

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201291100 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2013.05.30(22) Дата подачи заявки  
2011.06.03

(51) Int. Cl. *A61K 9/10* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)  
*A61K 48/00* (2006.01)  
*C07C 69/02* (2006.01)  
*C07C 211/62* (2006.01)  
*C07C 211/63* (2006.01)  
*C12N 15/87* (2006.01)  
*A61K 47/48* (2006.01)

## (54) БИОРАЗЛАГАЕМЫЕ ЛИПИДЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ АКТИВНЫХ АГЕНТОВ

(31) 61/351,146; 61/489,197

(32) 2010.06.03; 2011.05.23

(33) US

(86) PCT/US2011/039164

(87) WO 2011/153493 2011.12.08

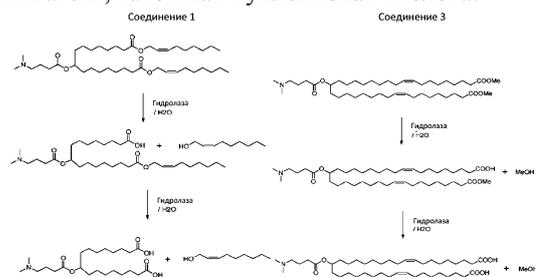
(88) 2012.01.19

(71) Заявитель:  
ЭЛНИЛЭМ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,  
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:  
Манохаран Мутиах, Майер Мартин,  
Джаяраман Мутусами, Мацуда Сигео,  
Джаяпракаш Нараяннаир К.,  
Раджив Каллантоттатил Г., Акинг  
Акин, Бэйли Томас А. (US)

(74) Представитель:  
Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к катионному липиду, имеющему одну или более биоразлагаемую группу, расположенную в средней или дистальной части липидного фрагмента (например, гидрофобной цепи) катионного липида. Эти катионные липиды могут быть включены в липидные частицы для доставки активных агентов, таких как нуклеиновые кислоты. Изобретение также относится к липидным частицам, содержащим нейтральные липиды, липиды, способные снизить агрегацию, катионный липид настоящего изобретения и, возможно, стеролы. Липидная частица может дополнительно включать в себя терапевтический агент, такой как нуклеиновая кислота.



A1

201291100

201291100

A1

## БИОРАЗЛАГАЕМЫЕ ЛИПИДЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ АКТИВНЫХ АГЕНТОВ

### Заявление об установлении приоритета

Данная заявка утверждает приоритет заявки на патент США № 61/351146, поданной 3 июня 2010 года, и заявки на патент США № 61/489197, поданной 23 мая 2011, каждые из которых включены в качестве ссылки в полном объеме.

### Область техники

Настоящее изобретение относится к биологическим липидам и их использованию для доставки активных агентов, таких как нуклеиновые кислоты.

### Уровень техники

Терапевтические нуклеиновые кислоты включают, например, малые интерферирующие РНК (миРНК), микро-РНК (микроРНК), антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы, плазмиды, иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты, антисмысловые, антагомир, антимиР, модели микроРНК, супермир, U1 адаптер и аптамер. Эти нуклеиновые кислоты действуют через различные механизмы. В случае миРНК или микроРНК, эти нуклеиновые кислоты могут понижать внутриклеточные уровни определенных белков в процессе, называемом РНК-интерференция (РНКи). После введения миРНК или микроРНК в цитоплазму клетки, эти двухцепочечные РНК образуют связи с белком, называемым RISC. Смысловые нити миРНК или микроРНК смещаются от комплекса RISC, обеспечивающего шаблон в RISC, который может распознавать и связывать мРНК с комплементарной последовательностью, что и связанные миРНК или микроРНК. Имеющаяся связь комплементарной мРНК с комплексом RISC расщепляет мРНК и высвобождает расщепляемые нити. РНКи может обеспечить понижающее регулирование конкретных белков, ориентированных на специфическую деструкцию соответствующих мРНК, которые кодируют синтез белка.

Терапевтическое применение РНК-интерференции чрезвычайно широко, так как миРНК и микроРНК конструкции могут быть синтезированы с любой нуклеотидной последовательностью, направленной против целевого белка. На сегодняшний день миРНК конструкции показали способность специфически понижающе регулировать целевые

белки в *in vitro* и *in vivo* моделях. Кроме того, миРНК конструкции в настоящее время оцениваются в клинических исследованиях.

