



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C08G 73/02 (2019.05); A61K 47/50 (2019.05); A61K 47/59 (2019.05); A61K 48/0041 (2019.05); C12N 15/87 (2019.05)

(21)(22) Заявка: 2017122022, 18.12.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.12.2015

Дата регистрации:
26.02.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
19.12.2014 EP 14199439.2

(43) Дата публикации заявки: 24.12.2018 Бюл. № 36

(45) Опубликовано: 26.02.2020 Бюл. № 6

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 22.06.2017

(86) Заявка РСТ:
EP 2015/080669 (18.12.2015)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/097377 (23.06.2016)

Адрес для переписки:
105082, Москва, Спартаковский пер., 2, стр. 1,
секция 1, этаж 3, ЕВРОМАРКПАТ

(72) Автор(ы):

ДОМЕН Кристиан (DE),
ПЛАНК Кристиан (DE),
РУДОЛЬФ Карстен (DE)

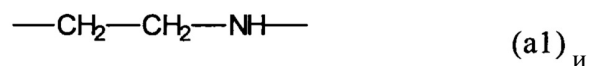
(73) Патентообладатель(и):
ЭТРИС ГМБХ (DE)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: **Kramer Michael**:
"Polymeric Nanocarriers with dendritic Core-Shell
Architectures", 2004, pp.100-125. US 6013240 A,
11.01.2000. US 6153597 A, 28.11.2000. US 2007/
0269891 A9, 22.11.2007. И.Я. Слоним,
Я.Г. Урман: "ЯМР-спектроскопия гетероцепных
полимеров", -М.: Изд-во "Химия", 1982, сс.80-
82. RU 2269544 C2, 10.02.2006. RU 2451525 C1,
27.05.2012.

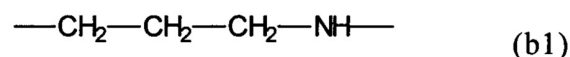
(54) КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ В КЛЕТКИ

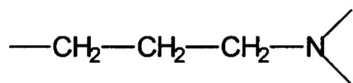
(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к статистическому полимеру, композиции для введения нуклеиновой кислоты в клетку, фармацевтической композиции, применению сополимера или композиции для доставки РНК в клетку, способу доставки РНК в клетку-мишень или ткань-мишень и способу получения сополимера. Предложен статистический полимер, включающий множество повторяющихся звеньев (a):



повторяющихся звеньев, независимо друг от друга выбранных из следующих формул (b):





(b2)

Молярное соотношение суммы повторяющихся звеньев (а) и суммы повторяющихся звеньев (b) находится в интервале от 0,7:1,0 до 1,0:0,7. Один или более атомов азота в повторяющихся звеньях (а) и/или (b), содержащихся в сополимере, могут протонироваться с образованием катионного сополимера. Указанная композиция включает нуклеиновую кислоту и сополимер, где

нуклеиновая кислота представляет собой РНК. Соотношение массы сополимера к массе нуклеиновой кислоты составляет от 0,25:1 до 50:1. Фармацевтическая композиция, используемая для лечения заболевания, которое можно лечить или предотвратить путем введения РНК. Способ получения сополимера включает стадию полимеризации смеси мономеров, включающий азиридин и азетидин. Полученная композиция пригодна для высокоэффективной доставки нуклеиновых кислот, прежде всего РНК, в клетку или ткань. 6 н. и 9 з.п. ф-лы, 3 ил., 2 табл., 3 пр.

R U 2 7 1 5 2 2 7 C 2

R U 2 7 1 5 2 2 7 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C08G 73/02 (2006.01)*A61K 47/50* (2017.01)*A61K 47/59* (2017.01)*A61K 48/00* (2006.01)*C12N 15/87* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C08G 73/02 (2019.05); *A61K 47/50* (2019.05); *A61K 47/59* (2019.05); *A61K 48/0041* (2019.05); *C12N 15/87* (2019.05)

(21)(22) Application: **2017122022, 18.12.2015**

(24) Effective date for property rights:
18.12.2015

Registration date:
26.02.2020

Priority:

(30) Convention priority:
19.12.2014 EP 14199439.2

(43) Application published: **24.12.2018 Bull. № 36**(45) Date of publication: **26.02.2020 Bull. № 6**(85) Commencement of national phase: **22.06.2017**

(86) PCT application:
EP 2015/080669 (18.12.2015)

(87) PCT publication:
WO 2016/097377 (23.06.2016)

Mail address:
**105082, Moskva, Spartakovskij per., 2, str. 1,
sektiya 1, etazh 3, EVROMARKPAT**

(72) Inventor(s):

**DOMEN Kristian (DE),
PLANK Kristian (DE),
RUDOLF Karsten (DE)**

(73) Proprietor(s):

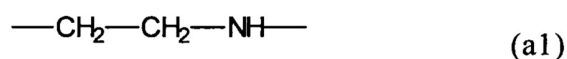
ethris GmbH (DE)

(54) **COMPOSITION FOR INTRODUCING NUCLEIC ACID INTO CELLS**

(57) Abstract:

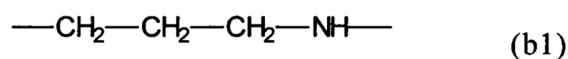
FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: present invention relates to a statistical polymer, a composition for introducing nucleic acid into a cell, a pharmaceutical composition, use of a copolymer or composition for RNA delivery into a cell, a method of delivering RNA into a target cell or target tissue and a method of producing a copolymer. Disclosed is a statistical polymer comprising a plurality of repeating links (a):

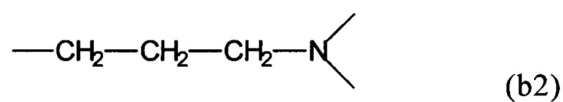


and $\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---N}$  ^(a2), and a

plurality of repeating links, independently selected from the following formulas (b):



a n d



Molar ratio of the sum of repeating links (a) and the sum of repeating links (b) ranges from 0.7:1.0 to 1.0:

0.7. One or more nitrogen atoms in repeating links (a) and/or (b) contained in the copolymer can be protonated to form a cationic copolymer. Said composition contains a nucleic acid and a copolymer, where the nucleic acid is RNA. Ratio of the weight of the copolymer to the weight of the nucleic acid ranges from 0.25:1 to 50:1. Pharmaceutical composition used for treating a disease that can be treated or prevented by RNA introduction.

Method of producing the copolymer involves a step for polymerising a mixture of monomers, including aziridine and azetidine.

EFFECT: prepared composition is suitable for high-efficient delivery of nucleic acids, primarily RNA, into a cell or tissue.

15 cl, 3 dwg, 2 tbl, 3 ex

R U 2 7 1 5 2 2 7 C 2

R U 2 7 1 5 2 2 7 C 2

Настоящее изобретение относится к полимерам, включающим характерные повторяющиеся звенья алкиленамина, которые используют в качестве носителей для трансфекции клетки нуклеиновой кислотой, прежде всего РНК. Кроме того настоящее изобретение относится к композиции, включающей по крайней мере нуклеиновую кислоту и полимер, включающий такие повторяющиеся звенья алкиленамина, и к способу трансфекции клетки с использованием указанной композиции. Более того настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям и к их применению.

Возможность осуществления нуклеиновой терапии в конечном счете зависит от наличия эффективных способов доставки нуклеиновых кислот в клетки. В основном, в области доставки нуклеиновых кислот использование свободных нуклеиновых кислот в некоторых случаях является пригодным и достаточным для трансфекции клеток (Wolff и др., Science, 247, 1465-1468 (1990)). Однако в большинстве предполагаемых областях применения на практике предпочтительным или даже необходимым является смешивать нуклеиновую кислоту по крайней мере с одним вторым агентом, который защищает нуклеиновую кислоту от разложения в процессе доставки и/или способствует распределению в ткани мишени и в окружающей ее среде и/или способствует захвату клеткой и обеспечивает приемлемый внутриклеточный процессинг. В научной литературе такие составы для доставки нуклеиновой кислоты называются векторами. Ранее было описано огромное множество соединений для получения векторов нуклеиновых кислот, так называемых реагентов для трансфекции. Эти соединения обычно представляют собой поликатионы или композиции, включающие катионные липиды или липидоподобные соединения, такие как липидоиды (US 8450298). Комплексы нуклеиновых кислот с поликатионами называются полиплексами, а комплексы с катионными липидами называются липоплексами (Felgner и др., Hum Gene Ther, 8, 511-512 (1997)). Описаны также комплексы, включающие оба компонента, поликатион и липиды (Li and Huang, "Nonviral Vectors for Gene Therapy", Academic Press, Chapter 13, 295-303 (1999)). Реагенты для трансфекции используют для связывания и уплотнения нуклеиновых кислот и в результате получают первичные комплексы размером в нанометровом диапазоне. В соль-содержащих средах эти комплексы обычно агрегируют, то есть происходит так называемая соль-индуцированная агрегация, которая является предпочтительной для трансфекции в клеточной культуре или локализованного введения in vivo (Ogris и др. Gene Ther, 5, 1425-1433 (1998), Ogris и др., AAPS PharmSci, 3, E21 (2001)). Агрегацию можно исключить и стабилизировать комплексы нуклеиновых кислот с реагентами для трансфекции за счет экранирования поверхности полимерами, такими как полиэтиленгликоль. Экранирование также используют, чтобы исключить опсонизацию и активацию комплемента комплексами нуклеиновых кислот с реагентами для трансфекции (Finsinger и др. Gene Ther, 7, 1183-1192 (2000)). Уплотнение нуклеиновых кислот с использованием реагентов для трансфекции не только защищает их от разложения под действием нуклеаз, но и делает их пригодными для захвата клеткой с последующим эндоцитозом. Множество линейных и разветвленных поликатионов, способных связываться с нуклеиновыми кислотами и уплотнять их, включает, но не ограничиваясь только ими, поли(этиленмин), поли(амидоамин), дендримеры, поли(2-(диметиламино)этиловый эфир метакриловой кислоты) (pDMAEMA) или катионные производные поли(N-гидроксипропил)метакриламид (pHPMA), поли(бэ́та-аминоэфир) (Akinc и др., Bioconj Chem 14 (5): 979-88 (2003)), природные и синтетические катионные поли(аминокислоты) или пептиды, такие как полилизины, гистоны, HMG белки (негистоновые хромосомные белки) или катионные углеводы, такие как хитозаны. Кроме полимеров, содержащих первичные, вторичные и/или третичные амины,

указанные выше, важным классом молекул, предназначенных для комплексообразования и доставки нуклеиновых кислот, являются структуры, содержащие остатки гуанидина. Гуанидил-модифицированные полимеры, такие как структуры на основе аргинина, (Yamanouchi и др., *Biomaterials* 29 (22): 3269-77 (2008), РАМАМ модифицированный аргинином (Son и др., *Bull. Korean Chem. Soc.* Vol 34 No. 3 (2013)) или гуанидильированный-PEI (Lee и др., *Bull. Korean Chem. Soc.*, Vol. 29, No. 3 (2008)), повышают эффективность таких систем. Особенно в случае взаимодействия с РНК, молекулярные характеристики остатка гуанидина обеспечивают уникальные связывающие свойства (Calnan и др., *Science* 252 (5009), 1167-1171 (1991)). Для получения таких структур можно использовать методы, которые описаны в обзоре Katritzky and Rogovoy (Katritzky и Rogovoy, *ARKIVOC* (iv) 49-87 (2005)). Во многих случаях полиплексы дополнительно модифицируют для включения остатков, направленно действующих на клетку, или остатков, направленно действующих во внутриклеточном пространстве, и/или дестабилизирующего мембрану компонента, такого как инактивированный вирус (Curiel и др., *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 8850-8854 (1991)), вирусный капсид или вирусные белок или пептид (Fender и др., *Nat Biotechnol*, 15, 52-56 (1997), Zhang и др., *Gene Ther*, 6, 171-181 (1999)) или разрушающий мембрану синтетический пептид (Wagner и др., *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 7934-7938 (1992), Plank и др., *J Biol Chem*, 269, 12918-12924 (1994)).

В ходе эндоцитозного захвата комплексы включаются во внутриклеточные везикулы, такие как эндосомы и лизосомы, где они подвергаются воздействию клеточного аппарата деградации. Таким образом, было установлено, что важным для эффективной функциональной доставки нуклеиновых кислот является условие, которое также играет значительную роль в развитии функциональной вирусной инфекции (Wagner и др., *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 7934-7938 (1992), Plank и др., *J Biol Chem*, 269, 12918-12924 (1994)). Для обеспечения эффективной доставки нуклеиновой кислоты в составе синтетических векторов имитировали механизмы, природа которых связана с развитием вирусной инфекции. В конечном итоге с большим успехом использовали амфифильные дестабилизирующие мембрану пептиды, такие как пептиды INF, GALA и KALA или меллитин или производные меллитина (Boeckle и др., *J Control Release*, 112, 240-248 (2006)), чтобы придать поликатионным реагентам для трансфекции функциональность исключения эндосомального захвата (Plank и др., *Adv Drug Deliv Rev*, 34, 21-35 (1998)). В случае липоплексов, такая функциональность обеспечивается способностью их липидных остатков сливаться с клеточными мембранами (Xu и Szoka, *Biochemistry*, 35, 5616-5623 (1996), Zelphati и Szoka, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 11493-11498 (1996)). В имеющем ключевое значение обзоре (Boussif и др., *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 7297-7301 (1995)) указано, что функциональность исключения эндосомального захвата полиплексов можно реализовать физико-химическими методами. При использовании полиэтиленимина (PEI) в качестве поликатиона для формирования полиплексов его буферная емкость в кислотных величинах pH является достаточной для исключения эндосомального захвата. Известно, что среда эндосомальных просветов подкисляется с помощью протонного насоса, находящегося в эндосомальных мембранах (Lafourcade и др., *PLoS One*, 3, e2758 (2008)). Такое подкисление позволяет исключить эндосомальный захват некоторым вирусам, таким как вирус гриппа или аденовирус. Так называемая теория протонной губки, которая подтверждена экспериментальными данными, описывает предполагаемое механическое действие полимеров, включающих особенности химической структуры PEI: значительная часть аминогрупп PEI находятся в непротонированной форме при нейтральном (физиологическом) значении pH ((Ziebarth и Wang, *Biomacromolecules*, 11, 29-38 (2010)). За счет протонированных и таким образом

положительно заряженных аминокрупп PEI-подобные полимеры могут связываться и уплотнять нуклеиновые кислоты. Непротонированные амины могут переходить в протонированную форму при кислотном значении pH и таким образом проявлять буферную емкость внутри эндосом. Эндосомальное подкисление с помощью протонного насоса происходит при накоплении хлоридных ионов (Sonawane и др., J Biol Chem, 278, 44826-44831 (2003)). В присутствии буферной молекулы, такой как PEI, в эндосомальном просвете протонный насос будет закачивать все больше протонов в эндосомальный просвет наряду с накоплением хлорида, как происходит в его отсутствие, до тех пор, пока величина pH не достигнет природного кислотного эндосомального значения.

Предполагается, что диспропорциональное накопление ионов в эндосомах приводит к осмотической дестабилизации везикул, что в конечном итоге приводит к разрыву везикул и высвобождению комплекса нуклеиновой кислоты в цитоплазму.

