Preparations for inhalation: Aerodynamic assessment of fine particles; European Pharmacopoeia 90; Volume I: EDQM Council of Europe; 2019). Среднемассовый аэродинамический диаметр (СМАД) капелек аэрозоля оказывает влияние на то, в какой области дыхательных путей оседают частицы аэрозоля. Тогда как частицы, обладающие СМАД, равным 10 мкм или более, уже оседают (прикрепляются) в горле вследствие их силы инерции, частицы, обладающие СМАД, равным от 0,1 до 1,0 мкм, являются слишком легкими и могут быть повторно выдохнуты вследствие диффузии, вызванной броуновским движением.

Капельки аэрозоля, предлагаемого в настоящем изобретении, предпочтительно обладают СМАД, определенным с помощью каскадного импактора или импактора следующего поколения, равным от 2 до 10 мкм, более предпочтительно от 3 до 8 мкм.

Распыляющие устройства (распылители), предназначенные для получения аэрозоля из препарата суспензии, включающего частицы, содержащиеся в растворе разбавителя, известны в данной области техники и они имеются в продаже. Распылитель представляет собой устройство, которое превращает жидкость в дисперсию мелких капелек, диспергированных в газовой фазе, т. е. в аэрозоль, который является подходящим для вдыхания. Примерами подходящих распылителей, предназначенных для получения аэрозоля, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, в частности, являются: струйный распылитель, например, Pari Boy (Pari);

меш-небулайзер с вибрирующей сеткой, например, Pari eFlow (Pari), Aeroneb (Aerogen), Fox (Vectura) или Innospire GO (Philips);

меш-небулайзер с неподвижной сеткой, например, MicroAir U22 (Omron) илиSmarty (Flaem);

5 ультразвуковой распылитель, например, My-520A (Fish) или Aerosonic Combineb (Flores)

мягко распыляющий ингалятор, например, Trachospray (MedSpray), Pulmospray (Medspray) или Respimat (Boehriner Ingelheim).

10 В контексте настоящего изобретения препарат суспензии, предназначенный для получения аэрозоля, предпочтительно распыляют с использованием меш-небулайзера с вибрирующей сеткой или мягко распыляющего ингалятора, более предпочтительно с использованием мягко распыляющего ингалятора.

15 Еще одним объектом настоящего изобретения является способ получения аэрозоля, предлагаемого в настоящем изобретении, описанного выше, указанный способ включает стадию распыления препарата водной суспензии, предназначенного для получения аэрозоля, предлагаемого в настоящем изобретении.

20 Согласно изобретению было обнаружено, что препарат суспензии, предлагаемый в настоящем изобретении, можно эффективно и непрерывно распылять в течение длительных периодов времени без ухудшения качества наночастиц, содержащихся в препарате суспензии и в капельках аэрозоля (например, вследствие агрегации частиц). Таким образом, эффективные дозы использующейся в качестве активного средства нуклеиновой кислоты, содержащейся в наночастицах, можно обеспечивать и вводить в форме аэрозоля

25 в течение разумного промежутка времени, такого как составляющий 60 мин или менее, предпочтительно 30 мин или менее.

30 Нуклеиновая кислота, такая как РНК, предпочтительно мРНК, которая содержится в липидных или липидоподобных наночастицах, применяющихся в контексте настоящего изобретения, является особенно подходящей для применения в медицинских целях и для лечения заболеваний и нарушений, в частности, для терапии на основе нуклеиновой кислоты. Таким образом, препарат суспензии, предназначенный для получения аэрозоля, и аэрозоль,

предлагаемые в настоящем изобретении, обычно получают или применяют в виде лекарственного средства или в виде фармацевтической композиции.

В частности, препарат суспензии, предназначенный для получения аэрозоля, и аэрозоль, предлагаемые в настоящем изобретении, являются  
5 подходящими для введения субъекту. Таким образом, нуклеиновую кислоту, такую как РНК, предпочтительно мРНК, содержащуюся в наночастицах, включенных в препарат суспензии и аэрозоль, также можно ввести субъекту. Предпочтительным путем введения композиции является введение аэрозоля, полученного путем распыления препарата суспензии, предлагаемого в  
10 настоящем изобретении, в или через дыхательные пути, в частности, посредством введения в легкие или назального введения. Субъект, которому вводят аэрозоль, обычно вдыхает его.

Нуклеиновую кислоту, содержащуюся в липидных или липидоподобных наночастицах, можно доставить к целевым клеткам путем введения субъекту в  
15 или через дыхательные пути. Термин "доставка к целевым клеткам" предпочтительно означает перенос нуклеиновой кислоты в клетку.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к препарату водной суспензии, предназначенному для применения в качестве лекарственного средства, где препарат суспензии следует распылять и аэрозоль, полученный  
20 путем распыления, следует вводить субъекту. Аналогичным образом, настоящее изобретение относится к аэрозолю, предлагаемому в настоящем изобретении, предназначенному для применения в качестве лекарственного средства.

Препарат водной суспензии или аэрозоль можно вводить субъекту при подходящей дозе. Режим введения доз определяется лечащим врачом и на  
25 основании клинических факторов. Как хорошо известно в медицине, дозы для любого пациента зависят от множества факторов, включая массу пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное вводимое соединение, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие лекарственные средства, вводимые одновременно. Типичная доза терапевтически активных  
30 веществ может, например, находиться в диапазоне от 1 нг до нескольких граммов. Доза нуклеиновой кислоты, предназначенная для экспрессирования или ингибирования экспрессирования, должна соответствовать этому диапазону, однако предусмотрены дозы, которые меньше или больше значений,

находящихся в границах этого типичного диапазона, в особенности, учитывая указанные выше факторы. Обычно режим регулярного введения фармацевтической композиции находится в диапазоне от 0,01 мкг до 10 мг средства/кг массы тела/сутки. За эффектом можно следить путем

5 периодического обследования. Дозы являются разными, однако предпочтительная доза для введения нуклеиновых кислот являющихся компонентами композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, составляют примерно от  $10^{10}$  до  $10^{19}$  копий молекулы нуклеиновой кислоты.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения, включающему

10 распыление препарата водной суспензии, предлагаемого в настоящем изобретении, и введение аэрозоля, полученного путем распыления, в или через дыхательные пути субъекта, предпочтительно посредством введения в легкие или назального введения. Таким образом, нуклеиновая кислота, содержащаяся в указанном препарате суспензии, может оказывать предупредительное или

15 терапевтическое воздействие. Следует отметить, что термин "субъект" включает животных и людей. Аналогичным образом, настоящее изобретение относится к способу лечения, который включает введение аэрозоля, предлагаемого в настоящем изобретении, в или через дыхательные пути субъекта, предпочтительно посредством введения в легкие или назального введения. Как

20 отмечено выше, субъект, которому вводят аэрозоль, обычно вдыхает его.

Путем введения препарата водной суспензии или аэрозоля, предлагаемого в настоящем изобретении, можно лечить и предупреждать заболевания или нарушения. Термин "заболевание" означает любое возможное патологическое состояние, которое можно лечить, предупреждать, или против которого можно

25 проводить вакцинацию путем препарата водной суспензии или аэрозоля, предлагаемого в настоящем изобретении. Предпочтительно, если подвергающимся лечению или предупреждению заболеванием является заболевание легких. Указанные заболевания могут являться, например, наследственными, приобретенными, инфекционными или неинфекционными,

30 возрастными, сердечно-сосудистыми, метаболическими, желудочно-кишечными, опухолевыми (в частности, рак) или генетическими. В основе заболевания могут лежать, например, нарушения физиологических процессов, молекулярных процессов, биохимических реакций, протекающих внутри организма, в основе

которых. в свою очередь, могут лежать, например, генетическая конструкция организма, поведенческие, социальные или экологические факторы, такие как воздействие химических веществ или излучения.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к препарату  
5 водной суспензии, предлагаемому в настоящем изобретении, предназначенному для применения для лечения или предупреждения заболевания или нарушения с помощью терапии на основе нуклеиновой кислоты, где лечение или предупреждение включает распыление препарата водной суспензии и введение аэрозоля, полученного путем распыления, в или через дыхательные пути,  
10 предпочтительно посредством введения в легкие или назального введения. Аналогичным образом, настоящее изобретение относится к аэрозолю, предлагаемому в настоящем изобретении, предназначенному для применения для лечения или предупреждения заболевания или нарушения с помощью терапии на основе нуклеиновой кислоты, где лечение или предупреждение  
15 включает введение аэрозоля в или через дыхательные пути, предпочтительно посредством введения в легкие или назального введения. Как отмечено выше, субъект, которому вводят аэрозоль, обычно вдыхает его.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение также относится к препарату водной суспензии, предлагаемому в настоящем  
20 изобретении, предназначенному для применения для лечения или предупреждения заболевания легких, где лечение или предупреждение включает распыление препарата водной суспензии и введение аэрозоля, полученного путем распыления, в или через дыхательные пути, предпочтительно посредством введения в легкие или назального введения. Аналогичным образом, настоящее  
25 изобретение относится к аэрозолю, раскрытому выше, включая его предпочтительные варианты осуществления, предназначенному для применения для лечения или предупреждения заболевания легких, где лечение или предупреждение включает введение аэрозоля в или через дыхательные пути, предпочтительно посредством введения в легкие или назального введения. Как  
30 отмечено выше, субъект, которому вводят аэрозоль, обычно вдыхает его.

Термины "лечение" или "лечить" при использовании в настоящем изобретении обычно означают обеспечение необходимого фармакологического и/или физиологического эффекта в организме человека или животного.

Соответственно, термин "лечение" при использовании в настоящем изобретении может относиться к лечению (острых) форм определенных заболеваний, а также может относиться к профилактическому лечению, означающему полное или частичное предупреждение заболевания или проявления его симптомов.