Тем не менее, двумя проблемами, с которыми сталкивается в настоящее время миРНК или микроРНК конструкции являются, во-первых, их восприимчивость к нуклеазам расщепления в плазме крови и, во-вторых, их ограниченные возможности для получения доступа к внутриклеточной области, где они могут связывать RISC при системном введении в виде свободного миРНК или микроРНК. Эти двухцепочечные конструкции могут быть стабилизированы путем включения химически модифицированного нуклеотидного линкера внутрь молекулы, например, фосфоротиоатных групп. Однако, эти химические модификации обеспечивают только ограниченную защиту от нуклеаз расщепления и могут снижать активность конструкции. Внутриклеточная доставка миРНК или микроРНК может быть облегчена путем использования систем переноса, таких как полимеры, катионные липосомы или путем химической модификации конструкции, например, путем ковалентного присоединения молекул холестерина. Тем не менее, улучшение систем доставки необходимо для повышения потенции миРНК и микроРНК молекул и уменьшения или устранения потребности в химической модификации.

Антисмысловые олигонуклеотиды и рибозимы могут также ингибировать мРНК трансляцию в белки. В случае антисмысловых конструкций, эти одноцепочечные диоксинуклеотидные кислоты имеют комплементарные последовательности, что и мРНК белка-мишени и могут связываться с мРНК путем спаривания оснований Уотсона-Крика. Это связывание либо препятствует трансляции мРНК-мишени и / или триггеров РНКазы N деградации мРНК транскриптов. Следовательно, антисмысловые олигонуклеотиды имеют огромный потенциал для специфичности действия (т.е., понижающего регулирования конкретных заболеваний, связанных с белком). На сегодняшний день эти соединения показали себя многообещающими в нескольких *in vitro* и *in vivo* моделях, включая модели воспалительных заболеваний, рака и ВИЧ (см. обзор в Agrawal, *Trends in Biotech.* 14:376-387 (1996)). Антисмысловые также могут влиять на клеточную активность путем гибридизации именно с хромосомной ДНК. Расширенные клинические оценки на людях нескольких антисмысловых препаратов в настоящее время ведутся. Цели этих препаратов включают гены *bcl2* и аполипопротеина В и мРНК продуктов.

Иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты включают дезоксирибонуклеиновые кислоты и рибонуклеиновые кислоты. В случае дезоксирибонуклеиновой кислоты, определение последовательностей или мотивов

показало запрещенную иммунную стимуляцию у млекопитающих. Эти последовательности или мотивы включают CpG мотив, богатые пиримидином последовательности и палиндромные последовательности. Считается, что CpG мотив в дезоксирибонуклеиновой кислоте специфически распознается эндосомальным рецептором, толл-подобным рецептором 9 (TLR 9), который затем запускает как врожденный, так и приобретенный иммунитет путем стимуляции. О некоторых иммуностимулирующих последовательностях рибонуклеиновой кислоты также сообщается. Считается, что эти последовательности РНК могут вызвать иммунную активацию путем связывания с толл-подобными рецепторами 6 и 7 (TLR 6 и TLR 7). Кроме того, двухцепочечные РНК, как также сообщается, могут быть иммуностимулирующими, и они предположительно активируются путем связывания с TLR 3.

Одна известная проблема с использованием терапевтических нуклеиновых кислот относится к устойчивости фосфодиэфирной межнуклеотидной связи и восприимчивостью этого линкера к нуклеазам. Наличие экзонуклеаз и эндонуклеаз в сыворотке крови приводит к быстрому расщеплению нуклеиновых кислот, обладающих фосфодиэфирными линкерами и, следовательно, терапевтические нуклеиновые кислоты могут иметь очень короткий период полураспада в присутствии сыворотки или внутри клеток. (Zelphati, O., *et al.*, *Antisense. Res. Dev.* 3:323-338 (1993); и Thierry, A.R., *et al.*, pp147-161 in *Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA* (Eds. Erickson, RP and Izant, JG; Raven Press, NY (1992)). Терапевтические нуклеиновые кислоты, которые в настоящее время разрабатываются, не используют основной фосфодиэфирной химии в природных нуклеиновых кислотах, из-за этих и других известных проблем.