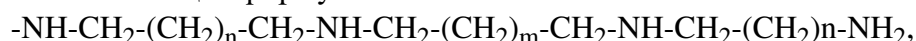
На основе теории протонной губки множество исследователей использовали структурные особенности PEI при создании новой библиотеки полимеров, включающих амины с буферной емкостью в кислотных значениях pH. В патентах US 7780957 и US 7829657, Kataoka и др., описаны полимеры на основе цепей полиглутаминовой кислоты или полиаспарагиновой кислоты, в которых боковые цепи карбоновой кислоты модифицированы боковыми аминокруппами, которые протонируются в кислотных значениях pH. Однако еще не изучена обширная структурная область олигоалкиленаминов, содержащих чередующиеся неидентичные звенья алкиленамина, в качестве повышающих трансфекцию фрагментов в поликатионах. Прежде всего такие фрагменты ранее не были изучены для трансфекции мРНК.

Наоборот, основное внимание в работе Kataoka и др. было направлено на поли{N-[N'-(2-аминоэтил)-2-аминоэтил]аспартамид}. В публикации Uchida и др. (J Am Chem Soc, 133, 15524-15532 (2011)) та же группа авторов исследовала серию N-замещенных полиаспартаминов, содержащих повторяющиеся звенья аминоэтилена в боковых цепях общей формулы $-(CH_2-CH_2-NH)_m-H$. Интересно отметить, что когда авторы исследовали эффективность семейства полимеров при трансфекции плазмидной ДНК, «наблюдался характерный четно-нечетный эффект повторяющихся звеньев аминоэтилена в боковой цепи полимера в отношении эффективности исключения эндосомального захвата и трансфекции в несколько клеточных линий. Полиплексы из полимеров с четным числом повторяющихся звеньев аминоэтилена (PA-Es) проявляют на порядок более высокую эффективность трансфекции без значительной цитотоксичности по сравнению с полимерами с нечетным числом повторяющихся звеньев аминоэтилена (PA-Os). Такой четно-нечетный эффект хорошо соответствует буферной емкости этих полимеров, а также их способности селективно разрушать целостность мембраны при эндосомальном значении pH, что приводит к высоко эффективному исключению эндосомального захвата для полиплексов PA-E. Более того, было показано, что формирование поливалентной заряженной матрицы с точным расстоянием между протонированными аминокруппами в боковой цепи полимера имеет значение для эффективного разрушения эндосомальной мембраны, тем самым способствуя транспорту полиплекса в цитоплазму» (реферат Uchida и др., J Am Chem Soc, 133, 15524-15532 (2011)). Интересно отметить, что когда та же самая группа исследователей сравнила производные поли(аспартамида), содержащего боковые цепи 1,2-диаминоэтана, [PAsp(DET)], с аналогами, содержащими боковые цепи 1,3-диаминопропана, [PAsp(DPT)], они наблюдали, что полиплексы PAsp(DET) характеризовались значительным снижением эффективности трансфекции плазмидной ДНК при высоких соотношениях N/P за счет прогрессивно повышающейся цитотоксичности наряду с соотношением N/P, даже несмотря на

пренебрежимо малое различие физико-химических свойств, то есть различие по размеру частиц и ζ -потенциалу по сравнению с полиплексами PAsp(DET) (Miyata и др., J Am Chem Soc, 130, 16287-16294 (2008)). Следовательно, согласно четно-нечетному правилу следует ожидать, что полимеры, содержащие 3 протонируемые аминогруппы и
 5 спейсерные группы пропилена, будут оказывать отрицательный эффект на свойства полиплексов PAsp(DET), а боковые цепи, содержащие 1,3-диаминопропан, будут связаны с проблемами цитотоксичности. Отсутствуют какие-либо данные о взаимосвязи структуры и активности таких полимеров в отношении трансфекции РНК.

В диссертации М. Krämer, "Polymeric Nanocarriers with Dendritic Core-Shell Architectures",
 10 Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br. (2004) описана трансфекция генов с использованием дендримерных частиц на основе PEI, которые могут быть модифицированы пропиленмином по концевым группам или формируя боковые цепи.

Geall с коллегами описывают холестерин-полиаминокарбаматы, содержащие остаток полиамина общей формулы:



где $m=0, 1$ или 2 и где $n=0$ или 1 (Geall и др., FEBS Lett, 459, 337-342 (1999)). Авторы исследовали величины pK_a этих веществ и их характеристики при конденсации с ДНК тимуса телят. Было установлено, что региохимическое распределение положительных зарядов в холестерин-полиаминокарбаматах играет значительную роль в модуляции
 20 аффинности связывания с ДНК и в эффективности липофекции. Авторами было также установлено, что среди исследованных холестерин-полиаминокарбаматов составляющий спермин фрагмент полиамина, $-NH-CH_2-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-$
 25 $CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$ (пропил/бутил/пропил), характеризуется наиболее высокой экспрессией репортерного гена в ходе трансфекции кодирующей бета-галактозидазы плазмидной ДНК в клеточную культуру, в то время как, например, $-NH-CH_2-CH_2-NH-$
 30 $CH_2-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-NH_2$ (этил/пропил/этил) характеризуется значительным снижением эффективности (от трех- до 10-кратного). Следовательно, с учетом информации, представленной в патенте Kataoka и др. (четно-нечетное правило) и результатов, описанных в статье Geall и др., специалисту в данной области представляется очевидным не использовать структуру последнего соединения для доставки нуклеиновой кислоты.

В статье Wang и др. описаны олигоамины, привитые на полиметилметакрилат, в качестве эффективных и низкотоксичных реагентов для трансфекции плазмидной ДНК
 35 (Wang и др., Molecular BioSystems, 6, 256-263 (2010)). Эти полимеры получали при аминолитическом расщеплении полиметилметакрилата олигоаминами общей формулы $H_2N-CH_2-CH_2-(NH-CH_2-CH_2)_m-NH_2$, где $m=1, 2$ или 3 . Авторами было установлено, что эффективность трансфекции повышается при увеличении длины цепи аминов.

В статье Ou и др. описаны поли(дисульфидоаминоамины), которые получали из олигоаминов с защищенными концевыми группами структуры Dde-NH-(CH₂)_a-NH-(CH₂)_b-NH-(CH₂)_a-NH-Dde, при сополимеризации с N,N'-цистаминбисакриламидом (Ou и др., Biomaterials 30, 5804-5814 (2009); WO 2010/065660). Авторами исследовали комбинации
 45 $a=2$ и $b=2$, $a=2$ и $b=3$, $a=3$ и $b=2$, $a=3$ и $b=3$, $a=3$ и $b=4$ (спермин). Dde означает защитную группу 2-ацетилдимедон. После удаления защитной группы в результате синтеза получают поли(дисульфидоаминоамины), где внутренние исходные вторичные амины превращаются в третичные амины в составе основной полимерной цепи, а концевые

амины входят в состав соседних боковых этиленовых или пропиленовых групп. Такие полимеры обладают буферной емкостью в интервале рН, приемлемом для доставки нуклеиновых кислот и применяются для трансфекции плазмидной ДНК в клетки.

Ранее впервые было описано применение нового класса липидоподобных, но не-
 5 липидных синтетических структур, так называемых липидоидов, для доставки нуклеиновых кислот *in vitro* и *in vivo* (US 8450298; Love и др., PNAS 107, 1864-1869 (2010); WO 2006/138380; Akinc и др., Nat Biotechnol 26, 561-569 (2008)). Липидоиды получают при взаимодействии содержащих амины соединений с алифатическими эпоксидами, акрилатами, акриламидами или альдегидами. Авторы/изобретатели предлагают
 10 синтетические методы для получения липидоидных библиотек и скрининга для выбора соединений, пригодных для осуществления доставки нуклеиновых кислот в клетки *in vitro*.

Как представляется очевидным из описанного выше, в прошлом было проведено множество исследований и разработок для доставки других молекул нуклеиновых
 15 кислот, таких как плазмидная ДНК, олигонуклеотиды, siРНК или аналоги нуклеиновых кислот. Доставка мРНК изучена лишь поверхностно. Некоторые авторы полагают, что соединения и составы, которые проявляют эффективность для доставки ДНК или siРНК, будут с такой же эффективностью способствовать доставке мРНК. Однако в отличие от плазмидной ДНК или siРНК, мРНК является одноцепочечной молекулой.
 20 Следовательно с учетом лишь структурных особенностей следует ожидать, что существуют другие требования для соединений и составов, предназначенных для доставки мРНК в отличие от доставки ДНК или siРНК.

В предшествующей литературе, цитированной выше, описана доставка двухцепочечных нуклеиновых кислот, таких как плазмидная ДНК или siРНК, в клетки,
 25 но не известно, можно ли использовать описанные способы и соединения для доставки одноцепочечных нуклеиновых кислот, таких как мРНК, в клетки. Следует отметить, что ранее наблюдали значительное различие трансфекции мРНК от трансфекции плазмидной ДНК в клетки (Bettinger и др., Nucleic Acids Res, 29,3882-91 (2001), Uzgün и др., Pharm Res, 28, 2223-32 (2011)).

В соответствии с этим, авторами настоящего изобретения было установлено, что при исследовании более 100 членов семейства полимеров, описанного в заявке WO 2011/15433, на их пригодность для доставки РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, в клетки не было найдено ни одного соединения, пригодного
 35 для трансфекции мРНК по механизму, который приводит к экспрессии гена, кодируемого матричной РНК (мРНК). И наоборот, все эти соединения проявляют эффективность в доставке плазмидной ДНК и/или siРНК. Следовательно, установленные правила для доставки двухцепочечных нуклеиновых кислот в клетки не применимы к одноцепочечной мРНК. В описание WO 2011/154331 включены химически определенные олигомеры, содержащие 2-60 звеньев олиго(алкиленамино)кислоты, которые соответствуют общей
 40 формуле $\text{HOOC-Z-R-NH-}[(\text{CH}_2)_b\text{-NH}]_a\text{-H}$, где Z означает серию метиленовых групп или ряд других группировок, R означает остаток метилена или карбоксигруппу, а *b* и *a* независимо друг от друга равны целому числу 1-7 или 2-7, соответственно. Олигомеры этого семейства включают протонируемые аминокислоты, способные оказывать эффект так называемой протонной губки, а также проявлять высокую активность в трансфекции
 45 плазмидной ДНК и siРНК *in vitro* и *in vivo*. Важно отметить, что в заявке WO 2011/154331 и связанных с этой темой научных публикациях очень подробно описан способ создания библиотек на основе последовательностей олигомеров/полимеров из структурных

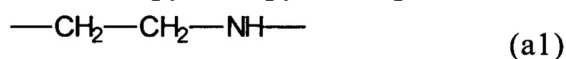
блоков, соответствующих общей формуле $\text{HOOC-Z-R-NH-}[(\text{CH}_2)_b\text{-NH}]_a\text{-H}$.

Техническая задача, лежащая в основе настоящего изобретения, заключалась в разработке композиции, пригодной для высокоэффективной доставки нуклеиновых кислот и прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, в клетку или ткань.

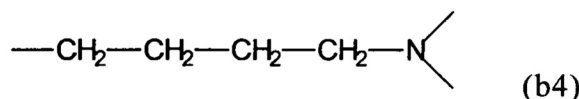
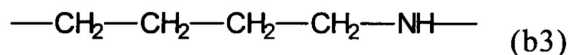
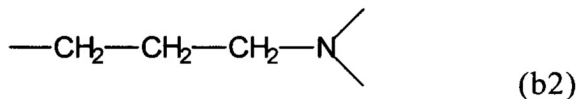
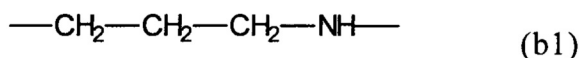
Эта задача осуществляется при разработке вариантов, определенных в формуле настоящего изобретения и подробно иллюстрированных в следующем общем описании и примерах.

Неожиданно было установлено, что сополимеры, содержащие статистически/хаотически расположенные чередующиеся звенья алкиленамина различной длины, в композициях для трансфекции клеток нуклеиновой кислотой, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, являются в значительной степени более эффективными, чем полимеры, содержащие аналогично расположенные повторяющиеся звенья алкиленамина неизменяющейся длины.

Таким образом в настоящем изобретении в первом объекте предлагается статистический сополимер, включающий множество повторяющихся звеньев (а), независимо друг от друга выбранных из следующих формул (a1) и (a2):



множество повторяющихся звеньев (b), независимо друг от друга выбранных из следующих формул (b1)-(b4):



где молярное соотношение суммы повторяющихся звеньев (а) и суммы повторяющихся звеньев (b) находится в интервале от 0,7:1,0 до 1,0:0,7,

где один или более атомов азота в повторяющихся звеньях (а) и/или (b), содержащихся в сополимере, могут протонироваться с образованием катионного сополимера.

В другом объекте настоящего изобретения предлагается композиция, включающая нуклеиновую кислоту, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечную РНК, такую как мРНК, и описанный выше сополимер.

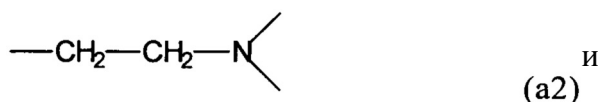
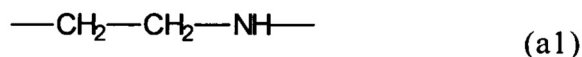
В других объектах настоящего изобретения предлагается фармацевтические композиции, включающие композиции по настоящему изобретению. В настоящем изобретении предлагаются также способы получения сополимеров по изобретению, а также композиций и фармацевтических композиций по изобретению.

В еще одних объектах предлагается применение композиции по изобретению или сополимера по изобретению для доставки нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, в клетку-мишень или ткань-мишень, а также предлагается способ доставки нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, в клетку, включающий

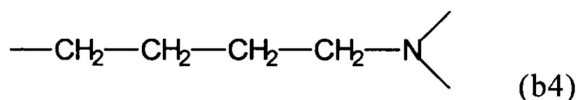
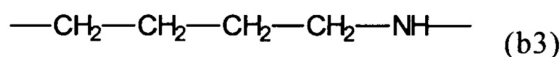
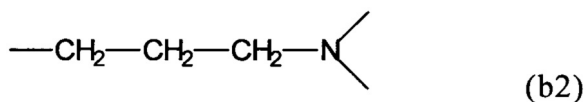
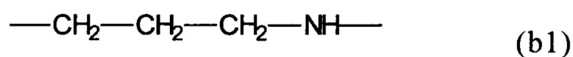
стадию приведения в контакт композиции по изобретению с клеткой.

Сополимеры по настоящему изобретению представляют собой комбинацию коротких повторяющихся звеньев (a) с более длинными повторяющимися звеньями (b) в форме статистического сополимера, прежде всего хаотический сополимер, и в определенных соотношениях. Было установлено, что такое распределение повторяющихся звеньев (a) и (b) обеспечивает неожиданные преимущества в отношении пригодности полученного сополимера в качестве носителя для доставки нуклеиновой кислоты, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, в клетку.

Как указано выше, сополимер по настоящему изобретению представляет собой статистический сополимер, включающий множество повторяющихся звеньев (a), независимо выбранных из повторяющихся звеньев следующих формул (a1) и (a2):



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



где молярное соотношение суммы повторяющихся звеньев (a) и суммы повторяющихся звеньев (b) находится в интервале от 0,7:1,0 до 1,0:0,7, и где один или более атомов азота в повторяющихся звеньях (a) и/или (b), содержащихся в сополимере, могут протонироваться с образованием катионного сополимера.