5 Предпочтительно, если термин "лечение" означает терапевтическое лечение, означающее частичное или полное излечение заболевания и/или побочных эффектов, и/или симптомов, связанных с заболеванием. В этом отношении термин "острая форма" означает, что у субъекта наблюдаются симптомы  
10 заболевания. Другими словами, подвергающийся лечению субъект в настоящее время нуждается в лечении и термин "неотложное лечение" в контексте настоящего изобретения означает меры, предпринимаемые для фактического  
лечения заболевания после проявления заболевания или приступа заболевания. Лечение также может являться профилактическое или предупредительное  
лечение, т. е. меры, предпринимаемые для предупреждения заболевания,  
15 например, для предотвращения инфекции и/или проявления заболевания. За терапевтическим эффектом можно следить путем периодического обследования.

Обычно нуклеиновая кислота содержится в препарате суспензии и в аэрозоле, предлагаемом в настоящем изобретении, в эффективном количестве. Термин "эффективное количество" означает количество, достаточное для  
20 обеспечения заметного терапевтического эффекта у субъекта, которому вводят фармацевтическую композицию. В соответствии с приведенным выше, на содержание нуклеиновой кислоты не накладываются ограничения, при условии, что она применима для лечения, описанного выше. Как отмечено выше, композиция, предназначенная для получения аэрозоля или аэрозоль, который  
25 включает частицы, содержащие нуклеиновую кислоту, предпочтительно включает частицы в количестве, обеспечивающем концентрацию нуклеиновой кислоты, содержащейся в частицах, равную от 0,01 до 50 мг/мл, более предпочтительно от 0,02 до 30 мг/мл и наиболее предпочтительно от 0,05 до 10 мг/мл в пересчете на полный объем композиции.

30 Типичные субъекты включают млекопитающего, такого как собака, кошка, свинья, овца, лошадь, грызун, например, крыса, мыши и морская свинка, или примата, например, гориллу, шимпанзе и человека. В наиболее предпочтительным варианте осуществления субъектом является человек.

Как отмечено выше, препарат суспензии и аэрозоль, предлагаемые в настоящем изобретении, могут быть предназначены для применения для лечения или предупреждения с помощью терапии на основе нуклеиновой кислоты. Так, например, терапия на основе нуклеиновой кислоты предназначена для лечения или предупреждения заболевания или нарушения, указанного в приведенной выше таблице А.

Препарат суспензии и аэрозоль, предлагаемые в настоящем изобретении, являются особенно подходящими для применения для лечения или предупреждения заболевания легких. В качестве типичных заболеваний можно отметить астму, нарушение метаболизма сурфактанта, дефицит белка В сурфактанта (SPB), дефицит представителя 3 подсемейства А (ABCA3) АТФ-связывающего кассетного транспортера муковисцидоз, дефицит альфа-1-антитрипсина (А1АТ); рак легких, дефицит белка С сурфактанта (SPC), альвеолярная белковая дистрофия, саркоидоз, острый и хронический бронхит, эмфизему, синдром МакЛеода, хроническое обструктивное заболевание легких (ХОХЛ), бронхиальную астму, бронхоэктаз, пневмокониоз, асбестоз, острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), респираторный дистресс-синдром новорожденных (РДСН), отек легких, легочную эозинофилию, пневмонию Леффлера, синдром Хаммана-Рича, идиопатический фиброз легких, интерстициальные заболевания легких, первичную цилиарную дискинезию, легочную артериальную гипертензию (ЛАГ) и дефицит STAT5b, нарушения свертываемости крови, в особенности гемофилию А и В; нарушения комплементарности, в особенности, дефицит белка С, тромбоцитопеническую тромбогемолитическую пурпуру и врожденный гемохроматоз, в особенности, дефицит гепсидина; легочные инфекционные заболевания, предпочтительно инфекцию респираторно-синцитиальным вирусом (РСВ), инфекцию вирусом парагриппа (ВПГ), инфекцию вирусом гриппа, инфекцию риновирусами, тяжелый острый респираторный синдром, инфекцию коронавирусом (SARS-CoV), туберкулез, инфекцию посредством *Pseudomonas aeruginosa*, инфекцию посредством *Burkholderia cepacia*, инфекцию устойчивым к метициллину *Staphylococcus aureus* (MRSA) и инфекцию посредством *Haemophilus influenzae*.

Однако следует понимать, что препарат водной суспензии, предназначенный для получения аэрозоля, может перемещаться из тканей

органов дыхания в другие ткани или органы организма и может трансфицировать клетки в указанных отдаленных тканях или органах. Аналогичным образом, белок (белки), кодируемый посредством мРНК, содержащейся в препарате суспензии, предназначенном для получения аэрозоля, может перемещаться из тканей органов дыхания в другие ткани или органы организма и может оказывать терапевтическое воздействие на указанные отдаленные ткани или органы.

В других типичных вариантах осуществления композицию и аэрозоль, предлагаемые в настоящем изобретении, могут быть предназначены для применения в терапевтических средствах на основе нуклеиновой кислоты, предназначенных для лечения или предупреждения лизосомных болезней накопления, таких как болезнь Гоше, болезнь Фабри, МПС типа I, МПС типа II (синдром Хантера), МПС типа VI, и болезни накопления гликогена, такие как, например, болезнь накопления гликогена типа I (болезнь фон Гирке), типа II (болезнь Помпе), типа III (болезнь Кори), типа IV (болезнь Андерсена), типа V (болезнь МакАрдля), типа VI (болезнь Герса), типа VII (болезнь Таруи), типа VII, типа IX, типа X, типа XI (синдром Фанкони-Биккеля), типа XI или типа 0. С помощью транскрипционной заместительной терапии/ферментной заместительной терапии не только воздействуют на основной генетический дефект, но и увеличивают концентрацию фермента, недостаток которого наблюдается у субъекта. В качестве примера, в случае болезни Помпе с помощью транскрипционной заместительной терапии/ферментной заместительной терапии проводят замену обладающей недостатком лизосом фермента - кислой альфа-глюкозидазы (GAA).

В соответствии с другими примерами, терапевтические средства на основе нуклеиновой кислоты, предлагаемые настоящим изобретением, могут быть предназначены для применения для лечения рака, сердечно-сосудистого заболевания, вирусной инфекции, нарушения функции иммунной системы, аутоиммунного заболевания, неврологического нарушения, наследственного метаболического нарушения или генетического нарушения, или другого заболевания, при котором белок или фрагмент белка, продуцированный в клетке, может оказывать благоприятное воздействие на пациента. Примеры рака включают рак головы и шеи, рак молочной железы, рак почки, рак мочевого

пузыря, рак легких, рак предстательной железы, рак кости, рак головного мозга, рак шейки матки, рак анального канала, рак толстой кишки, колоректальный рак, аппендикулярный рак, рак глаза, рак желудка, лейкоз, лимфома, рак печени, рак кожи, рак яичников, рак пениса, рак поджелудочной железы, тестикулярный рак, рак щитовидной железы, рак влагалища, рак вульвы, рак эндометрия, рак сердца и саркому. Примеры сердечно-сосудистых заболеваний включают атеросклероз, ишемическую болезнь сердца, легочно-сердечную недостаточность и кардиомиопатию. Примеры нарушений функции иммунной системы и аутоиммунных заболеваний включают, но не ограничиваются только ими, ревматические заболевания, рассеянный склероз и астму. Примеры вирусных инфекций включают, но не ограничиваются только ими, инфекции вирусом иммунодефицита человека, вирусом простого герпеса, вирусом папилломы человека, а также вирусом гепатита В и С. Примеры неврологических нарушений включают, но не ограничиваются только ими, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз и слабоумие. Примеры наследственных метаболических нарушений включают, но не ограничиваются только ими, болезнь Гоше и фенилкетонурию.

В настоящем изобретении цитирован ряд документов, включая заявки на патенты и инструкции изготовителей. Раскрытие этих документов, хотя оно и не считается относящимся к патентоспособности настоящего изобретения, во всей своей полноте включено в настоящее изобретение в качестве ссылки. Точнее, все цитированные документы включены в настоящее изобретение в качестве ссылки в такой степени, как если бы каждый отдельный документ был специально и по отдельности указан, как включенный в качестве ссылки.

25           Примеры

Аббревиатура	Описание
ЛНЧ	липидная наночастица или липидоподобная наночастица
мРНК	матричная (информационная) рибонуклеиновая кислота
N/P	отношение количества аминных атомов азота, содержащихся в носителе, к количеству фосфатных групп, содержащихся в мРНК
P188	полоксамер 188
КТ	комнатная температура
SNIM® РНК	стабилизированная неиммуногенная

Аббревиатура	Описание
	матричная (информационная) рибонуклеиновая кислота
ИПД	индекс полидисперсности
узФБ	усиленный зеленый флуоресцентный белок

1. Эксперимент 1 - Качество наночастиц после распыления при использовании разных инертных наполнителей

1.1. Материалы и методики

5 1.1.1. Получение наночастиц

Липидоподобные наночастицы получали из катионогенного липидоида (dL\_05 (R), схема 1), липида-помощника - ДПФХ (1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин, Avanti Polar Lipids) и холестерина (Avanti Polar Lipids), и конъюгированного с ПЭГ липида - ДМГ-ПЭГ-2000 (1,2-димиристоил-sn-глицерометокси(полиэтиленгликоль)-2000, Avanti Polar липиды) при молярных отношениях, составляющих 8/5,29/4,41/0,88 соответственно. Объединяли обладающие соответствующими объемами исходные растворы липидов в этаноле чистоты для ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография), обладающие концентрациями равными, 50, 20, 20 и 20 мг/мл соответственно.