Эта проблема была частично преодолена химическими модификациями, которые уменьшают сывороточную или внутриклеточную деградацию. Изменения были протестированы на межнуклеотидном фосфодиэфирном мосте (например, используя фосфоротиоатное, метилфосфонатное или фосфорамидатное связывание), в нуклеотидных основаниях (например, 5-пропинилпиримидинов) или на сахаре (например, 2'-модифицированных сахарах) (Uhlmann E., *et al.* *Antisense: Chemical Modifications. Encyclopedia of Cancer*, Vol. X., pp 64-81 Academic Press Inc. (1997)). Другие пытались улучшить стабильность при использовании 2'-5' связывания сахара (см., например, патент США № 5532130). Другие изменения были испробованы. Однако ни одно из этих решений не оказалось вполне удовлетворительным, и *in vivo* свободные терапевтические нуклеиновые кислоты показывают только ограниченную эффективность.

Кроме того, как отмечалось выше, связанные с миРНК и микроРНК проблемы остаются с ограниченными возможностями терапевтических нуклеиновых кислот для пересечения клеточных мембран (см. Vlassov, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1197:95-1082 (1994)) и в проблемах, связанных с системной токсичностью, таких как комплемент-опосредованная анафилаксия, изменения коагуляционных свойств и цитопения (Galbraith, *et al.*, *Antisense Nucl. Acid Drug Des.* 4:201-206 (1994)).

Чтобы попытаться улучшить эффективность, исследователи также использовали липидные системы на базе носителя для доставки химически модифицированных или немодифицированных терапевтических нуклеиновых кислот. В Zelphati, O и Szoka, F.C., *J. Contr. Rel.* 41:99-119 (1996), авторы ссылаются на использование анионных (обычно) липосом, pH чувствительных липосом, иммунолипосом, способных к слиянию липосом и катионных липидов / антисмысловых агрегатов. Точно так же миРНК были введены системно в катионные липосомы, и эти нуклеиновые кислоты - липидные частицы, как сообщается, обеспечивают улучшенное понижающее регулирование целевых белков у млекопитающих, в том числе нечеловеческих приматов (Zimmermann *et al.*, *Nature* 441: 111-114 (2006)).

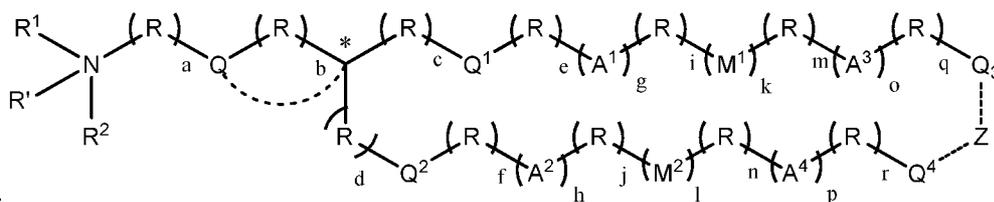
Несмотря на этот прогресс, остается потребность в данной области техники для улучшения липидных терапевтических композиций нуклеиновых кислот, которые подходят для общего терапевтического использования. Предпочтительно, чтобы эти композиции инкапсулировали нуклеиновые кислоты с высокой эффективностью, имели высокое отношение лекарство : липид, защиту инкапсулированной нуклеиновой кислоты от деградации и расщепления в сыворотке крови, были пригодными для системной доставки, а также обеспечивали внутриклеточную доставку инкапсулированной нуклеиновой кислоты. Кроме того, эти липидно - нуклеиновокислотные частицы должны быть хорошо переносимы и обеспечивать адекватный терапевтический индекс, такой, что стационарное лечение в эффективной дозе нуклеиновых кислот не было связано с существенной токсичностью и / или риском для пациента. Композиции, способы получения композиций и способы применения композиций введения нуклеиновых кислот в клетки, в том числе для лечения болезней, приводятся.

### **Сущность изобретения**

Настоящее изобретение относится к катионному липиду, имеющему одну или более биоразлагаемых групп, расположенных в середине или дистальной части липидного

фрагмента (например, гидрофобной цепи) катионных липидов. Эти катионные липиды могут быть включены в липидные частицы для доставки активных агентов, таких как нуклеиновые кислоты (например, мРНК). Включение биоразлагаемых (ой) групп (ы) в катионных липидах приводит в результате к более быстрому обмену веществ и удалению катионных липидов из организма после доставки активного агента в целевую область. В результате эти катионные липиды имеют существенно более низкую токсичность, чем аналогичные катионные липиды без биоразлагаемых групп.