Сополимер представляет собой статистический сополимер, в котором любые повторяющиеся звенья (a) и любые повторяющиеся звенья (b) статистически распределены в макромолекуле сополимера. Такой сополимер обычно получают при полимеризации смеси мономеров, которые в ходе реакции полимеризации образуют повторяющиеся звенья (a), с мономерами, которые в ходе реакции полимеризации образуют повторяющиеся звенья (b). Предпочтительно сополимер представляет собой статистический сополимер, в котором любые повторяющиеся звенья (a) и любые повторяющиеся звенья (b) хаотично распределены в макромолекуле полимера.

Сополимер по настоящему изобретению может представлять собой линейный, разветвленный или дендритный сополимер. Специалисту в данной области техники следует понимать, что повторяющееся звено формулы (a1), (b1) или (b3) с двумя валентностями (то есть с двумя свободными связями к соседним повторяющимся звеньям) приводит к росту цепи сополимера с прямой цепью. Таким образом, линейный сополимер по настоящему изобретению включает повторяющиеся звенья формулы (a1) и повторяющиеся звенья одного или более типов формулы (b1) и (b3), но не содержит повторяющиеся звенья формулы (a2), (b2) или (b4). Следует также понимать, что присутствие повторяющегося звена формулы (a2), (b2) или (b4) с тремя валентностями обеспечивает точку разветвления в структуре сополимера. Таким образом,

разветвленный сополимер включает повторяющиеся звенья одного или более типа формул (a2), (b2) и (b4) и может дополнительно включать повторяющиеся звенья одного или более типа формул (a1), (b1) и (b3).

Сополимер по настоящему изобретению включает множество повторяющихся звеньев (a), независимо выбранных из повторяющихся звеньев формул (a1) и (a2), определенных выше, и множество повторяющихся звеньев (b), независимо выбранных из повторяющихся звеньев формул (b1)-(b4), определенных выше. Предпочтительны сополимеры, включающие множество повторяющихся звеньев (a), независимо выбранных из повторяющихся звеньев формул (a1) и (a2), определенных выше, и множество повторяющихся звеньев (b), независимо выбранных из повторяющихся звеньев формул (b1) и (b2), определенных выше.

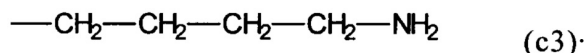
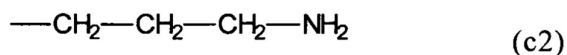
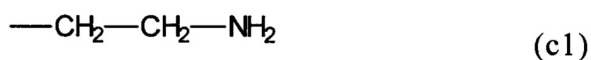
Предпочтительно также, что сополимер по настоящему изобретению представляет собой разветвленный сополимер, включающий повторяющиеся звенья одного или более типа, выбранных из повторяющихся звеньев (a2), (b2) и (b4), и который необязательно дополнительно включает повторяющиеся звенья одного или более типа формул (a1), (b1) и (b3), и прежде всего сополимер, который включает повторяющиеся звенья формулы (a2) и повторяющиеся звенья одного или более типа формул (b2) и (b4), а также необязательно дополнительно включает повторяющиеся звенья одного или более типа формул (a1), (b1) и (b3). В соответствии с указанным выше, наиболее предпочтительный сополимер, таким образом, представляет собой разветвленный сополимер, который включает повторяющиеся звенья формулы (a2) и повторяющиеся звенья формулы (b2), и который необязательно дополнительно включает повторяющиеся звенья одного или более типа формул (a1) и (b1).

Общее число повторяющихся звеньев (a) и повторяющихся звеньев (b) в сополимерах по настоящему изобретению обычно составляет 20 или более, предпочтительно 50 или более, или более предпочтительно 100 или более. Обычно общее число повторяющихся звеньев (a) и повторяющихся звеньев (b) составляет 5000 или менее, предпочтительно 2500 или менее, более предпочтительно 1000 или менее и прежде всего 500 или менее.

Более того, для сополимеров по настоящему изобретению предпочтительно, чтобы содержание повторяющихся звеньев (a) и (b) составляло 80 мол. % или более, более предпочтительно 90 мол. % или более от всех повторяющихся звеньев в сополимере. Кроме того, предпочтительны сополимеры, в которых содержание повторяющихся звеньев (a), выбранных из (a1) и (a2), и повторяющихся звеньев (b), выбранных из (b1) и (b2), составляет 80 мол. % или более, более предпочтительно 90 мол. % от всех повторяющихся звеньев в сополимере. Наиболее предпочтительно, чтобы все повторяющиеся звенья в сополимере представляли собой повторяющиеся звенья (a) или (b), прежде всего, чтобы все повторяющиеся звенья в сополимере представляли собой повторяющиеся звенья (a), выбранные из (a1) и (a2), или повторяющиеся звенья (b), выбранные из (b1) и (b2).

Среднемассовая молекулярная масса сополимера по настоящему изобретению по данным, например, эксклюзионной хроматографии по сравнению с линейными полиэтиленоксидами в качестве стандартов, в основном находится в интервале от 1000 до 50000 Да, предпочтительно от 2000 до 250000 Да и более предпочтительно 5000-50000 Да.

Концевые группы сополимера по настоящему изобретению обычно включают группы (c) одного или более типа, независимо выбранные из групп формул (c1)-(c3), предпочтительно из групп формул (c1) и (c2), указанных ниже:



Предпочтительно концевые группы в составе сополимера состоят из групп (с) одного или более типа, независимо выбранных из групп формул (с1)-(с3), указанных ниже, предпочтительно из групп формул (с1) и (с2). Специалисту в данной области техники представляется очевидным, что число концевых групп зависит от структуры сополимера по настоящему изобретению. В то время как линейный сополимер содержит только две концевые группы, в разветвленном, прежде всего дендритном сополимере, содержится большее число концевых групп. Кроме того, представляется очевидным, что один или более атомов азота в концевых группах (с), содержащихся в сополимере, могут протонироваться с образованием катионного сополимера.

В сополимере по настоящему изобретению молярное соотношение суммы повторяющихся звеньев (а) и суммы повторяющихся звеньев (b) находится в интервале от 0,7:1,0 до 1,0:0,7, и предпочтительно 0,8:1,0 до 1,0:0,8. Указанное молярное соотношение можно определить, например, методом ЯМР. Таким образом, следует понимать, что соотношение обычно определяют для множества макромолекул сополимера по настоящему изобретению, и обычно это соотношение означает общее соотношение суммы повторяющихся звеньев (а) и суммы повторяющихся звеньев (b) во множестве макромолекул.

Как указано выше, один или более атомов азота в сополимере по настоящему изобретению может протонироваться с образованием сополимера в катионной форме, обычно в олигокатионной или поликатионной форме. Следует понимать, что первичные, вторичные или третичные аминогруппы в составе повторяющихся звеньев (а) или (b) или в составе концевых групп (с) могут действовать в качестве акцепторов протонов, особенно в воде и водных растворах, включая физиологические жидкости. Таким образом, сополимеры по настоящему изобретению обычно содержат общий положительный заряд в водном растворе при рН ниже 7,5. Водный раствор, как указано в данном контексте, представляет собой раствор, в котором растворитель составляет 50 об./об. % или более, предпочтительно 80 или 90% или более, и наиболее предпочтительно 100% воды. А также, если композиции по настоящему изобретению контактируют с физиологической жидкостью при рН ниже 7,5, включая, например, кровь и бронхоальвеолярный секрет жидкость, они обычно содержат повторяющиеся звенья (а) и (b), где атомы азота являются протонированными. Величины pK_a сополимеров, использованных в композициях по настоящему изобретению, можно определить методом кислотно-основного титрования с использованием автоматического pK_a -титратора. Затем общий заряд при данной величине рН можно рассчитать, например, с использованием уравнения Гендерсона-Гассельбаха. Любой заряд может быть распределен по нескольким основным центрам, и нет необходимости приписывать его к единственной точке. Обычно в растворах при физиологической величине рН сополимеры по настоящему изобретению включают повторяющиеся звенья с аминогруппами в протонированном состоянии и повторяющиеся звенья с аминогруппами в непротонированном состоянии.

Однако как представляется очевидным специалисту в данной области техники, сополимеры по настоящему изобретению, как и композиции по настоящему изобретению можно также получить в форме сухой соли, которая содержит сополимер в катионной

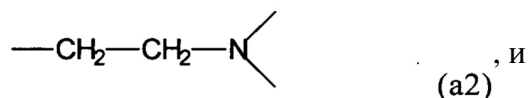
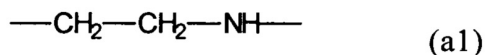
форме.

Кроме того, следует понимать, что противоионы (анионы) для положительных зарядов протонированных аминогрупп в композициях по настоящему изобретению, включающих сополимер и нуклеиновую кислоту, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечную РНК, такую как мРНК, обычно обеспечиваются анионными фрагментами, содержащимися в нуклеиновой кислоте. Если положительно заряженные группы присутствуют в избытке по сравнению с анионными фрагментами в нуклеиновой кислоте, то положительные заряды могут быть уравновешены другими анионами, прежде всего анионами, обычно присутствующими в физиологических жидкостях, такими как Cl^- или HCO_3^- .

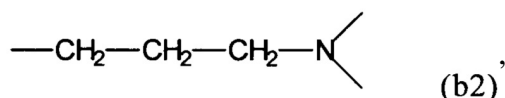
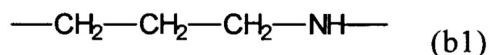
В соответствии с указанным выше, предпочтительный сополимер по настоящему изобретению представляет собой статистический сополимер, где

80 мол. % или более всех повторяющихся звеньев, более предпочтительно все повторяющиеся звенья, сформированы

из множества повторяющихся звеньев (а), независимо выбранных из повторяющихся звеньев следующих формул (a1) и (a2):

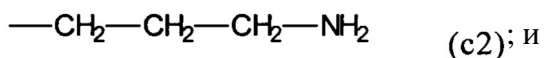
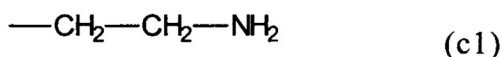


из множества повторяющихся звеньев (b), независимо выбранных из повторяющихся звеньев следующих формул (b1) и (b2):



где молярное соотношение суммы повторяющихся звеньев (а) и суммы повторяющихся звеньев (b) находится в интервале от 0,7:1,0 до 1,0:0,7, и предпочтительно от 0,8:1,0 до 1,0:0,8,

где концевые группы сополимера сформированы из групп (с), независимо выбранных из групп формул (c1) и (c2):



где атомы азота в составе повторяющихся звеньев (а) и/или (b) и/или концевых групп (с), содержащихся в сополимере, могут протонироваться с образованием катионного сополимера. Более того, предпочтительно сополимер представляет собой разветвленный сополимер, включающий звенья (a2) и (b2), необязательно вместе со звеньями (a1) и/или (b1).

Сополимеры по настоящему изобретению можно получать стандартным способом, аналогичным известным методикам для получения полиалкилениминов, таких как разветвленный или линейный полиэтиленимин (PEI). Следует понимать, что мономеры, используемые для получения сополимеров, можно соответственно подбирать. В настоящем изобретении было установлено, что мономеры обычно могут вступать в реакцию в количественном соотношении, например, соотношение звеньев (а) и (b) в сополимере можно регулировать, соответственно подбирая соотношение мономеров в смеси мономеров, которую подвергают полимеризации. В то время как

полиэтиленимин, так называемый полиазиридин, можно получать, например, в ходе полимеризации с раскрытием кольца азиридина, сополимеры по настоящему изобретению можно получить в ходе полимеризации с раскрытием кольца смеси мономеров, включающей азиридин, азетидин или состоящей из азиридина, азетидина, и в применимых случаях пирролидин, или в предпочтительном варианте азиридин и азетидин. Следует понимать, что выражение «в применимых случаях» относится к присутствию или отсутствию повторяющихся звеньев (b3) и (b4) или концевых групп (c3), которые могут быть сформированы пирролидином.

Линейные сополимеры по настоящему изобретению можно получить, например, при полимеризации пригодных N-замещенных азиридинов, N-замещенных азетидинов и N-замещенных пирролидинов или N-замещенных азиридинов и N-замещенных азетидинов, после которой можно проводить, например, гидролитическое отщепление N-заместителей, присоединенных к цепи полученного полиалкиленимина, например, по методике, аналогично описанной в статье Katrien F. Weyts, Eric J. Goethals, New synthesis of linear polyethyleneimine, Polymer Bulletin, Volume 19, Issue 1, pp 13-19 (January 1988).

Для получения дендримера (или дендритного сополимера) можно использовать стратегии синтеза, аналогичные известным методикам для получения дендримеров полиэтиленимина или полипропиленамина. Дендримеры полипропиленамина можно синтезировать из структурных блоков акрилонитрила с использованием повторяющейся последовательности по реакции присоединения Михаэля к первичному амину с последующим гетерогенно-каталитическим гидрированием (Newkome и Shreine, Poly (amidoamine), polypropylenimine, and related dendrimers and dendrons possessing different 1→2 branching motifs: An overview of the divergent procedures. Polymer 49 1-173 (2008); De Brabander-Van Den Berg и др., Large-scale production of polypropylenimine dendrimers, Macromolecular Symposia 77 (1) 51-62 (1994)). Дендримеры полиэтиленимина можно получить из структурных блоков винилбромид с использованием повторяющейся последовательности по реакции присоединения Михаэля к первичному амину с последующим превращением алкилбромид в амин в условиях синтеза аминов по Габриэлю (Yemul & Imae, Synthesis and characterization of poly(ethyleneimine) dendrimers, Colloid Polym Sci 286: 747-752 (2008)). Следовательно, специалист в данной области техники может получить не только дендримеры со строго чередующимися слоями, например, пропиленамина и этиленамина. Можно получить аналогичные поколения дендримеров со слоями, включающими статистические композиции повторяющихся звеньев формул (a2), (b2) и (b4) и предпочтительно повторяющихся звеньев формул (a2) и (b2), или состоящие из них.

Полимеризацию с раскрытием кольца азиридина и азетидина или азиридина, азетидина и пирролидина можно проводить в растворе, например, в воде. Общая концентрация мономеров особо не ограничена и типичные концентрации находятся в интервале от 10 мас. % до 80 мас. %, предпочтительно от 30 мас. % до 60 мас. %. Обычно полимеризацию инициируют протонами, например, предпочтительно в реакционную систему добавляют кислоту Бренстеда, прежде всего неорганическую кислоту, такую как серная кислота. Обычно достаточными являются малые количества кислоты, такие как от 0,001 до 0,01 эквивалентов в расчете на общую концентрацию мономеров. Реакция происходит при обычных скоростях, например, при температуре в интервале от 50°C до 150°C, прежде всего от 90°C до 140°C. В этих интервалах, обычно при более высоких температурах, образуются высокомолекулярные сополимеры, а при более низких температурах образуются низкомолекулярные сополимеры. Нуклеиновая кислота

Как указано выше, основным объектом настоящего изобретения является композиция, включающая нуклеиновую кислоту, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечную РНК, такую как мРНК, а также сополимер по настоящему изобретению.