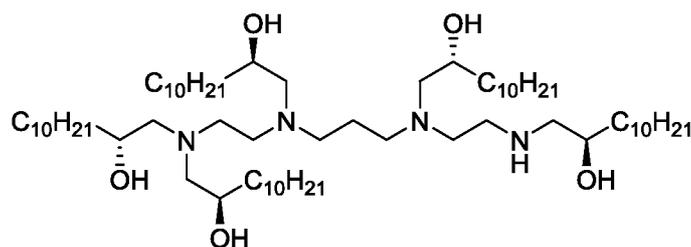
10 Методику получения проводили путем быстрой замены растворителя. Смесь липидов в этаноле объединяли с мРНК в цитратном буфере (10 мМ лимонной кислоты, 150 мМ NaCl, pH = 4,5) при объемном отношении, составляющем 1:4, с использованием системы NanoAssemblr Benchtop (Precision NanoSystems).

15 Полученный препарат обладал концентрацией мРНК, равной 0,2 мг/мл, при значении отношения N/P, равном 8. После инкубирования при КТ в течение 30 мин препарат очищали и концентрировали путем тангенциального поточного фильтрования (система для ТПФ KR2i, Repligen) с использованием модуля для фильтрования с порогом отсечения, равным 50 кДа (мПЭС (модифицированный простой полиэфирсульфон), Repligen), и с использованием 50 мМ раствора NaCl

20 в качестве буфера для разведения и диафильтования. Уменьшение количества микрофлоры и заключительное стерильное фильтрование проводили с использованием шприцевых фильтров с отверстиями размером 0,8 мкм и 0,2 мкм.

25

Схема 1: Химическая структура dL\_05 (R)



### 1.1.2. Смешивание наночастиц с инертными наполнителями

Инертные наполнители, использовавшиеся в этом эксперименте, перечислены в таблице 3. Готовили разведения инертных наполнителей при концентрации, равной 2% (мас./об.) инертного наполнителя в 10% (мас./об.) растворе сахарозы, 50 мМ NaCl. Последующие серийные разведения в буфере сахароза/NaCl обеспечивали концентрации инертного наполнителя, равные 0,2%, 0,02% и 0,002% (мас./об.). Наночастицы смешивали с соответствующим инертным наполнителем при равных объемах непосредственно перед распылением.

Таблица 1: Перечень инертных наполнителей, использовавшихся в скрининговых экспериментах

Материал	Поставщик
Tween 20	Sigma (Merck)
Tween 80	Sigma (Merck)
Полоксамер 188 (Pluronic F-68)	Sigma-Aldrich
Тилоксапол	Sigma (Merck)
Витамин Е-ПЭГ-1000 (D-α-токоферол полиэтиленгликоль-1000-сукцинат)	Sigma (Merck)

### 1.1.3. Распыление

Распыление наночастиц проводили с использованием распылителя eFlow (Pari). Полное распыление проводили при КТ и определяли время, необходимое для полного распыления. Аэрозоль собирали путем обеспечения возможности конденсирования в пробирке для образца при комнатной температуре.

### 1.1.4. Определение размера комплекса и ИПД

Гидродинамический диаметр (Z-средний диаметр) и индекс полидисперсности (ИПД) наночастиц определяли с помощью динамического светорассеяния (ДСР) с использованием Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments), снабженного автоматическим аттенуатором, и указывали в виде распределения

частиц по размерам на основании распределения интенсивности. Образцы исследовали при 25°C в неразбавленном виде.

## 1.2. Результаты

В этой серии экспериментов задачей являлось сопоставление способностей добавок различных классов улучшать качество наночастиц после распыления. Как видно из результатов, полученных для контрольного образца (без инертного наполнителя, на фиг. 1 обозначено: "без инертного наполнителя"), распыление наночастиц приводит к нежелательному увеличению размера (гидродинамического диаметра, Z-среднего диаметра) и индекса полидисперсности (ИПД). Путем добавления некоторых инертных наполнителей обеспечено существенное улучшение общего размера и ИПД. На фиг. 1 представлены результаты для размера и ИПД наночастиц, полученных до и после распыления 1 мл при концентрации мРНК, равной 0,5 мг/мл в 1% растворе инертного наполнителя, 10% (мас./об.) раствор сахарозы, 50 мМ NaCl.

2. Эксперимент 2 - Стабильность наночастиц в присутствии инертных наполнителей

### 2.1. Материалы и методики

#### 2.1.1. Получение наночастиц

См. раздел 1.1.1.

2.1.2. Смешивание наночастиц с инертными наполнителями

Инертные наполнители, использовавшиеся в этом эксперименте, перечислены в таблице 4. Готовили разведения инертных наполнителей при концентрации, равной 20% (мас./об.) инертного наполнителя в 10% (мас./об.) растворе сахарозы, 50 мМ NaCl.

Таблица 2: Перечень инертных наполнителей

Материал	Поставщик
Полоксамер 188 (Pluronic F-68)	Sigma-Aldrich
Tween 80	Sigma (Merck)
Tween 20	Sigma (Merck)
Тилоксапол	Sigma (Merck)
Витамин Е-ПЭГ-1000 (D- $\alpha$ -токоферол полиэтиленгликоль-1000-сукцинат)	Sigma (Merck)

### 2.1.3. Определение эффективности капсулирования

Для определения эффективности капсулирования все образцы разводили водой для инъекций до обеспечения концентрации, равной 4 мг/мл. В случае "обработанных образцов" по 50 мкл каждого образца и воды, используемой в качестве холостого контрольного образца, инкубировали в 96-луночном планшете с 2,67 мг/мл раствора гепарине в 2% (об./об.) растворе Triton-X-100 при 70°C в течение 15 мин и затем охлаждали до КТ. В случае "необработанных образцов" по 50 мкл каждого образца и воды, используемой в качестве холостого контрольного образца, разводили с помощью 50 мкл воды для инъекций. В каждую лунку добавляли по 100 мкл разведенного в 100 раз реагента RiboGreen (набор реагентов для исследования РНК, Quant-iT™ RiboGreen®, ThermoFisher) в 1×буфера ТЕ (10 мМ Tris-HCl (Tris = трис(гидроксиметиламинометан)), 1 мМ ЭДТК (этилендиаминотетрауксусная кислота), рН = 7,5, в обработанной диэтилпиракарбонатом (ДЭПС) воде) и инкубировали при защите от воздействия света при КТ в течение 5 мин. Интенсивность флуоресценции определяли с помощью устройства для считывания планшетов Тесап при длине волны возбуждения/испускания, равной 785/535 нм соответственно. Эффективность капсулирования выражали следующим образом (100% -  $\left(\frac{[\text{интенсивность испускания "необработанного образца"}] - [\text{интенсивность испускания "необработанного холостого образца"}]}{[\text{интенсивность испускания "обработанного образца"}] - [\text{интенсивность испускания "обработанного холостого образца"}]}\right) \times 100\%$ ).

### 2.2. Результаты

Для обеспечения возможности использования инертного наполнителя в качестве стабилизатора при проведении процедуры распыления необходимо, чтобы он не оказывал неблагоприятное воздействие на сами наночастицы. Для проверки проводили исследование стабильности в присутствии инертного наполнителя при различных концентрациях. Для этого суспензии хранили при КТ в течение 6 ч. Определяли эффективность капсулирования, указывающую на целостность частиц. Результаты представлены на фиг. 2, на котором представлена эффективность капсулирования содержащихся в препарате наночастиц при концентрации мРНК, равной 2,5 мг/мл в x% (мас./об.) растворе

инертного наполнителя, 10% (мас./об.) раствор сахарозы, 50 мМ NaCl.

Результаты получены через 6 ч после смешивания.

### 2.3. Обсуждение результатов и выводы

5 В присутствии тилоксапола, Tween-20 и Tween-80 эффективность капсулирования ухудшается с увеличением концентрации инертного наполнителя, это указывает на повреждение наночастиц. В отличие от этого полуксамер является хорошо подходящим для препарата. Частицы остаются неповрежденными в течение 6 ч при всех исследуемых концентрациях полуксамера.

10 3. Эксперимент 3 - Распыление наночастиц при концентрации, равной 2,5 мг/мл, в присутствии полуксамера

#### 3.1. Материалы и методики

##### 3.1.1. Получение наночастиц

См. раздел 1.1.10.

15 3.1.2. Добавление инертного наполнителя

Полуксамер добавляли непосредственно перед распылением (исходная концентрация: 20% (мас./об.) P188 в 10% (мас./об.) растворе сахарозы в 50 мМ NaCl).

##### 3.1.3. Распыление

20 См. раздел 1.1.3.

##### 3.1.4. Определение размера комплекса и ИПД

См. раздел 1.1.4

##### 3.1.5. Определение эффективности капсулирования

См. раздел 2.1.3

25 3.1.6. Исследование целостности мРНК

Целостность мРНК, содержащейся в наночастицах, определяли с помощью капиллярного гель-электрофореза с использованием Fragment Analyzer (Agilent Technologies). Высвобождение мРНК из наночастиц проводили при концентрации мРНК, равной 0,05 мг/мл, в растворе, содержащем 6 мкг/мкл гепарина (Sigma-Aldrich), 0,2% (об./об.) Triton-X-100, 50% (об./об.) формамида. Образцы инкубировали при 70°C в течение 15 мин при скорости встряхивания, равной 300 об/мин (Thermomixer, Eppendorf). Контрольный образец мРНК обрабатывали соответствующим образом. Для проведения анализа образцов

обработанные наночастицы и мРНК разводили в соотношении 1:4 с помощью маркерного разбавителя (Standard Sensitivity RNA Diluent Marker (15 нуклеотидов), Agilent Technologies).