В одном из вариантов воплощения, катионный липид представляет собой соединение



формулы:

Формула (I)

или его соли (например, фармацевтически приемлемой соли),

в котором

$R^1$  отсутствует, водород или алкил (например,  $C_1$ - $C_4$  -алкил);

по отношению к  $R^1$  и  $R^2$ ,

(i)  $R^1$  и  $R^2$  каждый независимо, опционально замещенный алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, циклоалкилалкил или гетероцикл;

(ii)  $R^1$  и  $R^2$  вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют опционально замещенное гетероциклическое кольцо; или

(iii) один из  $R^1$  и  $R^2$  представляет собой опционально замещенный алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, циклоалкилалкил или гетероцикл, и другие формы 4-10 членного гетероциклического кольца или гетероарил (например, 6-членное кольцо) со (a) смежным атомом азота и (b)  $(R)_a$  группой, смежной с атомом азота;

в каждом случае  $R$  является, независимо,  $-(CR^3R^4)-$ ;

в каждом случае  $R^3$  и  $R^4$  представляют собой независимо друг от друга H, OH, алкил, алкокси,  $-NH_2$ , алкиламино или диалкиламино (в одном из предпочтительных вариантов воплощения, в каждом случае,  $R^3$  и  $R^4$  представляют собой независимо друг от друга H или  $C_1$ - $C_4$  -алкил);

или  $R^3$  и  $R^4$  вместе с атомом углерода, к которому они непосредственно присоединены, образуют циклоалкильную группу, причем не более трех групп  $R$  в каждой цепи прикреплено к углероду  $C^*$  являются циклоалкилом (например,

циклопропилом);

пунктирная линия к Q отсутствует или связь;

когда пунктирная линия к Q отсутствует, то Q отсутствует или представляет собой -O-, -NH-, -S-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(R<sup>4</sup>)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)-, -S-S-, -OC(O)O-, -O-N=C(R<sup>5</sup>)-, -C(R<sup>5</sup>)=N-O-, -OC(O)N(R<sup>5</sup>)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)N(R<sup>5</sup>)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)O-, -C(O)S-, -C(S)O- или -C(R<sup>5</sup>)=N-O-C(O)-; или

когда пунктирная линия к Q представляет собой связь, то (i) b = 0, и (ii) Q и третичный углерод, прилегающий к нему (C\*) образуют замещенную или незамещенную, моно- или би-циклическую гетероциклическую группу, имеющую от 5 до 10 кольцевых атомов (например, гетероатомов в гетероциклических группах, выбранных из O и S, предпочтительно O);

Q<sup>1</sup> и Q<sup>2</sup>, каждый независимо, отсутствует, -O-, -S-, -OC(O)-, -C(O)O-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(S)-, -C(S)O-, -S-S-, -C(O)(NR<sup>5</sup>)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)-, -C(S)(NR<sup>5</sup>)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)N(R<sup>5</sup>)- или -OC(O)O-;

Q<sup>3</sup> и Q<sup>4</sup>, каждый независимо, H, -(CR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>)-, арил или фрагмент холестерина; в каждом случае A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup> и A<sup>4</sup>, независимо, -(CR<sup>5</sup>R<sup>5</sup>-CR<sup>5</sup>=CR<sup>5</sup>)-;

в каждом случае R<sup>5</sup> представляет собой, независимо, H или алкил; M<sup>1</sup> и M<sup>2</sup>, каждый независимо, биоразлагаемые группы (например, -OC(O)-, -C(O)O-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(S)-, -C(S)O-, -S-S-, -C(R<sup>5</sup>)=N-, -N=C(R<sup>5</sup>)-, -C(R<sup>5</sup>)=N-O-, -O-N=C(R<sup>5</sup>)-, -C(O)(NR<sup>5</sup>)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)-, -C(S)(NR<sup>5</sup>)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)N(R<sup>5</sup>)-, -OC(O)O-, -OSi(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>O-, -C(O)(CR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>)C(O)O- или -OC(O)(CR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>)C(O)-);

Z отсутствует, алкилен или -O-P(O)(OH)-O-;

каждая ----- прикрепленная к Z является необязательной связью, так что, когда Z отсутствует, Q<sup>3</sup> и Q<sup>4</sup> не непосредственно ковалентно связаны друг с другом;

a = 1, 2, 3, 4, 5 или 6;

b = 0, 1, 2 или 3;

c, d, e, f, i, j, m, n, q и r, каждый независимо, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