5 Термин «нуклеиновая кислота» означает все формы существующих в природе типов нуклеиновой кислоты, а также химически и/или ферментативно синтезированных нуклеиновых кислот и также включает аналоги нуклеиновой кислоты и производные нуклеиновой кислоты, такие как, например, запертые нуклеиновые кислоты (LNA),
 10 пептидные нуклеиновые кислоты (PNA), тиофосфаты и фосфотриэфиры олигонуклеозидов, морфолино-олигонуклеотиды, катионные олигонуклеотиды (US 6017700 A, WO/2007/069092), замещенные рибо-олигонуклеотиды или тиофосфаты. Более того, термин «нуклеиновая кислота» также означает любую молекулу, которая включает аналоги нуклеотидов или нуклеозидов. Не существует никаких ограничений в отношении последовательности или размера нуклеиновой кислоты, включенной в
 15 композицию по настоящему изобретению. Нуклеиновая кислота предпочтительно определяется биологическим действием, которое предполагается оказывать на биологическую мишень композицией по настоящему изобретению, доставленной к этой мишени. Например, в случае применения генной терапии или терапии с использованием нуклеиновых кислот, нуклеиновая кислота или последовательность
 20 нуклеиновой кислоты можно определить геном или фрагментом гена, который предполагается экспрессировать или ингибировать, исключить (нокдаун) или снизить его количество за счет преднамеренного замещения или репарации дефектного гена или любой последовательности гена-мишени или последовательности-мишени гена.

Предпочтительно термин «нуклеиновая кислота» относится к олигонуклеотидам
 25 или полинуклеотидам, включая дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) и рибонуклеиновую кислоту (РНК). В принципе, что касается РНК, в контексте настоящего изобретения можно использовать любой тип РНК. В одном варианте осуществления настоящего изобретения РНК представляет собой одноцепочечную РНК. Термин «одноцепочечная РНК» означает единственную непрерывную цепь
 30 рибонуклеотидов в отличие от молекул РНК, в которых две или более отдельных цепей образуют двухцепочечную молекулу за счет гибридизации отдельных цепей. Термин «одноцепочечная РНК» не исключает того, что в одноцепочечной молекуле (самой по себе) формируются двухцепочечные структуры, такие как петли, вторичные или третичные структуры.

35 Термин «РНК» включает также РНК, которая кодирует аминокислотную последовательность, а также РНК, которая не кодирует аминокислотную последовательность. Полагают, что более 80% генома содержит функциональные элементы ДНК, которые не кодируют белки. Эти некодирующие последовательности включают регуляторные элементы ДНК (связывающие сайты для транскрипционных
 40 факторов, регуляторов и корегуляторов и т.п.), а также последовательности, кодирующие транскрипты, которые никогда не транслируются в белки. Эти транскрипты, которые кодируются геномом и транскрибируются в РНК, но не транслируются в белки, называются некодирующими РНК (ncРНК). Таким образом, в одном варианте осуществления настоящего изобретения РНК представляет собой некодирующую РНК.
 45 Предпочтительно некодирующая РНК представляет собой одноцепочечную молекулу. Исследования показали, что ncРНК играют ведущую роль в регуляции генов, поддержании целостности генома, дифференциации и росте клеток, и эти ncРНК являются разрегулированными при различных заболеваниях человека. Существуют

различные типы ncРНК: короткие (20-50 нуклеотидов), средние (50-200 нуклеотидов) и длинные >200 нуклеотидов) ncРНК. Короткие ncРНК включают микроРНК (miРНК), малую интерферирующую РНК (siРНК), piwi-РНК (piРНК) и иницирующие транскрипцию РНК (tiРНК). Примеры средних ncРНК включают малые ядерные РНК (snРНК), малые ядрышковые РНК (snoРНК), транспортные РНК (tРНК), ассоциированные с сайтом инициации транскрипции РНК (TTSaРНК), ассоциированные с промотором малые РНК (PASR) и расположенные перед промотором транскрипты (PROMPT). Длинные некодирующие РНК (lncРНК) включают длинные межгенные некодирующие РНК (lincРНК), антисмысловые-lincРНК, интронная lncРНК, транскрибируемые ультраконсервативные РНК (T-UCR) и другие ((Bhan A, Mandal SS, ChemMedChem. doi: 10.1002/cmdc.201300534 (2014 Mar 26)). Среди перечисленных выше некодирующих РНК только siРНК является двухцепочечной. Таким образом, так как в предпочтительном варианте некодирующая РНК является одноцепочечной, предпочтительно некодирующая РНК не является siРНК. В другом варианте РНК является кодирующей РНК, то есть РНК кодирует аминокислотную последовательность. Такие молекулы РНК также называются мРНК (матричные РНК) и являются одноцепочечными. Нуклеиновые кислоты можно получить методами химического или ферментативного синтеза, известными специалисту в данной области техники или с использованием рекомбинантной технологии, или их можно выделить из природных источников или их комбинацией. Олиго- или полинуклеотиды необязательно могут включать неприродные нуклеотиды и могут являться одно-, двух- или трехцепочечными. Термин «нуклеиновая кислота» означает также смысловые и антисмысловые олиго- или полинуклеотиды, то есть нуклеотидную последовательность, которая комплементарна специфической нуклеотидной последовательности в ДНК и/или РНК.

Предпочтительно термин «нуклеиновая кислота» в контексте настоящего изобретения относится к РНК, более предпочтительно к одноцепочечной РНК, прежде всего к мРНК и наиболее предпочтительно к модифицированной мРНК.

Матричные РНК (мРНК) являются сополимерами, которые состоят из структурных блоков нуклеозидфосфатов, в основном включающих в качестве нуклеозидов аденозин, цитидин, уридин и гуанозин, которые в качестве промежуточных носителей переносят генетическую информацию из ДНК в клеточных ядрах в цитоплазму, где они считываются с образованием белков. Таким образом, они являются пригодными в качестве альтернативы для экспрессии генов.

В контексте настоящего изобретения следует понимать, что мРНК означает любую молекулу полирибонуклеотида, которая при попадании в клетку является пригодной для экспрессии белка или его фрагмента или является транслируемой в белок или его фрагмент. Термин «белок» включает любой тип аминокислотной последовательности, то есть цепей двух или более аминокислот, которые связаны друг с другом пептидными связями, а также включают пептиды и гибридные белки.

мРНК содержит рибонуклеотидную последовательность, которая кодирует белок или его фрагмент, функция которого в клетке или в ее окружении является необходимой или благоприятной, например, белок, отсутствие или дефектная форма которого приводит к развитию заболевания или болезни, присутствие которого может снизить интенсивность симптомов или предотвратить заболевание или болезнь, или белок, который может ускорить процесс, благоприятный для организма, в клетке или в ее окружении. мРНК может содержать последовательность целого белка или его функционального варианта. Более того, рибонуклеотидная последовательность может кодировать белок, который действует в качестве фактора, индуктора, регулятора,

стимулятора или фермента или его функционального фрагмента, при этом этот белок представляет собой белок, функция которого является необходимой для излечения нарушения, прежде всего метаболического нарушения или для индукции процессов *in vivo*, таких как формирование новых кровеносных сосудов, тканей и т.п. В данном случае термин «функциональный вариант» означает фрагмент, который в клетке может проявлять функцию белка, функция которого в клетке является необходимой, или его отсутствие или дефектная форма являются патогенными. Кроме того, мРНК может содержать другие функциональные области и/или 3'- или 5'-некодирующие области. 3'-и/или 5'-некодирующие области могут представлять собой области, естественно фланкирующие белок-кодирующую последовательность или искусственные последовательности, которые вносят вклад в стабилизацию РНК. Специалист в данной области техники при проведении стандартных экспериментов в каждом случае может определить последовательности, пригодные для такой функции.

В предпочтительном варианте мРНК содержит гэп m7GpppG, участок внутренней посадки рибосомы (IRES) и/или поли А фрагмент на 3'-конце, прежде всего для улучшения трансляции, мРНК может содержать другие области, ускоряющие трансляцию.

В предпочтительном варианте мРНК представляет собой мРНК, которая содержит комбинацию модифицированных и немодифицированных нуклеотидов. Предпочтительно она представляет собой мРНК, содержащую комбинацию модифицированных и немодифицированных нуклеотидов, как описано в WO 2011/012316. В этой заявке указано, что описанная там мРНК проявляет повышенную стабильность и сниженную иммуногенность. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения в такой модифицированной мРНК от 5 до 50% цитидиновых нуклеотидов и от 5 до 50% уридиновых нуклеотидов являются модифицированными. Содержащие аденозин и гуанозин нуклеотиды могут быть немодифицированными. Аденозиновые и гуанозиновые нуклеотиды могут быть немодифицированными или частично модифицированными, и они предпочтительно присутствуют в немодифицированной форме. Предпочтительно от 10 до 35% цитидиновых и уридиновых нуклеотидов являются модифицированными и прежде всего предпочтительно содержание модифицированных цитидиновых нуклеотидов находится в интервале от 7,5 до 25%, а содержание модифицированных уридиновых нуклеотидов находится в интервале от 7,5 до 25%. Было установлено, что, действительно, относительно низкое содержание, например, только 10% каждого из модифицированных цитидиновых и уридиновых нуклеотидов может обеспечить требуемые свойства. Прежде всего предпочтительно, чтобы модифицированные цитидиновые нуклеотиды представляют собой остатки 5-метилцитидина, а модифицированные уридиновые нуклеотиды представляют собой остатки 2-тиоуридина. Наиболее предпочтительно содержанием модифицированных цитидиновых нуклеотидов и содержанием модифицированных уридиновых нуклеотидов составляет 25%, соответственно.

В другом предпочтительном варианте мРНК можно комбинировать с связывающимися с мишенью участками, последовательностями-мишенями и/или участками, связывающимися с микроРНК, чтобы обеспечить активность требуемой мРНК только в определенных клетках. В другом предпочтительном варианте мРНК можно комбинировать с 3'-полиА-фрагмент-вышележащими микроРНК или короткой шпилечной РНК (shРНК).

Более того, термин «нуклеиновая кислота(ты)» относится к ДНК или РНК или их гибридным препаратам или любым их модификациям, которые известны в

предшествующем уровне техники (US 8278036, WO 2013/052523, WO 2011/012316, US 5525711, US 4711955, US 5792608 или EP 302175, (Lorenz и др., Bioorg Med Chem Lett, 14, 4975-4977 (2004); Soutschek и др., Nature, 432, 173-178 (2004)). Такая(ие) молекула(лы) нуклеиновых кислот могут представлять собой одноцепочечные или двухцепочечные, линейные или циклические, природные или синтетические нуклеиновые кислоты без ограничения по размеру. Например, молекула(лы) нуклеиновой кислоты могут представлять собой геномную ДНК, сДНК, мРНК, антисмысловую РНК, рибозим или малые интерферирующие РНК (siRNA), микроРНК, антагомиры, или короткие шпилечные РНК (shRNA), тРНК или длинные двухцепочечные РНК или конструкт ДНК, кодирующий такие РНК или химеропласты (Colestraus и др., Science, 273, 1386-1389 (1996)), или аптамеры, короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами ("CRISPR" для РНК-управляемого сайт-специфичного расщепления ДНК) (Cong и др., Science, 339, 819-823 (2013)), или РНК и ДНК. Указанная(ые) молекула(лы) нуклеиновых кислот могут присутствовать в форме плазмид, космид, искусственных хромосом, вирусных ДНК и РНК, ДНК бактериофагов, кодирующих и не кодирующих одноцепочечные (мРНК) или двухцепочечные РНК и олигонуклеотид(ды), которые включают любые известные в предшествующем уровне техники модификации в углеводной цепи и/или в основаниях, как описано выше, и 3'- или 5'-модификации. В прежде всего предпочтительном варианте нуклеиновая кислота представляет собой РНК, более предпочтительно мРНК или siРНК.

Нуклеиновая(вые) кислота(ты) могут содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, который предназначен для экспрессии в клетке-мишени. Для конструирования рекомбинантных молекул нуклеиновой кислоты можно использовать известные специалистам в данной области техники методы, см., например, методы, описанные в учебниках Sambrook и др., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (2001) N.Y. и Ausubel и др., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989).

В предпочтительном варианте указанная нуклеиновая кислота представляет собой терапевтически или фармацевтически активную нуклеиновую кислоту, включая все типы и модификации нуклеиновых кислот, перечисленные выше, и известные специалистам в предшествующем уровне техники, которые могут оказывать терапевтический или профилактический эффект. В основном терапевтические или профилактические эффекты могут достигаться при взаимодействии нуклеиновой кислоты с клеточными молекулами и органеллами. Такое взаимодействие само по себе может, например, активировать врожденную иммунную систему, как в случае определенных CpG олигонуклеотидов, и последовательностей, созданных для специфичного взаимодействия с toll-подобными и другими вне- или внутриклеточными рецепторами. Более того, подразумевается, что захват нуклеиновых кислот в клетке или их введение в клетку приведет к экспрессии нуклеотидных последовательностей, таких как гены, включенные в нуклеиновую кислоту, а также к регуляции с понижением, подавлению или выключению (нокдаун) экспрессии эндогенного гена, которая происходит в результате внутриклеточного присутствия введенной экзогенной нуклеиновой кислоты, или приведет к модификации последовательностей эндогенной нуклеиновой кислоты, такой как репарация, вырезание или обмен выбранных оснований или целых фрагментов последовательностей эндогенных нуклеиновых кислот, или приведет к интерференции практически с любым клеточным процессом, который происходит в результате внутриклеточного присутствия и взаимодействия введенной экзогенной нуклеиновой кислоты. Предполагается, что сверхэкспрессия введенных

экзогенных нуклеиновых кислот компенсирует или дополнит экспрессию эндогенного гена, прежде всего в случаях, когда эндогенный ген является дефектным или подавленным, что приводит к образованию недостаточного или дефектного или дисфункционального продукта экспрессии гена, как, например, в случае многих метаболических и наследственных заболеваний, таких как, например, кистозный фиброз, гемофилия или мышечная дистрофия. Предполагается также, что сверхэкспрессия введенных нуклеиновых кислот приведет к взаимодействию или интерференции продукта экспрессии с эндогенным клеточным процессом, таким как регуляция генной экспрессии, передача сигнала и другие процессы в клетке. Предполагается также, что сверхэкспрессия введенных экзогенных нуклеиновых кислот приведет к развитию иммунного ответа в организме, в котором присутствует трансфектированная или трансдуцированная клетка или который приспособлен для присутствия таких клеток. Примеры включают генетическую модификацию антиген-презентирующих клеток, таких как дендритные клетки, чтобы индуцировать в них презентацию антигена с целью вакцинации. Другие примеры включают сверхэкспрессию цитокинов в опухолях, чтобы индуцировать опухолеспецифичный иммунный ответ. Кроме того, предполагается, что сверхэкспрессия введенных экзогенных нуклеиновых кислот может генерировать временно генетически модифицированные клетки *in vivo* или *ex vivo* для клеточной терапии, такие как модифицированные Т-клетки или клетки-предшественники или стволовые клетки или другие клетки для регенеративной медицины.

Регуляцию с понижением, подавление или выключение экспрессии эндогенного гена для терапевтических целей можно обеспечить, например, с использованием интерференции РНК (РНКi), рибозимов, антисмысловых олигонуклеотидов тРНК, длинных двухцепочечных РНК, когда такая регуляция с понижением активности может быть последовательность-специфичной или неспецифичной и может привести к гибели клеток, как в случае введения в клетки длинных двухцепочечных РНК. Регуляцию с понижением, подавление или выключение экспрессии эндогенного или предварительно существующего гена можно использовать при лечении приобретенных, наследственных или спонтанно возникающих заболеваний, включая вирусные инфекции и рак.