### 3.2. Результаты

5 В эксперименте 1 было показано, что инертные наполнители при концентрации, равной 1% (мас./об.), способны стабилизировать наночастицы во время распыления. В эксперименте 2 показано, что, в отличие от других исследованных инертных наполнителей, полоксамер не оказывает неблагоприятное воздействие на стабильность наночастиц. В этом эксперименте  
10 определяли концентрацию полоксамера, необходимую для обеспечения стабилизации содержащего наночастицы раствора при концентрации мРНК, равной 2,5 мг/мл, при этом исследовали P188 при концентрациях, находящихся в диапазоне от 1 до 5% (мас./об.). Для этой цели готовили по 1 мл образцов, обладающих соответствующими концентрациями, их распыляли с  
15 использованием распылителя eFlow (Pari) и результаты сопоставляли с результатами, полученными для необработанного образца, обладающего такой же концентрацией. На фиг. 3 представлены биофизические характеристики суспензий наночастиц объемом 1 мл, обладающих концентрацией, равной 2,5 мг/мл, и содержащих полоксамер при разных концентрациях, до  
20 (необработанная) и после распыления: (а) размер, (б) эффективность капсулирования, (в) относительная целостность мРНК.

### 3.3. Обсуждение результатов и выводы

Результаты показывают, что полоксамер стабилизирует препарат, обладающий концентрацией нуклеиновой кислоты, равной 2,5 мг/мл, при  
25 использовании инертного наполнителя в широком диапазоне концентраций, составляющем 1-5% (мас./об.). Размер частиц, эффективность капсулирования, а также целостность мРНК, являющиеся тремя наиболее критически важными параметрами, определяющими качество, остаются неизменными при проведении процедуры распыления.

## 30 4. Эксперимент 4 - Распыление 25 мг

### 4.1. Материалы и методики

#### 4.1.1. Получение наночастиц

См. раздел 1.1.1.

#### 4.1.2. Добавление полоксамера

См. раздел 3.1.2.

#### 4.1.3. Распыление

См. раздел 1.1.3.

#### 5 4.1.4. Определение размера комплекса и ИПД

См. раздел 1.1.4.

#### 4.1.5. Определение эффективности капсулирования

См. раздел 2.1.3.

#### 4.1.6. Исследование целостности мРНК

10 См. раздел 3.1.6

#### 4.2. Результаты

В ходе этого эксперимента исследовали распыление более существенного объема содержащего наночастицы раствора, поскольку это представляет собой дополнительное затруднение при распылении лекарственного средства.

15 Распыляли раствор объемом 10 мл (максимальный объем заполнения устройства), содержащий мРНК при концентрации, равной 2,5 мг/мл, и полоксамер при концентрации, равной 5% (мас./об.). Аэрозоль собирали и фракционировали каждые 5 мин. Исследовали биофизические характеристики фракций. Раствор этого объема распыляли при средней скорости распыления,  
20 равной 0,3 мл/мин. В заключение в резервуаре распылителя оставалось примерно 500 мкл препарата. На фиг. 4 представлены биофизические характеристики фракционированного аэрозоля при использовании 10 мл препарата при концентрации мРНК, равной 2,5 мг/мл, в присутствии 5% полоксамера (буфер: 5% (мас./об.) Р188, 10% (мас./об.) раствор сахарозы, 50 мМ  
25 NaCl): (а) размер, (б) ИПД, (в) эффективность капсулирования, (г) относительная целостность мРНК в зависимости от продолжительности распыления.

#### 4.3. Обсуждение результатов и выводы

30 В собранных фракциях размер частиц, а также ИПД оставались стабильными (фиг. 4а и б). Эффективность капсулирования постоянно составляла более 95% (фиг. 4в) и целостность мРНК не изменялась (фиг. 4г). Таким образом, добавление 5% (мас./об.) полоксамера обеспечивало

возможность распыления 10 мл концентрированного препарата (2,5 мг/мл) в течение 30 мин, это являлось невозможным без добавления полоксамера.

5. Эксперимент 5 - Влияние полоксамера на функциональные характеристики препарата аэрозоля *in vitro*

- 5 5.1. Материалы и методики
- 5.1.1. Получение наночастиц  
См. раздел 1.1.1., с использованием уЗФБ, кодируемого посредством мРНК
- 5.1.2. Добавление полоксамера  
См. раздел 3.1.2.
- 10 5.1.3. Распыление  
См. раздел 1.1.3.
- 5.1.4. Определение размера комплекса и ИПД  
См. раздел 1.1.4.
- 5.1.5. Определение эффективности капсулирования  
См. раздел 2.1.3.
- 15 5.1.6. Исследование целостности мРНК  
См. раздел 3.1.6.
- 5.1.7. Клеточная культура и трансфицирование  
Клетки 16НВЕ140- выращивали в сосудах (Corning) с покрытием из
- 20 коллагена типа I (Corning) в среде МПС (минимальная поддерживающая среда) (Thermo Fisher Scientific) GlutaMax™ (Gibco™, Thermo Fisher Scientific) с добавлением термически инактивированной фетальной бычьей сыворотки (ФБС, Thermo Fisher Scientific) и смеси пенициллин/стрептомицин (пенициллин/стрептомицин, Gibco™, Thermo Fisher Scientific) при 37°C и 5%
- 25 CO<sub>2</sub>. Для формирования культур на границе раздела воздух-жидкость (КВЖ) клетки в 250 мкл среды ( $2,4 \times 10^5$  клеток/мл) высевали на верхнюю сторону вставок для 24-луночных планшетов с покрытием из коллагена типа I (Corning). На верхней стороне добавляли 500 мкл среды и клетки инкубировали в течение 72 ч для обеспечения фиксации. За 24 ч до трансфицирования находящуюся на
- 30 нижней стороне среду заменяли и находящуюся на верхней стороне среду удаляли. Трансфицирование проводили после промывки водой для инъекций путем добавления соответствующей дозы ЛНЧ в 25 мкл на верхнюю сторону культур КВЖ и инкубирования при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 6 ч. После

завершения трансфицирования слой клеток промывали с помощью 200 мкл 3ФФ (забуференный фосфатом физиологический раствор) (-/-, Gibco™, Thermo Fisher Scientific) и затем хранили в виде культур КВЖ.

#### 5.1.8. Определение количества уЗФБ в лизатах КВЖ

5 Через 24 ч после трансфицирования клетки лизировали для определения количества внутриклеточного уЗФБ. Вставки с КВЖ промывали с помощью 200 мкл 3ФФ (-/-, Gibco™, Thermo Fisher Scientific) с верхней стороны и с помощью 500 мкл с нижней стороны. 3ФФ отсасывали и заменяли на 100 мкл буфера для лизиса Triton X-100 (0,25 М Tris-HCl (Carl Roth), 1% Triton-X-100 (Sigma-  
10 Aldrich), pH = 7,8) с добавлением ингибитора протеазы (cOmplete™, не содержащая ЭДТК смесь ингибиторов протеазы, Roche). Вставки инкубировали на качающейся платформе при 600 об/мин и при КТ в течение 20 мин. Лизаты собирали путем проводимого несколько раз отбора пипеткой и выпуска из пипетки и хранили при -80°C до проведения исследований. Для определения  
15 концентрации уЗФБ в лизатах клеток использовали набор GFP SimpleStep ELISA® (Abcam ab171581).

#### 5.2. Результаты

Для обеспечения возможности использования инертного наполнителя для стабилизации наночастиц необходимо, чтобы инертный наполнитель не  
20 оказывал неблагоприятное воздействие на эффективность или транспорт мРНК в клетки, приводящий к экспрессированию кодированного белка. Поэтому эффективность трансфицирования наночастиц исследовали в присутствии полоксамера и Tween-80 до и после распыления. В препаратах использовали мРНК, кодирующую уЗФБ, это давало возможность определения количества  
25 продуцированного белка. Результаты представлены на фиг. 5, на котором представлена концентрация уЗФБ в лизатах клеток через 24 ч после трансфицирования КВЖ клеток 16НВЕо- наночастицами с капсулированными мРНК уЗФБ до (без обработки) и после распыления в присутствии 5% (мас./об.) инертного наполнителя (полоксамер или Tween-80). Пунктирная линия:  
30 эталонная концентрация уЗФБ после трансфицирования наночастицами без добавления инертного наполнителя.

### 5.3. Обсуждение результатов и выводы

Добавление Tween-80, использующегося в качестве инертного наполнителя для обеспечения распыления, приводит к существенному уменьшению эффективности трансфицирования. Этот результат не зависит от методики распыления и, таким образом, может быть объяснен присутствием самого инертного наполнителя. В отличие от этого, добавление полоксамера не влияет на эффективность трансфицирования. Концентрации белка до и после распыления сравнимы с его концентрацией после трансфицирования такими же наночастицами при отсутствии инертного наполнителя.

## 10 6. Эксперимент 6 - Влияние полоксамера на эффективность содержащих мРНК наночастиц *in vivo*

### 6.1. Материалы и методики

#### 6.1.1. Получение наночастиц

См. раздел 1.1.1.

#### 15 6.1.2. Добавление полоксамера

См. раздел 3.1.2.

#### 6.1.3. Распыление

См. раздел 1.1.3.

#### 6.1.4. Определение размера комплекса и ИПД

20 См. раздел 3.1.4.

#### 6.1.5. Определение эффективности капсулирования

См. раздел 2.1.3.

#### 6.1.6. Исследование целостности мРНК

См. раздел 3.1.6.