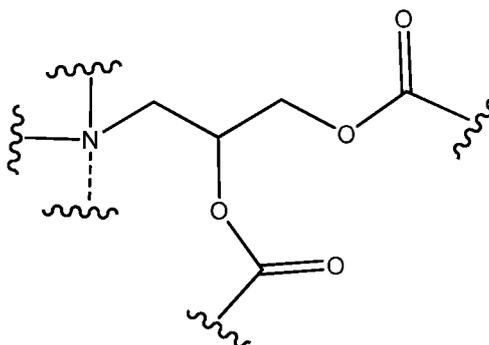
g и h, каждый независимо, 0, 1 или 2;

k и l, каждый независимо, 0 или 1, где по меньшей мере один k и l = 1; и

o и p, каждый независимо, 0, 1 или 2,

в чем

(i) соединение не содержит следующий фрагмент:



---- которая является дополнительной связью; и

(ii)  $Q^3$  и  $Q^4$  являются, каждый независимо, отделенными от третичного атома углерода, отмеченного звездочкой (\*), цепочкой из 8 или более атомов (например, 12 или 14 или более атомов).

В одном варианте воплощения (i)  $R^1$  и  $R^2$  каждый независимо, опционально замещенный алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, циклоалкилалкил или гетероцикл; или (ii)  $R^1$  и  $R^2$  вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют опционально замещенное гетероциклическое кольцо.

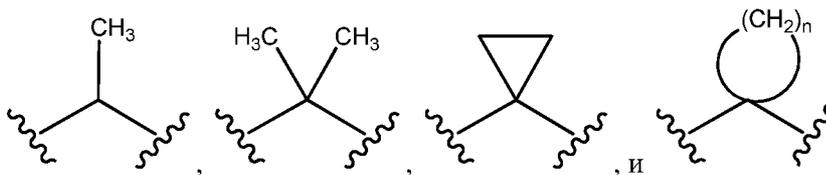
В предпочтительном варианте воплощения соединение формулы (I),

(a) когда  $Q^1$  представляет собой биоразлагаемую группу (например,  $-C(O)O-$ ), то  $d$  равно по меньшей мере 4;

(b) когда  $Q^2$  представляет собой биоразлагаемую группу, то  $d$  равно по меньшей мере 4; и

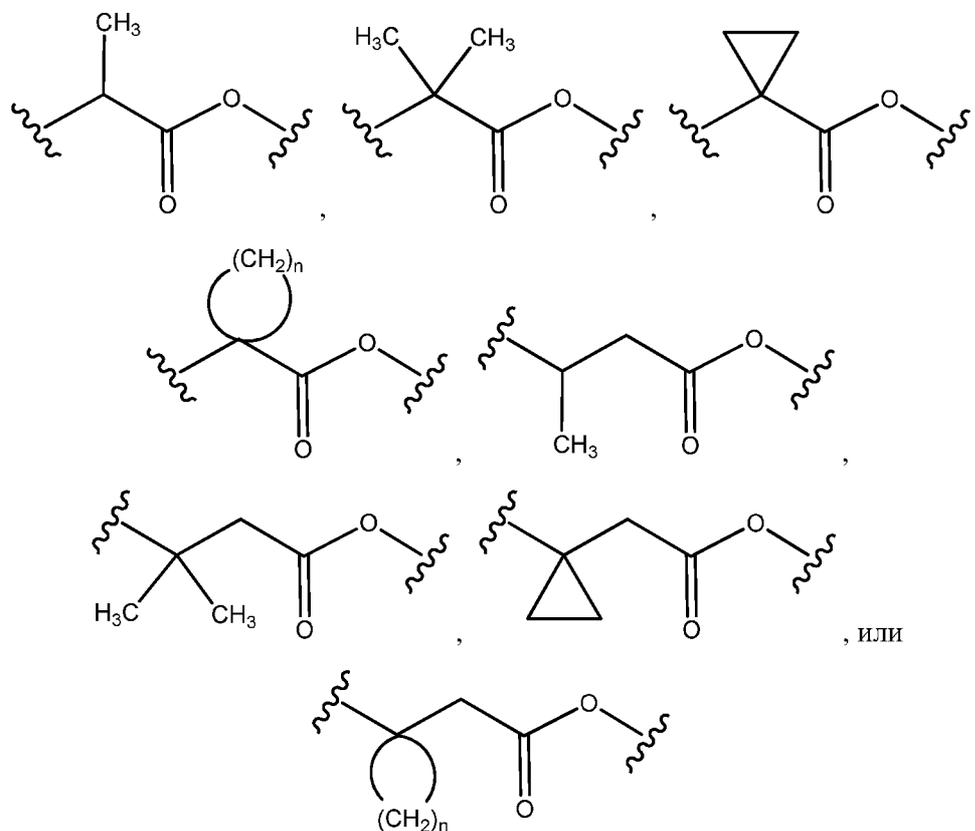
(c)  $Q^3$  и  $Q^4$  являются, каждый независимо, отделенными от третичного атома углерода, отмеченного звездочкой (\*), цепью из 10 или более атомов (например, 12 или 14 или более атомов).