Предусматривается также, что введение нуклеиновых кислот в клетки можно использовать на практике в качестве профилактических мер для предотвращения, например, вирусной инфекции или новообразований. Регуляция с понижением, подавление или выключение экспрессии эндогенного гена можно также осуществлять на транскрипционном уровне и на трансляционном уровне. Специалисту в данной области техники известно множество механизмов, которые, например, включают эпигенетические модификации, изменения в структуре хроматина, селективное связывание факторов транскрипции с использованием введенной нуклеиновой кислоты, гибридизацию введенной нуклеиновой кислоты с комплементарными последовательностями в геномной ДНК, мРНК или в других типах РНК при спаривании оснований, включая нестандартные механизмы спаривания оснований, такие как образование тройной спирали. Аналогичным образом, репарацию генов, изменение оснований и последовательности можно осуществлять на геномном уровне и на уровне мРНК, включая пропуск/перепрыгивание экзонов. Изменение оснований и последовательности можно осуществлять, например, с использованием РНК-управляемого сайт-специфичного расщепления ДНК, механизмов «вырезания-вставки» с использованием транс-сплайсинга, транс-сплайсинга рибозимов, химерапластов, сплайсосома-опосредованного транс-сплайсинга РНК, или с использованием интронов группы II или ретаргетинговых интронов или с использованием инсерционного

мутагенеза, опосредованного вирусами, или с использованием направленной геномной вставки с использованием прокариотических, эукариотических или вирусных систем интегразы. Так как нуклеиновые кислоты являются носителями структурных схем живых систем и так как они прямым или косвенным способом принимают участие во многих клеточных процессах, теоретически на любой клеточный процесс можно оказывать действие при введении нуклеиновых кислот в клетки извне. Следует отметить, что такое введение можно осуществлять напрямую *in vivo* и *ex vivo* в культуру клеток или органа с последующей трансплантацией таких модифицированных органов или клеток реципиенту. Комплексы по настоящему изобретению с нуклеиновыми кислотами можно использовать в качестве активных агентов для всех описанных выше целей.

Композиция

Как было описано выше, композиция по настоящему изобретению включает нуклеиновую кислоту, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечную РНК, такую как мРНК, и сополимер по настоящему изобретению.

Изобретение включает также композицию, которая состоит из нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно из одноцепочечной РНК, такой как мРНК, и сополимера по настоящему изобретению. Однако композиция может также включать другие компоненты, например, компоненты для липидного состава и/или компоненты, которые проявляют эффекторную функцию в ходе доставки нуклеиновой кислоты к клетке или в клетку. Обычно общая масса нуклеиновой кислоты и сополимера согласно настоящему изобретению составляет 50 мас. % или более, предпочтительно 70 мас. % или более в расчете на общую массу композиции.

Следует понимать, что композиции по настоящему изобретению в основном обеспечивают ассоциацию нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, с сополимером и необязательно с другими компонентами, которые ассоциированы в конечную структуру, достаточно стабильную для поддержания ассоциации значительной части указанных компонентов до достижения биологической мишени или окружения биологической мишени в процессе применения, например, по мере прохождения требуемого пути доставки нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК.

Благодаря присутствию протонируемых аминогрупп в сополимере по настоящему изобретению, этот сополимер может содержать катионные заряды в повторяющихся звеньях формулы (a) и/или (b), и таким образом сополимер образует катион, обычно олиго- или поликатион, содержащий множество катионных фрагментов, в присутствии протонов, например, в воде или водных растворах, или в присутствии протонодонорной кислоты. Таким образом, предпочтительно композиция по настоящему изобретению содержит комплекс нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, и сополимера по настоящему изобретению, который представляет собой катионный сополимер, или состоит из них. Следует понимать, что в таком комплексе катионный сополимер и анионная нуклеиновая кислота связаны в основном за счет электростатического взаимодействия. Однако в стабилизации комплекса могут также принимать участие другие типы взаимодействия, включая водородные связи и ковалентные связи.

В композициях по настоящему изобретению сополимер и нуклеиновая кислота, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечная РНК, такая как мРНК, обычно содержатся в массовом соотношении сополимер/нуклеиновая кислота от 0,25:1 до 50:1, предпочтительно от 0,5:1 до 30:1, более предпочтительно от 1:1 до 20:1.

Более предпочтительно в случаях, когда композиция содержит комплекс нуклеиновой

кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, и катионного сополимера по настоящему изобретению, относительные соотношения сополимера и нуклеиновой кислоты в композициях по настоящему изобретению можно выбирать с учетом степени взаимной нейтрализации заряда. В случае доставки нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, в виде комплексов нуклеиновой кислоты с катионным сополимером, в основном определенное количество катионного сополимера смешивают с данным количеством нуклеиновой кислоты, что приводит по крайней мере к нейтрализации отрицательных зарядов нуклеиновой кислоты, предпочтительно к сверхкомпенсации отрицательных зарядов нуклеиновой кислоты.

Пригодные соотношения катионного сополимера и нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, можно легко определить с использованием методов анализа на замедление подвижности в геле, гашения флуоресценции, такими как методы вытеснения/гашения этидий бромидом, по данным измерения размера частиц и зета-потенциала. Пригодные соотношения сополимера и нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, обычно характеризуют по крайней мере по частичному замедлению, предпочтительно по полному замедлению нуклеиновой кислоты, включенной в комплекс с катионным сополимером, в ходе электрофореза в агарозном геле, а также по высокой степени гашения флуоресценции красителей, таких как этидий бромид, RiboGreen или YOYO, при интеркаляции в нуклеиновые кислоты или при образовании наночастиц после смешивания сополимера и нуклеиновой кислоты.

В случае композиций, содержащих четко охарактеризованные катионные сополимеры по настоящему изобретению, рассчитанное соотношение N/P является пригодным фактором для выбора и определения относительных соотношений сополимера и нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК. Соотношение N/P означает молярное соотношение протонируемых атомов азота в повторяющихся звеньях (a) и (b) сополимера по настоящему изобретению и фосфатных групп в нуклеиновой кислоте в составе композиции по настоящему изобретению. Соотношение N/P является установленным параметром для характеристики таких комплексов нуклеиновой кислоты с катионными носителями. Специалисту в данной области техники представляется очевидным, что атомы азота в аминогруппах, которые соединяют повторяющиеся звенья (a) и (b) с соседними повторяющимися звеньями, и в концевых аминогруппах, рассматриваются как протонируемые атомы азота. С другой стороны атомы азота в амидных связях (которые в основном отсутствуют в сополимерах по настоящему изобретению) не относятся к протонируемым атомам азота. В случае композиций, содержащих катионный сополимер по настоящему изобретению сополимера и нуклеиновую кислоту, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечную РНК, такую как мРНК, соотношение N/P обычно рассчитывают по формуле:

$$\frac{N}{P} = \frac{w_p \times n}{M_{wp}} \div \frac{w_{na}}{M_{base}}$$

где w_p означает массу сополимера в граммах, n равен числу протонируемых аминогрупп в повторяющемся звене, M_{wp} равно средней молекулярной массе повторяющихся звеньев (a) and (b), содержащихся в сополимере, w_{na} означает массу нуклеиновой кислоты в граммах, а M_{base} означает среднюю молекулярную массу нуклеотида в нуклеиновой кислоте, например, 346 г/моль в случае РНК.

Главным образом, для сополимеров по настоящему изобретению n равен 1. M_{wp} можно рассчитать на основании соотношения полимеризованных повторяющихся звеньев, например, с использованием метода ЯМР, и их соответствующих молекулярных масс. Например, для разветвленного сополимера, содержащего полимеризованные звенья (a2) и (b2) с молекулярными массами 42 г/моль (a2) и 56 г/моль (b2), соответственно, в молярном соотношении (a)/(b) 0,9:1,0, величину M_{wp} рассчитывают по формуле:

$$M_{wp} = \frac{0.9 \times 42 + 1.0 \times 56}{(0.9 + 1.0)} = 49.4$$

В случае бинарных комплексов по настоящему изобретению, состоящих из сополимера по настоящему изобретению и нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, предпочтительно следует использовать такие количества сополимера относительно нуклеиновой кислоты, которые обеспечивают соотношение N/P, которые в свою очередь обеспечивает положительный зэта потенциал конечной бинарной композиции. Согласно настоящему изобретению, для бинарных композиций по изобретению предпочтительным является соотношение N/P в интервале от 1 до 100, более предпочтительно соотношение N/P в интервале от 3 до 60 и наиболее предпочтительно соотношение N/P в интервале от 4 до 44.

Композиция по настоящему изобретению необязательно включает другие компоненты, прежде всего компоненты, которые могут оказывать эффекторную функцию в процессе доставки нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, к клетке или в клетку. Такие компоненты могут представлять собой, но не ограничиваясь только ими, полианионы, липиды, поликатионы, отличающиеся от сополимеров по настоящему изобретению, включая катионные пептиды, защитные олигомер или полимеры, полуксамеры (известные также как плуроники), полуксамины, лиганды направленного действия, эндосомолитические лиганды, проникающие в клетку и сигнальные пептиды, магнитные и немагнитные наночастицы, ингибиторы РНКазы, флуоресцентные красители, радиоизотопы или контрастные агенты для диагностической визуализации. Термин «эффекторная функция» охватывает любую функцию, которая поддерживает достижение предполагаемого биологического эффекта нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, в составе композиции около биологической мишени, в биологической мишени или в окружающей биологическую мишень среде. Например, композиции для доставки нуклеиновой кислоты составляют таким образом, чтобы они включали некодирующие нуклеиновые кислоты или несодержащие нуклеиновые кислоты полианионы в качестве материалов-наполнителей (Kichler и др., J Gene Med, 7, 1459-1467 (2005)). Такие материалы-наполнители используют для снижения дозы нуклеиновой кислоты, обладающей требуемым эффектом, и в то же время для поддержания величины или степени эффекта, который наблюдается при более высоких дозах нуклеиновой кислоты в отсутствии такого материала-наполнителя. Несодержащие нуклеиновые кислоты полианионы также используют для получения пролонгированной *in vivo* экспрессии гена со сниженной токсичностью (Uchida и др., J Control Release, 155, 296-302 (2011)). Композиции по настоящему изобретению могут также включать катионные, анионные или нейтральные липиды, такие как в случае липополиплексов (Li и Huang, "Nonviral Vectors for Gene Therapy", Academic Press, Chapter 13, 295-303 (1999)). Более того, композиции по настоящему изобретению могут включать олиго- или поликатионы, отличающиеся от сополимеров по настоящему изобретению. Такие

дополнительные олиго- или поликатионы могут быть пригодными для достижения требуемой степени уплотнения нуклеиновой кислоты или, в случае поликатионных пептидов, могут проявлять функцию ядерной локализации сигнала, как было описано ранее (Ritter и др., *J Mol Med*, 81, 708-717 (2003)). Защитные полимеры, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ) также включают в композиции по настоящему изобретению и часто используют для стабилизации полиплексов и липоплексов от агрегации и/или нежелательных взаимодействий в биологической окружающей среде (опсонизация), например, от взаимодействий с компонентами сыворотки, клеточными элементами крови или внеклеточным матриксом. Защиту можно также использовать для снижения токсичности содержащих нуклеиновую кислоту композиций (Finsinger и др., *Gene Ther*, 7, 1183-1192 (2000)). Защитные полимеры, такие как ПЭГ, можно напрямую присоединять к сополимерам по настоящему изобретению. Можно также использовать присоединение, например, к концевым группам (с) или к аминокгруппе повторяющихся звеньев формул (a1), (b1) или (b3).

Было установлено, что поливиниловые производные, такие как ПВП и полуксамеры, можно использовать для повышения трансфекции после внутримышечной инъекции (Mumper и др., *Pharm Res*, 13, 701-709 (1996), Lemieux и др., *Gene Ther*, 7, 986-991 (2000)) и, следовательно, их можно использовать в составе композиций по настоящему изобретению.

Лиганды направленного действия, включая антитела, включенные в композиции для доставки нуклеиновых кислот, можно использовать для предпочтительной и улучшенной трансфекции клеток-мишеней (Philipp и Wagner, "Gene and Cell Therapy - Therapeutic Mechanisms and Strategy", 3-ье изд., Chapter 15, CRC Press, Taylor & Francis Group LLC, Boca Raton (2009)). Лиганд направленного действия может представлять собой любое соединение, которое придает композициям по настоящему изобретению функцию распознавания мишени и/или функцию связывания с мишенью прямым или косвенным способом. В самом общем виде мишень представляет собой отдельную биологическую структуру, с которой может специфично связываться лиганд направленного действия за счет молекулярного взаимодействия, и при этом такое связывание в конечном счете приведет к предпочтительному накоплению нуклеиновой кислоты, включенной в состав композиции, в ткани-мишени и/или у клетки-мишени или внутри нее. Аналогично цепям ПЭГ, лиганды направленного действия можно присоединять, например, к концевым группам (с) или к аминокгруппе повторяющихся звеньев формул (a1), (b1) или (b3).

Более того, пригодными компонентами композиций по настоящему изобретению являются эндосомолитические агенты, такие как эндосомолитические пептиды (Plank и др., *Adv Drug Deliv Rev*, 34, 21-35 (1998)) или любое другое соединение, которое пригодно для повышения эндосомолитического высвобождения нуклеиновой кислоты после эндоцитоза. Аналогичным образом, в качестве пригодных компонентов композиции по настоящему изобретению можно использовать проникающие в клетку пептиды (в другом контексте известные как домены белковой трансдукции), чтобы опосредовать внутриклеточную доставку нуклеиновой кислоты (Lindgren и др., *Trends Pharmacol Sci*, 21, 99-103 (2000)). К этому классу относится так называемый пептид ТАТ, который также проявляет функцию ядерной локализации (Rudolph и др., *J Biol Chem*, 278, 11411-11418 (2003)).

Магнитные наночастицы, которые могут быть включены в композиции по настоящему изобретению, являются пригодными для физически направленной доставки за счет силы магнитного притяжения и для резкого повышения эффективности переноса

нуклеиновой кислоты по механизму, известному как магнетофекция (EP 1297169; Plank и др., *Adv Drug Deliv Rev*, 63, 1300-1331 (2011)). Аналогичным образом, композиция по настоящему изобретению может представлять собой немагнитный или магнитный микропузырек, который используют для физического повышения и направленной доставки нуклеиновой кислоты с помощью ультразвука и необязательно приложения магнитного поля (Holzbach и др., *J Cell Mol Med*, 14, 587-599 (2010), Vlaskou и др., *Adv Funct Mater*, 20, 3881-3894 (2010)). Предпочтительно можно также использовать квантовые точки (Zintchenko и др., *Mol Ther*, 17, 1849-1856 (2009)), радиоактивные индикаторы и контрастные агенты для диагностической визуализации для наблюдения за доставкой нуклеиновой кислоты и для определения биораспределения композиций для доставки нуклеиновой кислоты. В заключение следует отметить, что описано множество эффекторов для доставки нуклеиновых кислот и они являются пригодными компонентами в композициях, включающих нуклеиновую кислоту, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечную РНК, такую как мРНК, и сополимер по настоящему изобретению.