#### 25 6.1.7. Содержание животных

Мышей содержали при особых условиях отсутствия патогенных микроорганизмов (по данным исследования в лабораторном комплексе отсутствовали какие-либо патогенные микроорганизмы, указанные в перечне, определенном FELASA (Федерация европейских научных ассоциаций специалистов по работе с лабораторными животными), в соответствии с ежегодным санитарно-гигиеническим исследованием 2017 г.) в отдельных проветриваемых клетках в помещении с циркадным световым циклом (освещение от 7:00 до 19:00). Корм и воду предоставляли в неограниченном

количестве. После прибытия до использования животных в исследовании им предоставляли не менее 7 дней для акклиматизации.

#### 6.1.8. Внутритрахеальное введение

Животных анестезировали путем проведения ингаляции чистого кислорода, содержащего 4% изофлурана (Isothesia, Henry Shine). Находящихся в бессознательном состоянии животных интубировали с использованием катетера 20 G, укороченного до 37 мм. Препарат, обладающий конечным объемом, равным 50 мкм, вводили одной порцией в области проксимальной вершины тубуса, при этом во время физиологического дыхательного движения животное вдыхало препарат. В заключение вводили 150 мкл воздуха для обеспечения полного удаления препарата из катетера.

#### 6.1.9. Умерщвление и вскрытие

Животных подвергали общей анестезии путем внутрибрюшинной инъекции смеси фентанил/мидазолам/медетомидин (0,05/5,0/0,5 мг/кг массы тела). Затем мышью умерщвляли путем перелома шейного отдела позвоночника. Проводили разрез брюшной полости по срединной линии. Для эксплантации легких малый круг кровообращения промывали путем инъекции 5 мл ЗФФ через правый желудочек. Затем от блока сердце-легкие отсекали сердце. Легкие эксплантировали и быстро замораживали с использованием твердого диоксида углерода.

#### 6.1.10. Определение количества уЗФБ в гомогенатах легких

Для определения количества уЗФБ замороженные легкие взвешивали и цельный орган гомогенизировали. Использовали пробирки для гомогенизации Lysing Matrix D (MP Biomedicals), заполненные с помощью 500 мкл буфера для лизиса (0,25 M Tris (Carl Roth), 0,1% Triton X-100 (Carl Roth), pH = 7,8). Гомогенизацию проводили в течение 3×20 с в гомогенизаторе для тканей (гомогенизатор для тканей и клеток MP FastPrep-24). Затем лизаты инкубировали на льду в течении 10 мин и центрифугировали при 20000×g и при 4°C в течение 10 мин (центрифуга Mikro 22R, Hettich Zentrifugen). Для определения количества уЗФБ использовали набор GFP SimpleStep ELISA® (Abscam ab171581). Концентрации уЗФБ пересчитывали на массы легких и выражали в следующих единицах: нг белка/г ткани.

## 6.2. Результаты

Для обеспечения возможности использования инертного наполнителя для стабилизации наночастиц, использующихся в качестве лекарственного средства необходимо, чтобы инертный наполнитель не оказывал неблагоприятное  
5 воздействие на эффективность трансфицирования этих наночастиц *in vivo*. В ходе этого исследования определяли эффективность трансфицирования наночастиц в присутствии инертного наполнителя после внутритрахеального введения мышам. Эффективность определяли путем определения количества уЗФБ, кодируемого посредством мРНК, через 24 ч после проведения лечения. На  
10 фиг. 6 представлены результаты лечения с использованием трех разных доз в присутствии и при отсутствии поллоксамера, в частности, концентрация уЗФБ после внутритрахеального введения наночастиц в 10% (мас./об.) растворе сахарозы, 50 мМ NaCl, с добавлением и без добавления инертного наполнителя.

## 6.3. Обсуждение результатов и выводы

15 Определенные в легких мышей концентрации уЗФБ в присутствии и при отсутствии поллоксамера являлись одинаковыми при соответствующих дозах. Анализ полученных результатов позволяет заключить, что поллоксамер не оказывает неблагоприятное воздействие на эффективность трансфицирования наночастиц *in vivo*.

20 7. Эксперимент 7 - Добавление поллоксамера во время последующей обработки наночастиц улучшает качество наночастиц

### 7.1. Материалы и методики

#### 7.1.1. Получение наночастиц

См. раздел 1.1.1.

25 7.1.2. Определение размера комплекса и ИПД

См. раздел 1.1.4.

### 7.2. Результаты

30 После получения комплекса путем замены растворителя компоненты буфера, необходимые для проведения этой стадии (EtOH и лимонная кислота), следует удалить. Стандартной методикой проведения этой стадии, а также для регулирования концентрации препарата является тангенциальное поточное фильтрование. Во время этой обработки наночастицы подвергаются воздействию жестких условий, это приводит к ухудшению качества частиц (например, к

агрегации). В ходе проведения этого эксперимента полуксамер использовали для стабилизации частиц во время этой стадии обработки. Для этой цели наночастицы получали при стандартных условиях. В одну порцию до обработки с помощью ТПФ добавляли полуксамер при концентрации, равной 0,5% (мас./об.). Качество частиц оценивали путем определения размера частиц после смешивания и после обработки. На фиг. 7 представлены размер и ИПД содержащихся в препарате наночастиц до и после обработки путем проведения распыления в присутствии или при отсутствии полуксамера.

### 7.3. Обсуждение результатов и выводы

10 Как видно из фиг. 7 при отсутствии полуксамера размер частиц, а также индекс полидисперсности увеличиваются при обработке с помощью ТПФ, это указывает на агрегацию частиц. В присутствии полуксамера размер частиц, а также индекс полидисперсности остаются стабильными во время обработки. Таким образом, добавление полуксамера явно улучшает качество частиц во  
15 время обработки наночастиц.

8. Эксперимент 8 - Качество наночастиц на основе ЭХИ (сложный эфир холестерина, включающий имидазол) после распыления при отсутствии и в присутствии полуксамера

### 8.1. Материалы и методики

#### 20 8.1.1. Получение наночастиц

Липидные наночастицы получали из катионогенного липида (ЭХИ (сложный эфир холестерина, включающий имидазол)), липида-помощника - ДОФЭ (1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин, Avanti Polar Lipids) и конъюгированного с ПЭГ липида - ДМГ-ПЭГ-2000 (1,2-димиристоил-sn-глицерометокси(полиэтиленгликоль)-2000, Avanti Polar Lipids) при молярных  
25 отношениях, составляющих 60/35/5 соответственно. Объединяли обладающие соответствующими объемами исходные растворы липидов в этаноле чистоты для ВЭЖХ, обладающие концентрациями равными 10 мг/мл. Методику получения проводили путем быстрой замены растворителя. Смесь липидов в этаноле  
30 объединяли с мРНК в цитратном буфере (10 мМ лимонной кислоты, 150 мМ NaCl, pH = 4,5) при объемном отношении, составляющем 1:4, с использованием системы NanoAssembler Benchtop (Precision NanoSystems). Полученный препарат обладал концентрацией мРНК, равной 0,2 мг/мл, при значении отношения N/P,

равном 4. После инкубирования при КТ в течение 30 мин препарат очищали и концентрировали путем тангенциального поточного фильтрования (система для ТПФ KR2i, Repligen) с использованием модуля для фильтрования с порогом отсечения, равным 100 кДа (мПЭС, Repligen), и с использованием 25 мМ раствора NaCl в качестве буфера для разведения и диафильтрования. Уменьшение количества микрофлоры и заключительное стерильное фильтрование проводили с использованием шприцевых фильтров с отверстиями размером 0,8 мкм и 0,2 мкм.

#### 8.1.2. Добавление инертного наполнителя

Полоксамер добавляли непосредственно перед распылением (исходная концентрация: 20% (мас./об.) полоксамера 188 в 25 мМ растворе NaCl), при этом получали концентрацию мРНК, равную 0,5 мг/мл, в 5% (мас./об.) растворе полоксамера 188, 25 мМ раствор NaCl.

#### 8.1.3. Распыление

См. раздел 1.1.3.

#### 8.1.4. Определение размера комплекса и ИПД

См. раздел 1.1.4.

#### 8.2. Результаты

В экспериментах 1 и 3 было показано, что полоксамер стабилизирует наночастицы на основе катионогенного липидоида dL\_05 (R) во время распыления. Задачей этого эксперимента являлось исследование того, может ли добавление полоксамера также обеспечивать сохранение качества частиц в случае обычно используемых наночастиц на основе другого катионогенного липида (ЭХИ) во время распыления. Результаты, полученные для эталонного образца (без инертного наполнителя, на фиг. 8 обозначено: "без добавления"), показывают, что распыление наночастиц приводит к увеличению размера (гидродинамического диаметра, Z-среднего диаметра) и индекса полидисперсности (ИПД). Добавление 5% (мас./об.) полоксамера предотвращает этот эффект и обеспечивает сохранение качества частиц. На фиг. 8 представлены размер и ИПД до и после распыления 1 мл суспензии наночастиц при концентрации мРНК, равной 0,5 мг/мл, с добавлением или без добавления полоксамера.

### 8.3. Обсуждение результатов и выводы

Присутствие полоксамера также стабилизирует липидные наночастицы на основе катионогенного липида ЭХИ во время распыления и предотвращает увеличение размера (гидродинамического диаметра, Z-среднего диаметра) и индекса полидисперсности (ИПД).