В другом предпочтительном варианте воплощения, альфа- или бета- атом углерода биоразлагаемой группы (например,  $-C(O)O-$ ) в формуле (I) могут быть замещены одной или двумя алкильными группами (например, одной  $C_1-C_4$ -алкил, такими как  $-CH_3$  заместителем, или двумя  $C_1-C_4$ -алкильными группами, такими, как два  $-CH_3$  заместителя), или спироциклическими группами (например,  $C_3-C_5$  циклоалкил, такими как  $C_3$  циклоалкил). Например, альфа- или бета- атом углерода биоразлагаемой группы может быть независимо выбран из



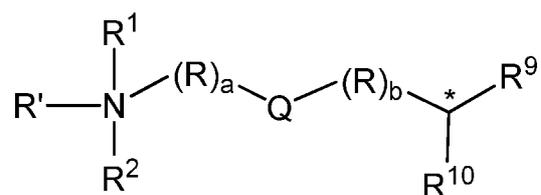
(где  $n = 4-6$ ).

В одном варианте воплощения  $M^1$  или  $M^2$  группы и соседняя (ие) переменная (ые) образуют группу:



(где  $n = 4-6$ ).

Еще одним вариантом воплощения является катионный липид формулы



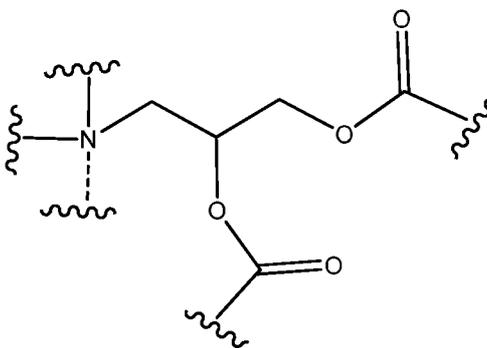
Формула (IA-1)

или его соли (например, фармацевтически приемлемой соли), в котором  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R$ ,  $a$  и  $b$  такие, как определено в формуле (I);

$Q$  отсутствует или представляет собой  $-O-$ ,  $-NH-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)N(R^4)-$ ,  $-N(R^5)C(O)-$ ,  $-S-S-$ ,  $-OC(O)O-$ ,  $-O-N=C(R^5)-$ ,  $-C(R^5)=N-O-$ ,  $-OC(O)N(R^5)-$ ,  $-N(R^5)C(O)N(R^5)-$ ,  $-N(R^5)C(O)O-$ ,  $-C(O)S-$ ,  $-C(S)O-$  или  $-C(R^5)=N-O-C(O)-$ ;

$R'$  - отсутствует, водород или алкил (например,  $C_1$ - $C_4$  -алкил); и  
 каждый из  $R^9$  и  $R^{10}$  независимо друг от друга  $C_{12}$ - $C_{24}$  алкил (например,  $C_{12}$ - $C_{20}$   
 алкил),  $C_{12}$ - $C_{24}$  алкенил (например,  $C_{12}$ - $C_{20}$  алкенил) или  $C_{12}$ - $C_{24}$  алкокси (например,  $C_{12}$ -  
 $C_{20}$  алкокси), имеющие одну или несколько биоразлагаемых групп; каждая  
 биоразлагаемая группа самостоятельно оканчивается  $C_{12}$ - $C_{24}$  алкилом, алкенилом или  
 алкоксигруппой или замещена в конце  $C_{12}$ - $C_{24}$  алкилом, алкенилом или алкоксигруппой,  
 где