Специалисту в данной области техники представляется очевидным, что существуют чрезвычайно широкие возможности в отношении выбора количества каждого компонента, включенного в композицию по настоящему изобретению. Например, описаны так называемые мономолекулярные бинарные полиплексы для плазмидной ДНК, где композиция состоит из наночастиц, сформированных после смешивания поликатиона и плазмидной ДНК, которые включают точно одну молекулу плазмидной ДНК и множество молекул поликатиона, которое требуется для нейтрализации заряда или для сверхкомпенсации заряда (положительный больше отрицательного) (DeRouchey и др., *J Phys Chem B*, 110(10): 4548-54 (2006)). Методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии было установлено, что комплексы ПЭИ-ДНК (PEI-DNA) при соотношениях N/P, которые часто используют для трансфекции, содержат в среднем 3,5 (± 1) молекул плазмидной ДНК и 30 молекул ПЭИ, в то время как приблизительно 86% молекул ПЭИ, использованных для получения комплексов, находятся в свободной форме (Clamme и др., *Biophys J* 84, 1960-1968 (2003)). И наоборот, было установлено, что агрегированные комплексы ПЭИ и плазмидной ДНК, предположительно включающие большое количество (от десятков до сотен) молекул компонентов, проявляют большую эффективность при трансфекции, чем малые отдельные наночастицы ПЭИ-ДНК (Ogris и др., *Gene Ther*, 5, 1425-1433 (1998); Ogris и др., *AAPS PharmSci*, 3, E21 (2001)). Следовательно, композиция по настоящему изобретению может представлять собой частицу, прежде всего наночастицу, включающую несколько молекул нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, но может представлять собой макроскопический объект, такой как преципитат или сухой порошок, включающий огромное число молекул нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК. В заключение следует отметить, что перед самосборкой композиции по настоящему изобретению характеризуются исходными соотношениями их компонентов. Типичные исходные массовые соотношения индивидуальных компонентов относительно нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, составляют от 1 до 50. Соотношение N/P является приемлемой мерой исходного соотношения для бинарных композиций, содержащих сополимер по настоящему изобретению и нуклеиновую кислоту, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечную РНК, такую как мРНК, причем сополимер является хорошо охарактеризованным. Как было указано выше, величины соотношений N/P

предпочтительно составляют от 1 до 100, более предпочтительно соотношения N/P составляют от 3 до 60, и наиболее предпочтительно соотношения N/P составляют от 4 до 44.

Если композиция по настоящему изобретению включает дополнительные компоненты, определение соотношения N/P становится неоднозначным. В этом случае приемлемые исходные соотношения определяют экспериментально, включая следующие методы, но не ограничиваясь только ими, анализ на замедление подвижности в геле, анализ гашения флуоресценции, такой как вытеснение/гашение этидий бромидом, анализ по данным измерения размера частиц и зета-потенциала, а также функциональные методы анализа, такие как трансфекционные анализы, как описано в данном контексте. В тройных комплексах, включающих дополнительный полианион или защитные полимеры, суммарное соотношение зарядов (положительный больше отрицательного) должно составлять менее 1, а значение зета-потенциала может быть нейтральным или отрицательным.

Композиции по настоящему изобретению можно получить, как описано ниже. Обычно, нуклеиновая кислота, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечная РНК, такая как мРНК, с отрицательным зарядом, и сополимеры по настоящему изобретению предпочтительно в катионной форме, могут подвергаться процессу самосборки при контактировании, прежде всего в пригодном растворителе. После завершения процесса самосборки композицию по настоящему изобретению можно отделить от любых невключенных компонентов и на той же стадии суспензионную среду можно заменить методами центрифугирования или ультрафильтрации или эксклюзионной хроматографии или диализом или любыми приемлемыми способами. Стехиометрический состав компонентов композиции по настоящему изобретению, очищенных или неочищенных, можно определять с использованием множества аналитических методов, включая спектроскопические методы, такие как спектроскопия в видимой/УФ области или флуоресцентная корреляционная спектроскопия (DeRouchey и др., J Phys Chem B. 110(10): 4548-54 (2006)), введение ортогональной флуоресцентной или радиоизотопной метки в индивидуальные компоненты, с использованием ЯМР и ИК спектроскопии или хроматографического анализа и количественной оценки после распада композиции. Распад можно проводить, например, при добавлении избытка полианиона, такого как гепарин, как описано в данном контексте, или хондроитин сульфата или при добавлении додецилсульфата натрия.

Настоящее изобретение относится также к способу получения композиции по изобретению. Сополимеры по настоящему изобретению можно получать и очищать, как описано в данном контексте. Сополимеры можно хранить в водном растворе или в сухой форме, такой как сухой порошок, и в этом случае перед получением композиции их можно повторно растворять в водной среде, предпочтительно воде. При необходимости pH раствора доводят до нейтрального или слабокислотного значения (до pH 4,5) кислотой, предпочтительно соляной или лимонной кислотой. В случае РНК, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, содержащейся в композиции, предпочтительно доводить pH до величины приблизительно от 4,5 до 5,5, более предпочтительно приблизительно от 4,9 до 5,1, еще более предпочтительно приблизительно 5,0. Нуклеиновые кислоты получают и очищают по известным для специалиста в данной области техники методам. Нуклеиновую кислоту получают в виде раствора в водной среде, предпочтительно в воде. Необязательно либо сополимер, либо РНК в качестве нуклеиновой кислоты, либо оба компонента присоединены ковалентной связью к эффекторным молекулам, таким как лиганды

направленного действия, сигнальные пептиды, проникающие в клетку пептиды, эндосомолитические вещества или защитные полимеры. Однако, в зависимости от химической природы эффекторных молекул, может не потребоваться присоединение ковалентной связью, но их можно включать в композицию по настоящему изобретению

5 в процессе самосборки на основе нековалентного связывания, то есть электростатического, гидрофобного взаимодействия или взаимодействия Ван-дер-Ваальса, с любым из дополнительных компонентов композиции. Для этой цели можно предпочтительно регулировать ионную силу, тип противоиона, величину pH или содержание органического растворителя в растворах индивидуальных компонентов.

10 В качестве альтернативы методики смешивания, описанной выше, нуклеиновую кислоту, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечную РНК, такую как мРНК, и сополимерный компонент можно смешивать в автоматическом устройстве для микроперемешивания, таком как, например, описанное в статьях (Hirota и др., *Biotechniques*, 27, 286-290 (1999) или (Kasper и др., *Eur J Pharm Biopharm*, 77, 182-185 (2011))

15 или методом микроструйного фокусирования, описанного в статье (Xuan и др., *Microfluidics and Nanofluidics*, 9, 1-16 (2010)).

Композицию по настоящему изобретению, включающую нуклеиновую кислоту, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечную РНК, такую как мРНК, можно получить в процессе самосборки при смешивании растворов компонентов. Самосборку

20 можно осуществить при ручном смешивании с использованием пипетирования и встряхивания/вихревого перемешивания или с использованием автоматического устройства для микроперемешивания, такого как, например, описанное в статьях (Hirota и др., *Biotechniques*, 27, 286-290 (1999) или (Kasper и др., *Eur J Pharm Biopharm*, 77, 182-185 (2011)) или методом микроструйного фокусирования, описанного в статье (Xuan и др.,

25 *Microfluidics and Nanofluidics*, 9, 1-16 (2010)). Если композиция по настоящему изобретению включает другие компоненты в дополнении к нуклеиновой кислоте, прежде всего РНК, предпочтительно к одноцепочечной РНК, такой как мРНК, и сополимер по настоящему изобретению, может потребоваться последовательное смешивание. В этом случае любой дополнительный компонент можно добавлять после самосборки

30 сополимера и нуклеиновой кислоты, или его можно добавлять к любому из этих компонентов перед смешиванием. Наиболее приемлемая последовательность стадий перемешивания зависит от химической природы дополнительных компонентов. Например, если дополнительный компонент является отрицательно заряженным, наиболее предпочтительно добавлять его к компоненту нуклеиновой кислоты перед

35 смешиванием с сополимером, или в предварительно сформированный комплекс сополимера и нуклеиновой кислоты, причем сополимер по настоящему изобретению присутствует в избытке с учетом соотношения положительных зарядов и суммы отрицательных зарядов нуклеиновой кислоты и анионного дополнительного компонента. И наоборот, если дополнительный компонент является катионным,

40 наиболее предпочтительно добавлять его к сополимеру по настоящему изобретению перед смешиванием с нуклеиновой кислотой. Или его можно использовать в стехиометрическом соотношении, чтобы частично нейтрализовать отрицательные заряды нуклеиновой кислоты с последующим смешиванием с раствором сополимера по настоящему изобретению. В случае комплексов нуклеиновой кислоты, прежде всего

45 РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, для магнетофекции, было показано, что соль-индуцированная коллоидная агрегация является пригодным способом для получения композиций, включающих нуклеиновую кислоту, поликатион или катионный липид и магнитные частицы (EP 1297169). В конкретном случае

нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, то есть компонента в виде катионного олигонуклеотида, для самосборки сополимера по настоящему изобретению и нуклеиновой кислоты можно использовать полианион. В этом случае сополимер по настоящему изобретению смешивают с катионным нуклеотидом с последующим смешиванием с полианионом. Специалисту в данной области техники представляется очевидным, что существует множество типов составов для получения композиции по настоящему изобретению. Концентрации индивидуальных компонентов выбирают в зависимости от предполагаемой области применения композиции по настоящему изобретению. К релевантным параметрам относятся конечная концентрация нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, и соотношение компонентов, как описано выше. Для доставки нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, в культуру клеток конечная концентрация нуклеиновой кислоты в основном предпочтительно находится в интервале от 1 до 100 мкг/мл. Для применения *in vivo* используемая типичная конечная концентрация нуклеиновой кислоты может составлять вплоть до 5 мг/мл.

Композицию по настоящему изобретению можно хранить в виде водной суспензии или в сухом виде. Следовательно, в одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения композицию по настоящему изобретению хранят в сухой форме, необязательно в высушенной лиофильно (лиофилизированной) форме. В более предпочтительном варианте сухой или лиофилизированный комплекс или композиция также включает лиопротектор. Лиопротекторы представляют собой вещества, которые защищают (лиофильно) высушенный материал. Обычно такие вещества представляют собой полигидроксисоединения, такие как сахара (моно-, ди и полисахариды), многоатомные спирты и их производные. Трегалоза и сахароза являются известными природными протекторами для процессов высушивания. Трегалоза вырабатывается множеством растений, грибов и беспозвоночных животных в состоянии анабиоза в периоды засухи (известном также как ангидробиоз). Прежде всего пригодные для настоящего изобретения лиопротекторы, включенные в его объем, представляют собой сахара, такие как трегалоза, лактоза, раффиноза, сахароза, манноза, сорбит, маннит, ксилит, полиэтиленгликоль, декстрины, мочевины, мальтодекстрины, фруктаны, мальтоолигосахариды, манноолигосахариды, циклоинулогексаоза, гидроксиэтилкрахмал, декстраны, инулин, поливинилпирролидон или аминокислоты, такие как триптофан, глицин и фенилаланин. В данном контексте наиболее предпочтительно используют трегалозу.

Фармацевтические объекты

В другом объекте настоящего изобретения предлагается применение композиции по изобретению или сополимера по изобретению для доставки нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, в ткань или клетку-мишень. Термин «доставка нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, в клетку» предпочтительно означает перенос нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, в клетку. Указанное применение можно осуществлять *in vivo* или *in vitro*.

Настоящее изобретение относится также к способу доставки нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, в клетку-мишень или ткань-мишень, включающий приведение в контакт (контактирование) композиции по настоящему изобретению с клеткой-мишенью или тканью-мишенью.

Контактирование можно осуществлять способами и методами, известными специалисту в данной области техники. Например, если метод осуществляют *in vitro*, контактирование можно проводить при культивировании клеток в присутствии композиции в культуральной среде или при добавлении композиции в клетки. Если метод осуществляют *in vivo*, контактирование можно проводить при введении композиции индивидууму способами введения, известными специалисту в данной области техники, прежде всего методом введения, который обычно используют в области генетической терапии. Возможные способы получения композиции и ее введения индивидууму описаны также ниже.

Термин «*in vivo*» относится к любому применению, оказывающему действие на тело живого организма, который предпочтительно является многоклеточным, более предпочтительно млекопитающим и наиболее предпочтительно человеком. Термин «*in vitro*» относится к любому применению, которое оказывает действие на части тела живого организма, выделенные из указанного организма и отделенные от него, например, клетки, ткани и органы, причем указанный организм предпочтительно является многоклеточным, более предпочтительно млекопитающим и наиболее предпочтительно человеком.

Настоящее изобретение относится также к фармацевтической композиции, включающей композицию по настоящему изобретению и необязательно фармацевтически приемлемый носитель и/или разбавитель. В данном контексте следует понимать, что композиция по изобретению, определенная в данном контексте, может представлять собой или ее можно использовать как фармацевтическую композицию саму по себе. Термин «фармацевтическая композиция» означает фармацевтически приемлемую форму композиции по изобретению, которую можно вводить субъекту. Фармацевтическая композиция пригодна для применения при лечении организма человека или животного терапевтическим способом (включая профилактику).

Термин «фармацевтически приемлемая форма» означает, что композицию перерабатывают в фармацевтическую композицию, при этом указанная фармацевтическая композиция может дополнительно включать фармацевтически приемлемый носитель и/или разбавитель. Примеры пригодных фармацевтических носителей известны в данной области техники и включают фосфатно-солевые буферные растворы, воду, эмульсии, такие как эмульсии вода/масло, смачивающие агенты различного типа, стерильные растворы и т.п. Композиции, включающие такие носители, можно перерабатывать известными стандартными методами. Фармацевтические композиции можно вводить субъекту в приемлемой дозе. Схемы введения определяет лечащий врач-терапевт и с учетом клинических факторов. Как известно в медицине дозировки для любого субъекта зависят от многих факторов, включая размер субъекта, его площадь тела, возраст, конкретное соединение, которое предполагается ввести, пол, время и способ введения, общее состояние здоровья, и другие лекарственные средства, которые вводили одновременно. Типичная доза активных веществ может, например, находиться в интервале от 1 нг до нескольких граммов. При использовании для лечения нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, дозировки нуклеиновой кислоты для экспрессии или подавления экспрессии должны соответствовать указанному интервалу, однако предусматриваются дозы ниже или выше этого типичного интервала, прежде всего с учетом указанных выше факторов. В основном схемы введения при регулярном приеме фармацевтической композиции должны находиться в интервале от 0,1 мкг до 10 мг на кг массы тела в сутки. В случае непрерывного вливания доза также находится в интервале от 1 мкг до

10 мг на кг массы тела, соответственно. Ход лечения можно периодически оценивать. Дозировки можно изменять, но предпочтительные дозировки для внутривенного введения нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, в качестве составляющих компонентов композиции по

5 настоящему изобретению составляют приблизительно от 10^6 до 10^{19} копий молекулы нуклеиновой кислоты.

Термин «введенный» включает любой способ, пригодный для введения композиции в тело субъекта. Введение пригодных композиций можно осуществлять различными способами, например, внутривенным, внутриартериальным, внутрибрюшинным, 10 подкожным, чрескожным, интратекальным, внутримышечным, местным, внутрикожным, интраназальным, внутрилегочным, то есть ингаляционным или внутрибронхиальным, или пероральным или ректальным способами. Композиции по настоящему изобретению прежде всего можно вводить в ген-активированной матрице, как описано в статье (Shea и др., Nat Biotechnol, 17, 551-554 (1999)) и в патенте EP 1198489.

15 В принципе, фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить местным и системным способом. Предпочтительным является парентеральное введение, например, внутривенное, хотя можно использовать другие способы введения, включенные в объем настоящего изобретения.