9. Эксперимент 9 - Качество наночастиц на основе DLin-МС3-DMA после распыления при отсутствии и в присутствии полоксамера

#### 9.1. Материалы и методики

##### 9.1.1. Получение наночастиц

Липидные наночастицы получали из катионогенного липида (DLin-МС3-DMA), липида-помощника - ДСФХ (1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин, Avanti Polar Lipids) и холестерина (Avanti Polar Lipids), и конъюгированного с ПЭГ липида - ДМФЭ-ПЭГ-2000 (1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин - полиэтиленгликоль-2000, Avanti Polar Lipids) при молярных отношениях, составляющих 50/10/38,5/1 соответственно. Объединяли обладающие соответствующими объемами исходные растворы липидов в этаноле чистоты для ВЭЖХ, обладающие концентрациями равными 10 мг/мл. Методику получения проводили путем быстрой замены растворителя. Смесь липидов в этаноле объединяли с мРНК в цитратном буфере (50 мМ лимонной кислоты, 160 мМ NaCl, pH = 3) при объемном отношении, составляющем 1:3, с использованием системы NanoAssemblr Benchtop (Precision NanoSystems). Полученный препарат обладал концентрацией мРНК, равной 0,2 мг/мл, при значении отношения N/P, равном 3. После инкубирования при КТ в течение 30 мин препарат очищали и концентрировали путем тангенциального поточного фильтрования (система для ТПФ KR2i, Repligen) с использованием модуля для фильтрования с порогом отсека, равным 100 кДа (мПЭС, Repligen), и с использованием ЗФФ в качестве буфера для разведения и диафильтрования. Уменьшение количества микрофлоры и заключительное стерильное фильтрование проводили с использованием шприцевых фильтров с отверстиями размером 0,8 мкм и 0,2 мкм.

##### 9.1.2. Добавление инертного наполнителя

Полоксамер добавляли непосредственно перед распылением (исходная концентрация: 20% (мас./об.) полоксамера 188 в ЗФФ), при этом получали

концентрацию, равную 0,5 мг/мл, в 5% (мас./об.) растворе полоксамера 188 в ЗФФ.

### 9.1.3. Распыление

См. раздел 1.1.3.

### 5 9.1.4. Определение размера комплекса и ИПД

См. раздел 1.1.4.

### 9.2. Результаты

В экспериментах 1 и 3 было показано, что полоксамер стабилизирует наночастицы на основе катионогенного липидоида dL\_05 (R) во время распыления. Задачей этого эксперимента являлось исследование того, может ли добавление полоксамера также обеспечивать сохранение качества частиц в случае обычно используемых наночастиц во время распыления. В качестве модели были выбраны подробно описанные наночастицы на основе катионогенного липида DLin-МС3-DMA. При отсутствии инертного наполнителя (без добавления полоксамера, на фиг. 9 обозначено: "без добавления") распыление наночастиц приводит к увеличению размера (гидродинамического диаметра, Z-среднего диаметра) и индекса полидисперсности (ИПД). Добавление 5% (мас./об.) полоксамера предотвращает этот эффект и обеспечивает сохранение качества частиц. На фиг. 8 представлены размер и ИПД до и после распыления 1 мл суспензии наночастиц при концентрации мРНК, равной 0,5 мг/мл, с добавлением или без добавления полоксамера.

### 9.3. Обсуждение результатов и выводы

Присутствие полоксамера стабилизирует липидные наночастицы на основе катионогенного липида DLin-МС3-DMA во время распыления. Добавление полоксамера предотвращает увеличение размера (гидродинамического диаметра, Z-среднего диаметра) и индекса полидисперсности (ИПД).

### Описание чертежей

На фиг. 1 представлены размер и ИПД содержащихся в препарате наночастиц до и после распыления 1 мл при концентрации мРНК, равной 0,5 мг/мл в 1% растворе инертного наполнителя, 10% (мас./об.) раствор сахарозы, 50 mM NaCl.

На фиг. 2 представлена эффективность капсулирования содержащихся в препарате наночастиц при концентрации мРНК, равной 2,5 мг/мл в х% (мас./об.) растворе инертного наполнителя, 10% (мас./об.) раствор сахарозы, 50 мМ NaCl. Результаты получены через 6 ч после смешивания.

5 На фиг. 3 представлены биофизические характеристики 1 мл суспензий наночастиц объемом 1 мл, обладающих концентрацией, равной 2,5 мг/мл, и содержащих полоксамер при разных концентрациях, до (без обработки) и после распыления: (а) размер, (б) эффективность капсулирования, (в) относительная целостность мРНК.

10 На фиг. 4 представлены результаты исследования биофизических характеристик фракционированного аэрозоля при использовании 10 мл препарата при концентрации мРНК, равной 2,5 мг/мл, в присутствии 5% полоксамера (буфер: 5% (мас./об.) Р188, 10% (мас./об.) раствор сахарозы, 50 мМ NaCl): (а) размер, (б) ИПД, (в) эффективность капсулирования, (г)  
15 относительная целостность мРНК в зависимости от продолжительности распыления.

На фиг. 5 представлена концентрация уЗФБ в лизатах клеток через 24 ч после трансфицирования КВЖ клеток 16НВЕо- наночастицами с капсулированными мРНК уЗФБ до (без обработки) и после распыления в  
20 присутствии 5% (мас./об.) инертного наполнителя (полоксамер или Tween-80). Пунктирная линия: эталонная концентрации уЗФБ после трансфицирования наночастицами без добавления инертного наполнителя.

На фиг. 6 представлена концентрация уЗФБ после внутритрахеального введения наночастиц в 10% (мас./об.) растворе сахарозы, 50 мМ NaCl, с  
25 добавлением и без добавления инертного наполнителя.

На фиг. 7 представлены размер и ИПД содержащихся в препарате наночастиц до и после обработки путем проведения распыления в присутствии или при отсутствии полоксамера.

На фиг. 8 представлены размер и ИПД содержащихся в препарате  
30 наночастиц (с использованием ЭХИ в качестве катионогенного липида) до и после распыления 1 мл препарата при концентрации мРНК, равной 0,5 мг/мл, в присутствии или при отсутствии 5% (мас./об.) полоксамера.

На фиг. 9 представлены размер и ИПД содержащихся в препарате наночастиц (с использованием DLin-МС3-DMA в качестве катионогенного липида) до и после распыления 1 мл препарата при концентрации мРНК, равной 0,5 мг/мл, в присутствии или при отсутствии 5% (мас./об.) полуксамера.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Препарат водной суспензии, предназначенный для получения аэрозоля, указанный препарат суспензии содержит липидные или липидоподобные наночастицы, которые суспендированы в водном растворе разбавителя, где липидные или липидоподобные наночастицы содержат следующие компоненты (а) и (b):
- 5 (а) нуклеиновая кислота и  
(b) ионизируемый липид или ионизируемый липидоид;
- 10 и где водный раствор разбавителя содержит триблок-сополимер, который включает один поли(пропиленоксидный) блок и два поли(этиленоксидных) блока.
2. Препарат суспензии по п. 1, где концентрация нуклеиновой кислоты, содержащейся в препарате суспензии, находится в диапазоне от 0,01 до 10 мг/мл в пересчете на полный объем препарата суспензии.
- 15
3. Препарат суспензии по п. 1 или 2, где наночастицы обладают Z-средним диаметром, определенным с помощью динамического светорассеяния, находящимся в диапазоне от 10 до 500 нм.
- 20
4. Препарат суспензии по любому из п.п. 1-3, где наночастицы дополнительно содержат один или большее количество следующих компонентов (с1) - (с6):
- 25 (с1) неионизируемый липид, обладающий структурой стерина;  
(с2) глицерофосфолипид;  
(с3) конъюгированный с полиэтиленгликолем- ПЭГ липид;  
(с4) конъюгированный с полисаркозином липид;  
(с5) ПАСилированный липид; и  
30 (с6) катионогенный полимер.

5. Препарат суспензии по любому из п.п. 1-4, где наночастицы содержат: от 30 до 65 мол.% ионизируемого липида или ионизируемого липидоида (b) и один или большее количество следующих компонентов:

от 10 до 50 мол.% липида, обладающего структурой стерина (c1),

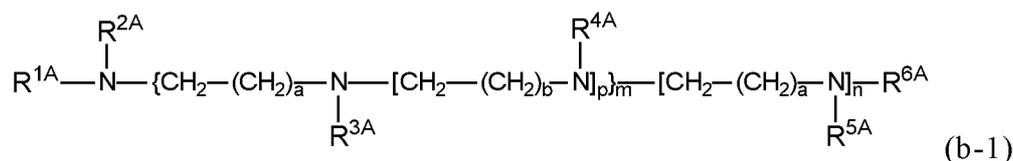
5 от 4 до 50 мол.% глицерофосфолипида (c2),

от 0,5 до 10 мол.% одного из следующих: конъюгированный с ПЭГ липид (c3), конъюгированный с полисаркозином липид (c4) и ПАСилированный липид (c5), или любой их комбинации,

от 0,5 до 10 мол.% катионогенного полимера (c6),

10 при этом сумма содержаний (b) и (c1) - (c6) составляет 100 мол.%.

6. Препарат суспензии по любому из п.п. 1-5, где наночастицы содержат ионизируемый липидоид (b), описывающийся следующей формулой (b-1),



15 в которой:

а равно 1 и b обозначает целое число, равное от 2 до 4; или a обозначает целое число, равное от 2 до 4, и b равно 1,

р равно 1 или 2,

m равно 1 или 2; n равно 0 или 1 и m+n ≥ 2; и

20 R<sup>1A</sup> - R<sup>6A</sup> независимо друг от друга выбраны из числа следующих: водород;

-CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7A</sup>, -CH(R<sup>7A</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7A</sup>,

-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-NH-R<sup>7A</sup>; -CH<sub>2</sub>-R<sup>7A</sup>; -C(NH)-NH<sub>2</sub>; цепь поли(этиленгликоля) и

лиганд рецептора; где R<sup>7A</sup> выбран из числа следующих: C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub>-алкил и C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub>-алкенил, содержащий одну двойную связь C-C;

25 при условии, что по меньшей мере два из остатков R<sup>1A</sup> - R<sup>6A</sup> выбраны из числа

следующих: -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7A</sup>, -CH(R<sup>7A</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7A</sup>,

-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-NH-R<sup>7A</sup> и -CH<sub>2</sub>-R<sup>7A</sup>, где R<sup>7A</sup> выбран из числа следующих: C<sub>3</sub>-

C<sub>18</sub>-алкил и C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub>-алкенил, содержащий одну двойную связь C-C;

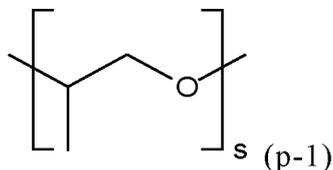
или его протонированную форму, где один или большее количество атомов

30 азота, содержащихся в соединении формулы (b-1), являются протонированными,

при этом образуется соединение, обладающее положительным зарядом.