Осуществлять введение можно также напрямую в участок-мишень, например, через 20 катетер в участок кровеносного сосуда. Осуществлять введение можно также напрямую в участок-мишень, такой как опухоль. В объем изобретения включены также введение в виде аэрозоля или распылением или пероральное введение. Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примеры неводных растворов включают пропиленгликоль, 25 полиэтиленгликоль, фторуглероды, растительные масла, такие как оливковое масло, и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртово-водные растворы, эмульсии или суспензии, включая солевые и буферные среды. Парентеральные носители включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактат Рингера или нелетучие масла. 30 Внутривенные носители включают жидкие и питательные компенсирующие добавки, электролитные компенсирующие добавки (такие как добавки на основе декстрозы Рингера) и т.п. Могут также присутствовать консерваторы и другие добавки, такие как, например, противомикробные препараты, антиоксиданты, хелатирующие агенты и инертные газы и т.п. Кроме того, фармацевтическая композиция может также включать 35 другие агенты, такие как интерлейкины или интерфероны в зависимости от предполагаемого применения фармацевтической композиции.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается способ лечения, включающий введение фармацевтической композиции по настоящему изобретению пациенту таким образом, чтобы нуклеиновая кислота, прежде всего РНК, 40 предпочтительно одноцепочечная РНК, такая как мРНК, содержащаяся в указанной композиции, вызывала профилактический или терапевтический эффект. Следует отметить, что термин «пациент» включает животных и человека.

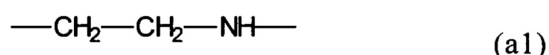
При введении фармацевтической композиции по настоящему изобретению можно оказывать лечебное или профилактическое действие на заболевание. Термин 45 «заболевание» относится к любому предполагаемому патологическому состоянию, на которое можно оказывать лечебное, профилактическое действие или против которого можно проводить вакцинацию с использованием варианта осуществления настоящего изобретения. В предпочтительном варианте указанного способа указанные заболевания

могут представлять собой наследственные, приобретенные, инфекционные или неинфекционные, возрастные, сердечно-сосудистые, метаболические, кишечные, неопластические (прежде всего рак) или генетические заболевания. Заболевание может быть основано, например, на disregуляции физиологических процессов, молекулярных процессов, биохимических реакций в организме, которые в свою очередь основаны, например, на генетическом аппарате организма, на поведенческих, социальных факторах или факторах окружающей среды, таких как воздействие химических реагентов или радиации. В прежде всего предпочтительном варианте фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют для лечения, как описано в заявке WO 2011/012316.

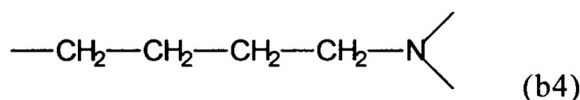
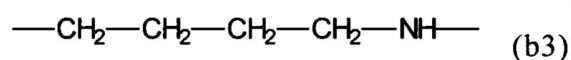
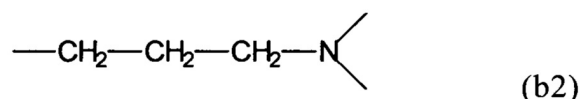
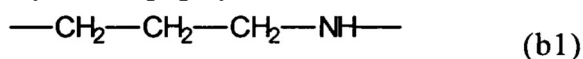
В связи с описанными выше способами настоящее изобретение относится к другому варианту, то есть к применению композиции по настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции, предназначенной для лечения заболевания, на которое можно оказывать лечебное действие при доставке указанной нуклеиновой кислоты, прежде всего РНК, предпочтительно одноцепочечной РНК, такой как мРНК, содержащейся в указанной композиции, в ткань или орган в организме пациента, страдающего от заболевания.

Для дополнительной иллюстрации предпочтительные объекты изобретения суммированы в виде следующих объектов, которые являются частью представленного выше основного описания, при этом используются также предпочтительные варианты, описанные в данном контексте.

1. Статистический сополимер, включающий множество повторяющихся звеньев (а), независимо друг от друга выбранных из следующих формул (a1) и (a2):



множество повторяющихся звеньев (b), независимо друг от друга выбранных из следующих формул (b1)-(b4):



где молярное соотношение суммы повторяющихся звеньев (а) и суммы повторяющихся звеньев (b) находится в интервале от 0,7:1,0 до 1,0:0,7, где один или более атомов азота в повторяющихся звеньях (а) и/или (b), содержащихся в сополимере, могут протонироваться с образованием катионного сополимера.

2. Сополимер по объекту 1, который является разветвленным или дендритным сополимером, включающим повторяющиеся звенья одного или более типа, выбранные из повторяющихся звеньев (a2), (b2) и (b4).

3. Сополимер по объекту 1, который является линейным сополимером, включающим повторяющиеся звенья (a1) и (b1).

4. Сополимер по любому из объектов 1-3, где содержание повторяющихся звеньев

(а) и (b) составляет 80 мол. % или более в расчете на все повторяющиеся звенья в сополимере.

5. Сополимер по любому из объектов 1-3, где все повторяющиеся звенья в сополимере представляют собой повторяющиеся звенья (а) или (b).

5 6. Сополимер по любому из объектов 1-3, где содержание повторяющихся звеньев (а), выбранных из (a1) и (a2), и повторяющихся звеньев (b), выбранных из (b1) и (b2), составляет 80 мол. % или более в расчете на все повторяющиеся звенья в сополимере.

7. Сополимер по любому из объектов 1-3, где все повторяющиеся звенья в сополимере представляют собой повторяющиеся звенья (а), выбранные из (a1) и (a2), или
10 повторяющиеся звенья (b), выбранные из (b1) и (b2).

8. Сополимер по любому из объектов 1-7, который является статистическим сополимером.

9. Сополимер по любому из объектов 1-8, где общее число повторяющихся звеньев (а) и повторяющихся звеньев (b) составляет 20 или более, предпочтительно 50 или более
15 и более предпочтительно 100 или более.

10. Сополимер по любому из объектов 1-9, где общее число повторяющихся звеньев (а) и повторяющихся звеньев (b) составляет 5000 или менее, предпочтительно 2500 или менее и более предпочтительно 1000 или менее.

11. Сополимер по любому из объектов 1-10, где его среднемассовая молекулярная
20 масса находится в интервале от 2000 до 250000 Да, предпочтительно от 5000 до 50000 Да.

12. Сополимер по любому из объектов 1-11, где концевые группы сополимера включают группы (с) одного или более типа, независимо выбранные из групп формул (с1)-(с3):

25 $\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—NH}_2$ (с1)

$\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—NH}_2$ (с2)

$\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—NH}_2$ (с3)

30 13. Сополимер по объекту 12, где концевые группы в составе сополимера включают группы (с) одного или более типа, независимо выбранные из групп формул (с1) и (с2).

14. Сополимер по любому из объектов 1-13, где молярное соотношение повторяющихся звеньев (а) и повторяющихся звеньев (b) находится в интервале 0,8:1,0 до 1,0:0,8.

35 15. Сополимер по любому из объектов 1-14, который является катионным сополимером.

16. Сополимер по любому из объектов 1-15, который получают при полимеризации смеси мономеров, включающей азиридин, азетидин и необязательно пирролидин.

40 17. Композиция, включающая нуклеиновую кислоту и сополимер по любому из объектов 1-16.

18. Композиция по объекту 17, где нуклеиновой кислотой является РНК.

19. Композиция по объекту 17, где нуклеиновой кислотой является одноцепочечная РНК.

20. Композиция по объекту 17, где нуклеиновой кислотой является мРНК,
45 предпочтительно модифицированная мРНК.

21. Композиция по любому из объектов 17-20, где сополимер представляет собой катионный сополимер и где катионный сополимер образует комплекс с нуклеиновой кислотой.

22. Композиция по любому из объектов 17-20, которая представляет собой лиофилизированную форму.

23. Композиция по объекту 22, которая дополнительно включает лиопротектор.

24. Композиция по объекту 23, где лиопротектором является трегалоза.

5 25. Композиция по любому из объектов 1-22, которая представляет собой фармацевтическую композицию.

26. Фармацевтическая композиция, включающая композицию по любому из объектов 17-25 и необязательно дополнительный фармацевтически приемлемый носитель и/или разбавитель.

10 27. Применение сополимера по любому из объектов 1-16 для доставки нуклеиновой кислоты в клетку.

28. Применение композиции или фармацевтической композиции по любому из объектов 17-26 для доставки нуклеиновой кислоты в клетку.

29. Применение по объекту 27 или 28, где нуклеиновой кислотой является РНК.

15 30. Применение по объекту 27 или 28, где нуклеиновой кислотой является одноцепочечная РНК.

31. Применение по объекту 27 или 28, где нуклеиновой кислотой является мРНК, предпочтительно модифицированная мРНК.

20 32. Способ доставки нуклеиновой кислоты в клетку-мишень или ткань-мишень, включающий стадию приведения в контакт композиции или фармацевтической композиции по любому из объектов 17-26 с клеткой-мишенью или тканью-мишенью.

33. Способ получения сополимера по любому из объектов 1-15, включающий стадию полимеризации смеси мономеров, включающей азиридин, азетидин и необязательно пирролидин.

25 Примеры

Пример 1

Материалы

Получение химически модифицированной Luc мРНК

30 Для получения матрицы для транскрипции *in vitro* (IVT) плазмиду pVAXA120-Luc линеаризовали при расщеплении рестриктазой NotI. Затем матрицу очищали осаждением в хлороформе-этаноле. Качество матрицы определяли методом нативного электрофореза в агарозном геле. IVT проводили с использованием стандартной смеси для IVT, содержащей трифосфаты рибонуклеотидов и полимеразу T7 RNA. Модификации осуществляли с использованием 25% of 5-метилцитидин-5'-трифосфата и 25% of 2-тиоуридин-5'-трифосфата. Кэппинг осуществляли с использованием фермента кэпирования вируса осповакцины, рГТФ (rGTP) и S-аденозилметионина (SAM) в качестве донора, чтобы присоединить структуру 7-метилгуанилат-кэп-0 (m7GpppG) к 5'-концу мРНК. Очистку мРНК проводили в условиях осаждения ацетатом аммония.

35 Модифицированную Luc мРНК ресуспендировали в воде для инъекций и контроль качества проводил с использованием УФ-спектрометрии, нативного электрофореза а агарозном геле и трансфекции в клетках NIH3T3.

Полимеры и средние молекулярные массы повторяющего звена полимера

45 Полимеры синтезировали с использованием азиридина (E), азетидина (P) или стехиометрической смеси азиридина (E) и азетидина (P) при молярных соотношениях мономеров (E/P) 1:0, 0,8:1 и 0:1. Гомополимеризацию и сополимеризацию азиридина и азетидина проводили, начиная с раствора мономеров в воде (общая концентрация мономера(ров): 50 мас. %). Полимеризацию проводили при 130°C в течение 20-70 ч в смеси с 0,001 экв. серной кислоты. Для сравнения получали гомополимеры с

соотношением E/P 1:0 и 0:1, соответственно.

Аналогичным образом получали статистические разветвленные сополимеры, содержащие повторяющиеся звенья этиламина ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}<$; "Е"; молекулярная масса 42 г/моль) и пропиламина ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}<$; "Р"; молекулярная масса 56 г/моль), отражающие стехиометрический состав мономеров. Среднюю молекулярную массу полимеризованных звеньев рассчитывали по следующей формуле:

$$M_w = \frac{E \times 42 + P \times 56}{(E + P)}$$

Получали следующие результаты:

E	P	Средняя молекулярная масса (Mw)
1	0	42,00
0,8	1	49,78
0	1	56,00

Исходные растворы

Исходный раствор полимеров: 0,5 мг/мл в воде для инъекций

Исходный раствор мРНК: 0,05 мг/мл концентрированный раствор в воде для инъекций

Соотношение N/P и получение комплексов мРНК с полимерами

Для получения комплекса полимер-мРНК использовали соотношение N/P, которое отражает исходное отношение азота в данном количестве полимера к фосфату в данном количестве мРНК. Средняя молекулярная масса монофосфата рибонуклеотида в составе мРНК составляет 346 г/моль.

Следовательно, объем исходного раствора полимера ($V_{\text{полимер}}$) с данной концентрацией ($C_{\text{полимер}}$), который требуется для мРНК с данной молекулярной массой ($W_{\text{РНК}}$) при требуемом соотношении N/P рассчитывают по следующей формуле:

$$V_{\text{полимер}} = \frac{W_{\text{РНК}} \times M_w_{\text{полимер}} \times N/P}{346 \times C_{\text{полимер}}}$$

Соответственно объемы исходных растворов полимеров, представленные в таблице ниже, разбавляли представленными объемами воды для инъекций до 25 мкл в индивидуальных лунках 96-луночного планшета в рядах А и Е, соответственно.

N/P	4	8	10	12	16	20
Е:Р = 1:0 (мкл)	1,21	2,43	3,03	3,64	4,86	6,07
H ₂ O (мкл)	23,79	22,57	21,97	21,36	20,14	18,93

N/P	4	8	10	12	16	20
Е:Р = 0,8:1 (мкл)	1,44	2,88	3,60	4,32	5,75	7,19
H ₂ O (мкл)	23,56	22,12	21,40	20,68	19,25	17,81

N/P	4	8	10	12	16	20
Е:Р = 0:1 (мкл)	1,62	3,24	4,05	4,86	6,47	8,09
H ₂ O (мкл)	23,38	21,76	20,95	20,14	18,53	16,91

Затем в растворы полимеров добавляли по 25 мкл исходного раствора мРНК (содержащего соответственно 1,25 мкг мРНК) до получения требуемого соотношения N/P. В лунки в рядах В-Д и F-Н, соответственно, добавляли по 25 мкл воды для инъекций. После инкубации в течение 30 мин по 25 мкл комплексов из лунок ряда А или Е,

соответственно, переносили в лунки ряда В или F, соответственно, с использованием многоканальной пипетки и смешивали. Затем последовательно 25 мкл из ряда В переносили в ряд С или из ряда F в ряд G, соответственно, смешивали, и из ряда С в ряд D или из ряда G в ряд H, соответственно.

5 Клетки, трансфекция и анализ люциферазы

Клетки HEK293 (DSMZ ACC305, Lot21) культивировали в среде DMEM, MEM, MEM, каждая из которых включала 10% ЭТС+1% P/S. За 24 ч перед трансфекцией клетки высевали при плотности 5000 клеток в 100 мкл среды для культивирования клеток в 96-луночном планшете.

10 20 мкл каждого из серийных разведений комплекса полимер-мРНК переносили в клетки в количестве 125/62,5 нг мРНК в лунке. После инкубации в течении 24 ч супернатанты клеточной культуры удаляли, клетки отмывали фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБР) и в лунки добавляли по 100 мкл буферного раствора для лизиса (25 mM трис-HCl, 0,1% тритон X100, pH 7,8).

15 Анализ люциферазы: 80 мкл лизата переносили в лунку белого 96-луночного планшета и использовали для измерения люциферазной активности в приборе Wallac Victor² (Perkin Elmer). Для этих целей в лунки добавляли 100 мкл реагента для измерения активности люциферазы (0,5 mM D-люциферина, 0,3 mM коэнзима А, 33 mM DTT, 0,5 mM АТФ, 1 mM хлорида магния, 2,7 mM сульфата магния, 0,1 mM EDTA, 20 mM трицина)
20 и измеряли интенсивность хемилюминисценции. Эксперименты повторяли три раза.

Результаты

Эксперимент показал, что химически модифицированная Luc мРНК в составе комплекса с сополимером (0,8:1) более эффективно экспрессируется после трансфекции клеток по сравнению с комплексом с разветвленным PEI (1:0) или PPI (0:1) (фиг. 1). Эти
25 результаты также показали, что объект по настоящему изобретению можно надлежащим образом рассматривать вместе со способом и фармацевтическими препаратами по настоящему изобретению.

Пример 2

30 Аэрозольное нанесение химически модифицированной Luc мРНК, кодирующей люциферазу свёрчка (Luc) в составе с сополимерами, в легкие свиньи

Химические реагенты

См. пример 1 выше.

Получение химически модифицированной Luc мРНК

См. пример 1 выше.

35 Методика эксперимента

Седативный эффект у свиней инициировали при введении азаперона 2 мг/кг массы тела, кетамина 15 мг/кг массы тела, атропина 0.1 мг/кг массы тела, а затем вводили внутривенный катетер в латеральную ушную вену. Свинью анестезировали при
40 внутривенной инъекции пропофола 3-5 мг/кг массы тела в соответствии с требованиями. Анестезию поддерживали при непрерывном внутриклеточном вливании 1% пропофола в соответствии с требованиями. Дыхательные параметры сравнивали с уровнем диоксида углерода в конце выдоха и при необходимости регулировали. Анестезию, дыхательные и сердечно-сосудистые параметры непрерывно контролировали с использованием пульсоксиметрии, капнографии, датчика ректальной температуры и рефлекторного
45 статуса. Свинье внутривенно вводили сбалансированный раствор электролита при скорости потока 10 мл/кг/ч. Продолжительность анестезии составляла приблизительно 80-120 мин. Свинью забивали струйной инъекцией пентобарбитала 100 мг/кг массы тела через латеральную ушную вену после аэрозольного нанесения (распылитель

Aeroneb mesh). Легкие иссекали и разрезали на образцы ткани толщиной приблизительно 1 см из различных областей легких, а затем инкубировали в среде для культивирования клеток в течение 24 ч при 37°C (5% диоксида углерода) в инкубаторе. Для измерения люциферазной активности образцы ткани инкубировали в ванне для сред, включающей субстрат D-люциферин в ФСБР (100 мкг/мл) при 37°C в течение 30 мин и анализировали в аппарате для биолуминисцентной визуализации люциферазы *ex vivo* (IVIS 100, Xenogen, Alameda, США).

Получение полиплексов сополимер-мРНК

Полиплексы получали с использованием двухканального поршневого насоса KDS-210-CE, KD Scientific). мРНК и сополимер (0,8:1, 1:0, 0:1 или PEI 25 кДа) каждый разбавляли в 12,0 мл дважды перегнанной воды и получали концентрацию мРНК 500 мкг/мл (концентрация сополимера или разветвленного PEI 25 кДа соответствует соотношению N/P 10). Обоими растворами заполняли отдельный шприц объемом 20 мл с использованием откачивающей функции наноса (функции обратного хода) при скорости 5 мл/мин. Для смешивания обоих образцов два шприца соединяли шлангом (Safeflow Extension Set, B.Braun) через тройник. Смешивание проводили с использованием нагнетательной функции насоса при скорости 40 мл/мин. Перед использованием комплексы инкубировали в течение 30 мин при температуре окружающей среды. При разработке настоящего изобретения было установлено, что для образования комплексов особенно предпочтительно использовать только воду без каких-либо буферных растворов, так как в ином случае наночастицы могут агрегировать или потерять эффективность в легких мыши (Rudolph и др., J. Mol Ther., 12: 493-501 (2005)).

Результаты

Эксперимент показал, что химически модифицированная Luc мРНК в составе комплекса с сополимером (0,8:1) более эффективно экспрессируется в клетках легких свиньи после доставки в легкие в виде аэрозоля по сравнению с комплексом с разветвленным PEI (ПЭИ) (1:0) или PPI (ППИ) (0:1) (фиг. 2). Эти результаты также показали, что объект по настоящему изобретению можно надлежащим образом рассматривать вместе со способом и фармацевтическими препаратами по настоящему изобретению.

Пример 3

Введение *in vivo* химически модифицированной Luc мРНК, кодирующей люциферазу сверчка (Luc) в составе с сополимерами, в легкие свиньи

Химические реагенты

См. пример 1 выше.

Получение химически модифицированной Luc мРНК

См. пример 1 выше.

Методика эксперимента

Полиплексы разветвленного 0,8:1 (звенья этиламин/пропиламин) сополимера ("br-Ното") и мРНК кодирующей люциферазу светлячков, и разветвленного полиэтиленimina ("br-PEI") и мРНК получали и вводили либо в виде внутритрахеальной жидкости (n=3), (25 мкг мРНК в объеме 100 мкл), либо в виде внутритрахеального спрея (12,5 мкг РНК в объеме 50 мкл) с использованием монопульверизатора высокого давления (PennCentury, США). Все эксперименты были одобрены местными органами управления (правительство Верхней Баварии) и эксперименты проводили в соответствии с законом о надлежащем содержании животных. Взрослых самок мышей Balb/c анестезировали в ингаляционной камере с изофлураном. Затем исследуемые составы вводили напрямую в трахею с использованием специального источника свет и

небольшого шпателя для животных. Животных выдерживали для восстановления после анестезии в течение нескольких минут. Через 6 с животных анестезировали с использованием внутривентральной инъекции фентанил/мидазолам/медетомидин (0,05/5,0/0,5 мг/кг массы тела). D-люцефирин (1,5 мг разбавляли в 50 мкл ФСБР) вводили в ноздри анестезированных животных, который затем вдыхался и попадал в более глубокие дыхательные пути. Биолюминисцентную визуализацию проводили в системе IVIS Lumina XR Imaging System (Perkin Elmer, США).

Описание фигур

Фиг. 1

Полиплексы получали с использованием сополимера 0,8:1, 1/0 или 0:1 (звенья этиламин/пропиламин) и мРНК, кодирующей люциферазу светлячков, в указанных соотношениях. Через 24 ч клетки НЕК293, трансфектированные различными количествами мРНК (125 или 62,5 нг), лизировали и определяли люциферазную активность.

Фиг. 2

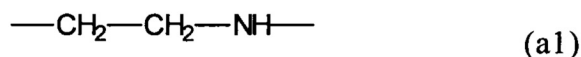
Полиплексы получали с использованием сополимера 0,8:1, 1/0 или 0:1 (звенья этиламин/пропиламин), PEI (коммерческий препарат разветвленного PEI, 25 кДа, Sigma-Aldrich) и мРНК, кодирующей люциферазу светлячков, в соотношении N/P 10. Через 24 ч после аэрозольного введения свиньям легкие иссекали и в срезах легочной ткани определяли люциферазную активность с помощью биолюминисцентной визуализации.

Фиг. 3

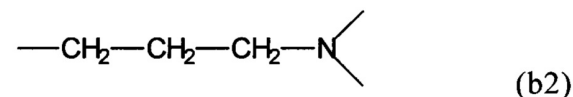
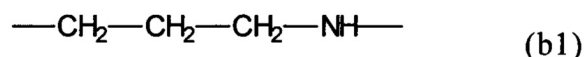
Полиплексы разветвленного 0,8:1 (звенья этиламин/пропиламин) сополимера ("br-Nomo") и мРНК кодирующей люциферазу светлячков, и разветвленного полиэтиленimina ("br-PEI") и мРНК вводили мышам в виде интратрахеальной жидкости и в виде интратрахеального спрея. На фигуре показаны результаты тестирования с помощью биолюминисцентной визуализации в системе IVIS Lumina XR Imaging System (Perkin Elmer, США).

(57) Формула изобретения

1. Статистический полимер, включающий множество повторяющихся звеньев (a), независимо друг от друга выбранных из следующих формул (a1) и (a2):



множество повторяющихся звеньев (b), независимо друг от друга выбранных из следующих формул (b1) и (b2):



где молярное соотношение суммы повторяющихся звеньев (a) и суммы повторяющихся звеньев (b) находится в интервале от 0,7:1,0 до 1,0:0,7, где один или более атомов азота в повторяющихся звеньях (a) и/или (b), содержащихся в сополимере, могут протонироваться с образованием катионного сополимера.

2. Сополимер по п. 1, который является разветвленным сополимером, включающим повторяющиеся звенья одного или более типа, выбранных из повторяющихся звеньев

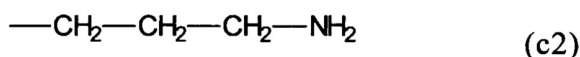
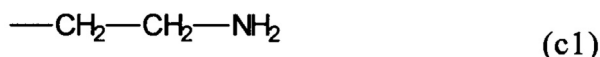
(a2) и (b2).

3. Сополимер по п. 1, который является линейным сополимером, включающим повторяющиеся звенья (a1) и (b1).

4. Сополимер по любому из пп. 1-3, где содержание повторяющихся звеньев (a) и (b) составляет 80 мол. % или более в расчете на все повторяющиеся звенья в сополимере.

5. Сополимер по любому из пп. 1-3, где содержание повторяющихся звеньев (a), выбранных из (a1) и (a2), и повторяющихся звеньев (b), выбранных из (b1) и (b2), составляет 80 мол. % или более в расчете на все повторяющиеся звенья в сополимере.

6. Сополимер по любому из пп. 1-5, где концевые группы сополимера включают группы (c) одного или более типа, независимо выбранные из групп формул (c1)-(c2):



7. Сополимер по любому из пп. 1-6, где молярное соотношение повторяющихся звеньев (a) и повторяющихся звеньев (b) находится в интервале от 0,8:1,0 до 1,0:0,8.

8. Сополимер по любому из пп. 1-7, который получают при полимеризации смеси мономеров, включающей азиридин и азетидин.

9. Композиция для введения нуклеиновой кислоты в клетку, включающая нуклеиновую кислоту и сополимер по любому из пп. 1-8, где нуклеиновая кислота является РНК и соотношение массы сополимера к массе нуклеиновой кислоты, составляет в пределах от 0,25:1 до 50:1.

10. Композиция по п. 9, где нуклеиновой кислотой является мРНК.

11. Композиция п. 9 или 10, где сополимер представляет собой катионный сополимер и где катионный сополимер образует комплекс с нуклеиновой кислотой.

12. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания, которое можно лечить или предотвратить путем введения РНК, включающая эффективное количество композиции по любому из пп. 9-11 и необязательно дополнительный фармацевтически приемлемый носитель и/или разбавитель.

13. Применение сополимера по любому из пп. 1-8, или композиции по любому из пп. 9-11, или фармацевтической композиции по п. 12 для доставки РНК в клетку.

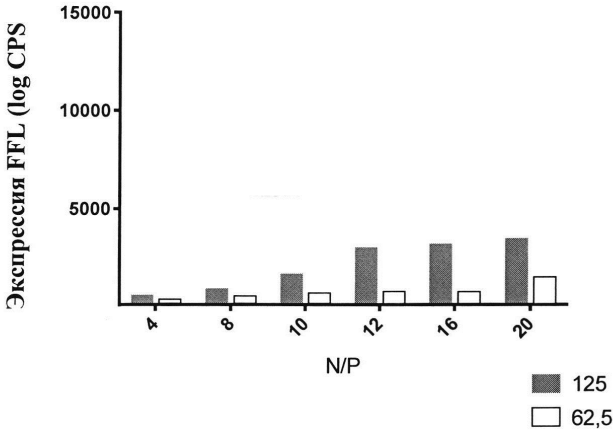
14. Способ доставки РНК в клетку-мишень или ткань-мишень, включающий стадию приведения в контакт композиции по любому из пп. 9-11 или фармацевтической композиции по п. 12 с клеткой-мишенью или тканью-мишенью.

15. Способ получения сополимера по любому из пп. 1-7, включающий стадию полимеризации смеси мономеров, включающей азиридин и азетидин.

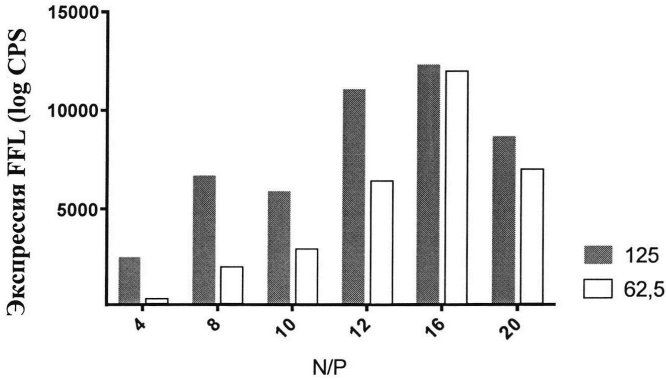
1

ФИГ. 1

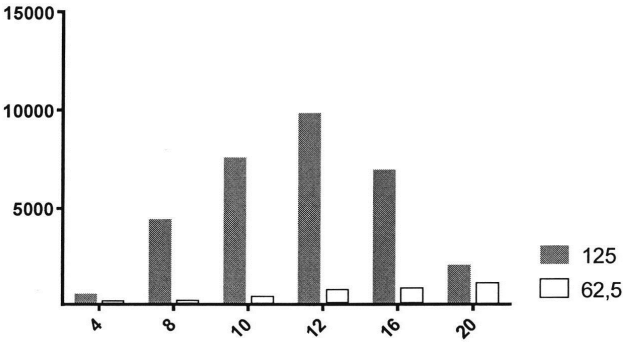
1:0 (PEI)



0.8:1

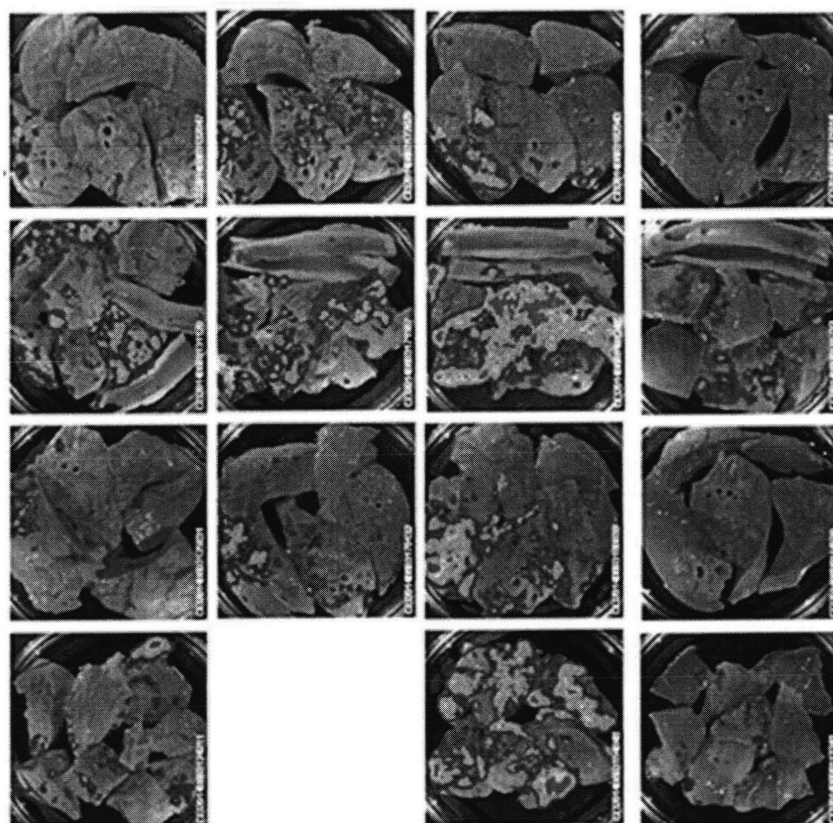


0:1 (PPI)



2

ФИГ. 2



brPEI

1:0 (PEI)

0.8:1

0:1 (PPI)

ФИГ. 3