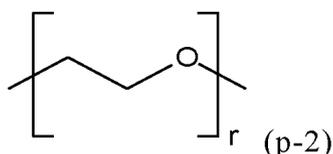
7. Препарат суспензии по любому из п.п. 1-6, где триблок-сополимером является триблок-сополимер А-В-А, который содержит один поли(пропиленоксидный) блок В формулы (p-1):

5



в которой s обозначает целое число, равное от 15 до 67, предпочтительно от 20 до 40, и

два поли(этиленоксидных) блока А формулы (p-2):



10 в которой r для каждого блока независимо обозначает целое число, равное от 2 до 130, предпочтительно от 50 до 100 и более предпочтительно от 60 до 90.

8. Препарат суспензии по любому из п.п. 1-7, который содержит триблок-сополимер при концентрации, равной от 0,05 до 5% (мас./об., при температуре, равной 25°C) в пересчете на полный объем препарата суспензии.

15

9. Распылитель, который включает отделение, в котором находится предназначенный для получения аэрозоля препарат водной суспензии по любому из п.п. 1-8.

20

10. Аэрозоль, включающий капельки аэрозоля, диспергированные в газовой фазе, где капельки аэрозоля содержат липидные или липидоподобные наночастицы и водный раствор разбавителя для наночастиц, где липидные или липидоподобные наночастицы содержат следующие компоненты (a) и (b):

25

(a) нуклеиновая кислота и

(b) ионизируемый липид или ионизируемый липидоид;

и где водный раствор разбавителя содержит триблок-сополимер, который включает один поли(пропиленоксидный) блок и два поли(этиленоксидных) блока.

5            11. Аэрозоль по п. 10, где среднемассовый аэродинамический диаметр-СМАД капелек аэрозоля находится в диапазоне от 2 до 10 мкм.

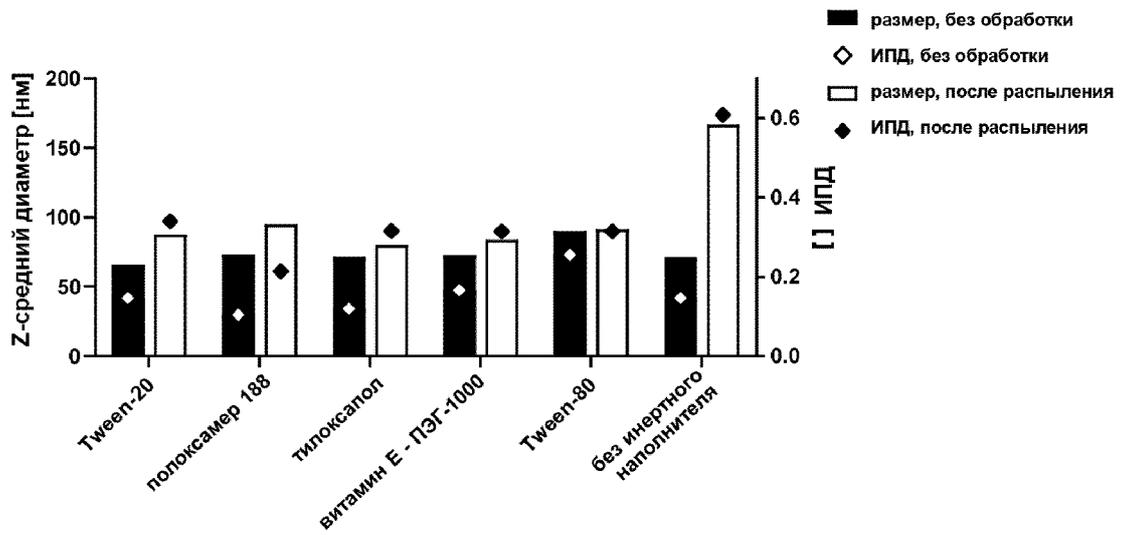
10           12. Аэрозоль по п. 11 или 12, где наночастицы обладают Z-средним диаметром, определенным с помощью динамического светорассеяния, находящимся в диапазоне от 10 до 500 нм, более предпочтительно в диапазоне от 10 до 250 нм, еще более предпочтительно от 20 до 200 нм.

15           13. Аэрозоль по любому из п.п. 10-12, который является получаемым путем распыления препарата водной суспензии по любому из п.п. 1-8.

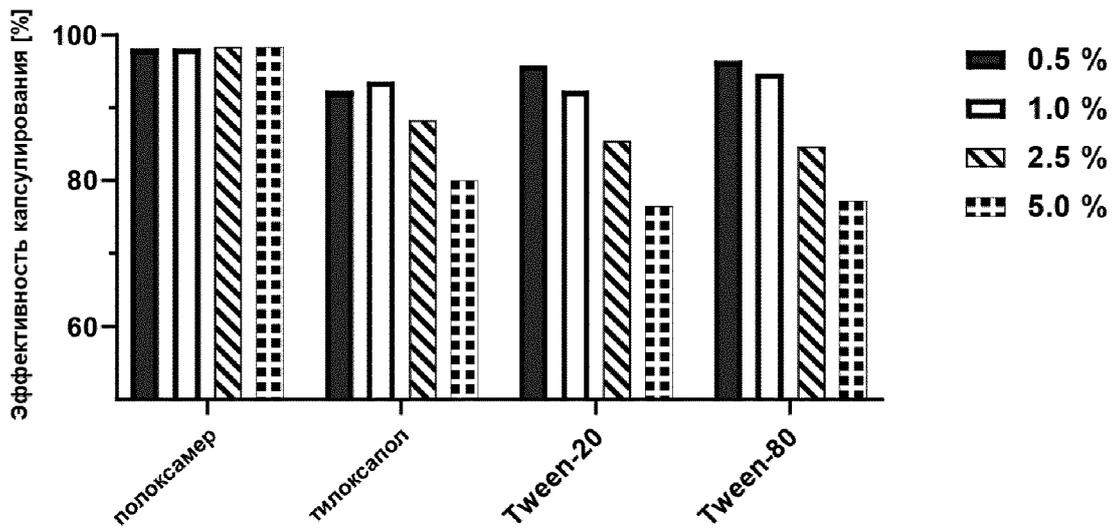
20           14. Препарат водной суспензии по любому из п.п. 1-8, предназначенный для применения в качестве лекарственного средства, где препарат водной суспензии следует распылять и аэрозоль, полученный путем распыления, следует вводить субъекту.

25           15. Препарат водной суспензии по любому из п.п. 1-8, предназначенный для применения для лечения или предупреждения заболевания или нарушения с помощью терапии на основе нуклеиновой кислоты, где лечение или предупреждение включает распыление препарата водной суспензии и введение аэрозоля, полученного путем распыления, в или через дыхательные пути субъекта, предпочтительно посредством введения в легкие или назального введения.

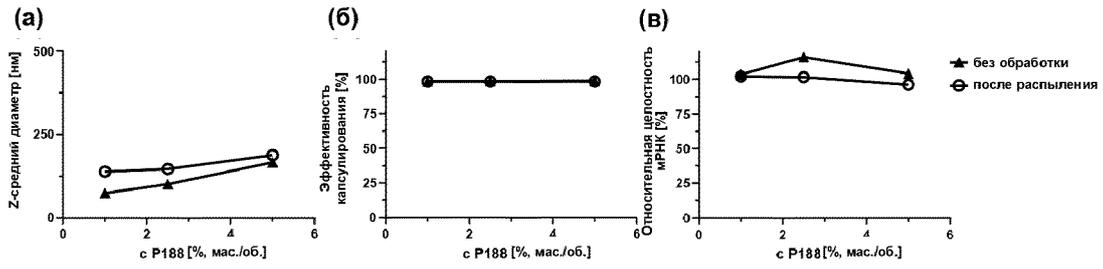
30           16. Препарат водной суспензии, предназначенный для применения по п. 15, где заболеванием или нарушением, которое лечат или предупреждают, является заболевание легких.



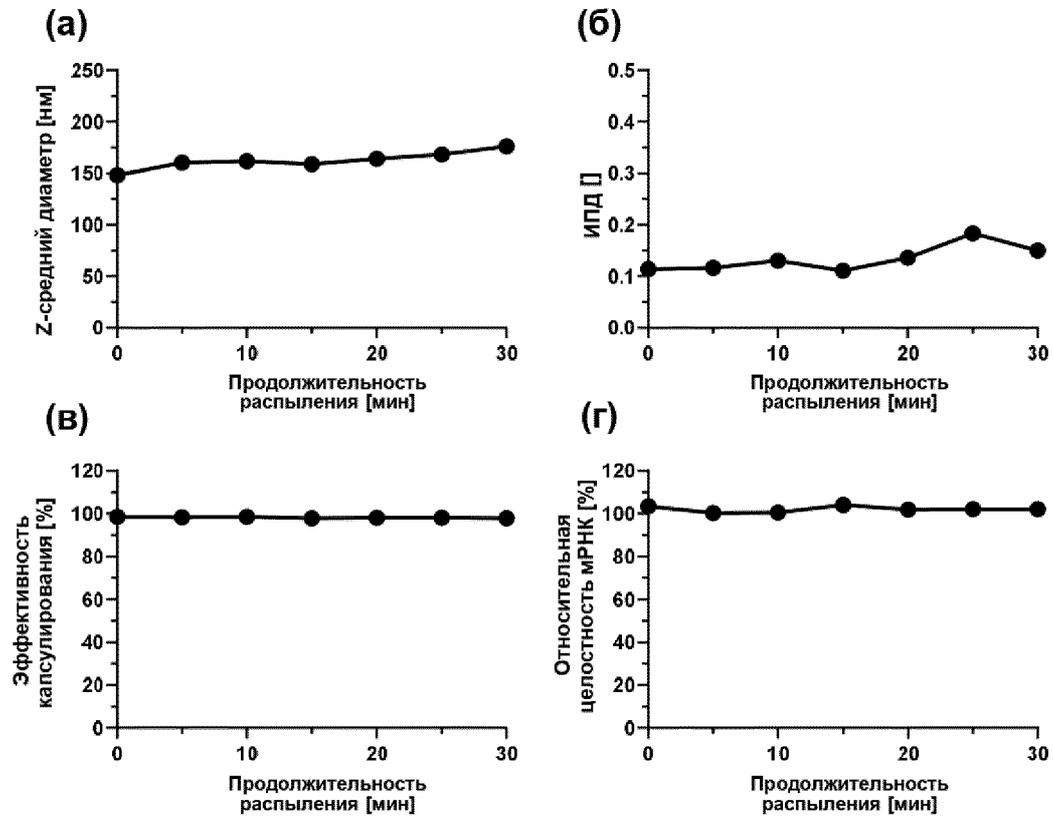
Фиг. 1



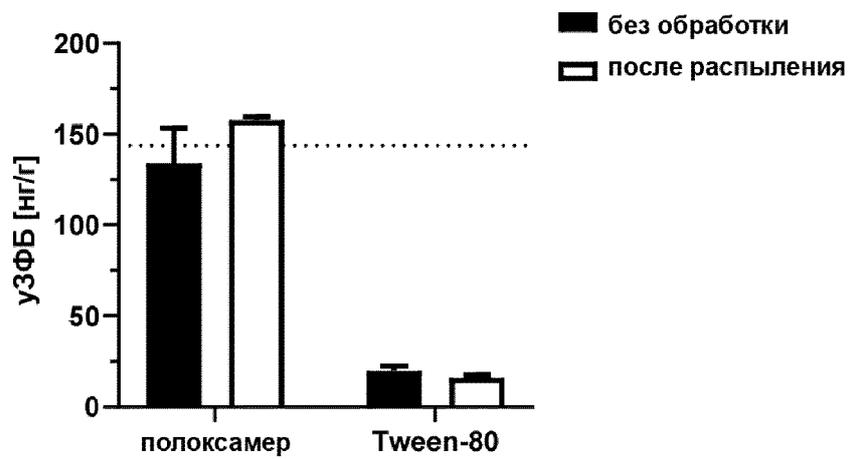
Фиг. 2



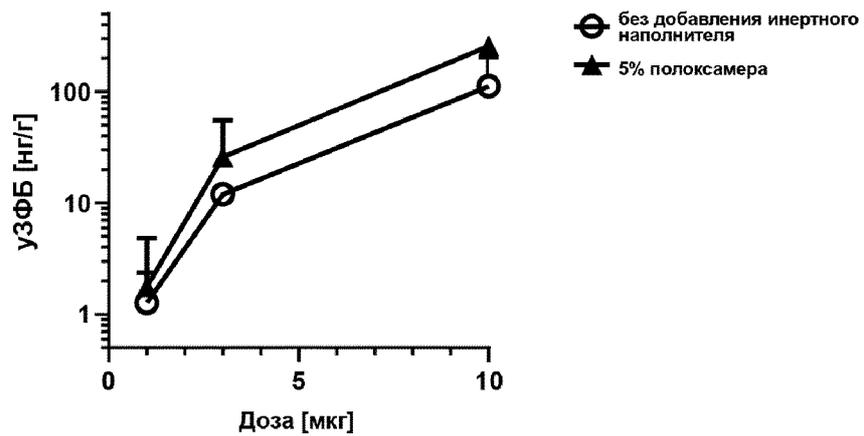
Фиг. 3



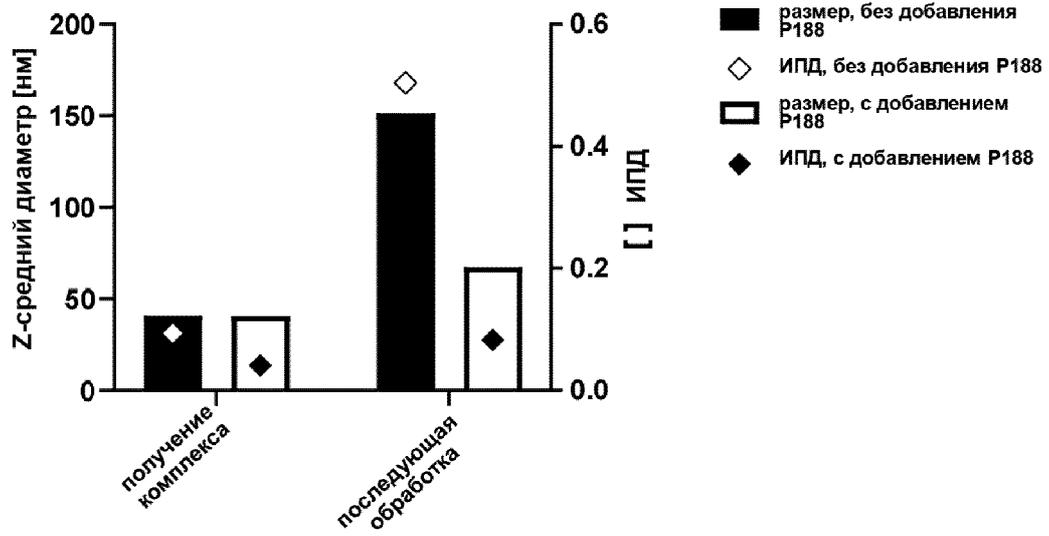
Фиг. 4



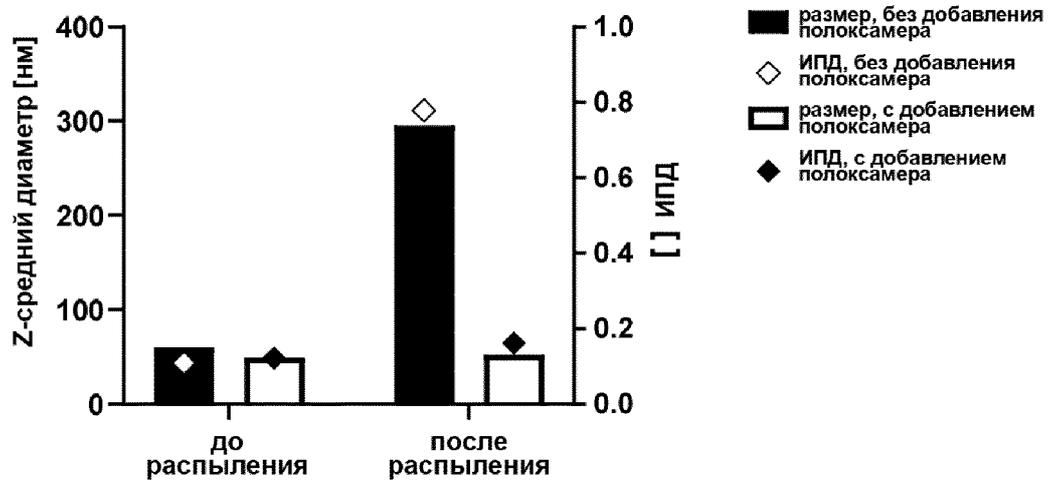
Фиг. 5



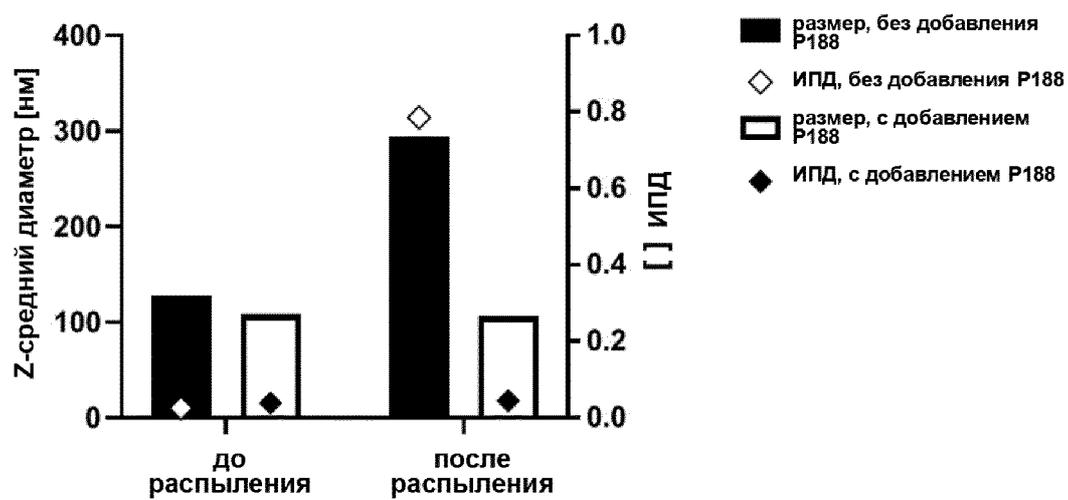
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9