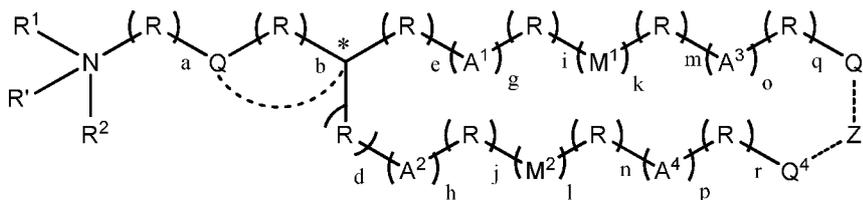
(i) соединение не содержит следующий фрагмент:



где ---- является дополнительной связью, и

(ii) концы  $R_9$  и  $R_{10}$  отделены от третичного атома углерода, отмеченного звездочкой (\*), цепочкой из 8 или более атомов (например, 12 или 14 или более атомов).

В другом варианте воплощения, катионный липид представляет собой соединение формулы:



Формула (IA-2)

или его соли (например, фармацевтически приемлемой соли), в котором

$R'$  - отсутствует, водород или алкил (например,  $C_1$ - $C_4$  -алкил);

$R^1$  и  $R^2$ , каждый независимо, опционально замещенный  $C_1$ - $C_4$  -алкил,  $C_2$ - $C_4$  -  
 алкенил,  $C_2$ - $C_4$  алкинил,  $C_3$ - $C_6$  циклоалкил, ( $C_3$ - $C_6$  -циклоалкил)  $C_1$ - $C_4$  -алкил или  
 моноциклический гетероцикл; или

$R^1$  и  $R^2$  вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют  
 опционально замещенное 5 - или 6-членное гетероциклическое кольцо (например,  $C_5$  и  $C_6$

гетероциклическое кольцо);

в каждом случае R является, независимо,  $-(CR^3R^4)-$ ;

в каждом случае  $R^3$  и  $R^4$  - независимо друг от друга H, OH, алкил, алкокси,  $-NH_2$ , алкиламино или диалкиламино (в одном из предпочтительных вариантов воплощения, в каждом случае,  $R^3$  и  $R^4$  являются, независимо друг от друга, H или  $C_1$ - $C_4$ -алкил);

или  $R^3$  и  $R^4$  вместе с атомом углерода, к которому они непосредственно присоединены, образуют  $C_3$ - $C_6$  циклоалкильную группу, причем не более трех групп R в каждой цепи прикреплены к углероду  $C^*$  и являются циклоалкилом (например, циклопропилом);

пунктирная линия к Q отсутствует или связь;

когда пунктирная линия к Q отсутствует, Q отсутствует или представляет собой -O-,  $-NH-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)N(R^4)-$ ,  $-N(R^5)C(O)-$ ,  $-S-S-$ ,  $-OC(O)O-$ ,  $-O-N=C(R^5)-$ ,  $-C(R^5)=N-O-$ ,  $-OC(O)N(R^5)-$ ,  $-N(R^5)C(O)N(R^5)-$ ,  $-N(R^5)C(O)O-$ ,  $-C(O)S-$ ,  $-C(S)O-$  или  $-C(R^5)=N-O-C(O)-$ ; или

когда пунктирная линия к Q представляет собой связь, b равен 0, а Q и третичный углерод, прилегающий к нему ( $C^*$ ), образуют замещенную или незамещенную, моно-или би-циклические гетероциклические группы, имеющие от 5 до 10 кольцевых атомов (например, гетероатомы в гетероциклической группе выбраны из O и S, предпочтительно O);

$Q^3$  и  $Q^4$  являются, каждый независимо, H,  $-(CR^3R^4)-$ , арил или фрагмент холестерина;

в каждом случае  $A^1$ ,  $A^2$ ,  $A^3$  и  $A^4$  являются, независимо,  $-(CR^5R^5-CR^5=CR^5)-$ ; в каждом случае  $R^5$  представляет собой, независимо, H или алкил;

$M^1$  и  $M^2$  являются, каждый независимо,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(R^5)=N-$ ,  $-C(R^5)=N-O-$ ,  $-O-C(O)O-$ ,  $-C(O)N(R^5)-$ ,  $-C(O)S-$ ,  $-C(S)O-$ ,  $-OSi(R^5)_2O-$ ,  $-C(O)(CR^3R^4)C(O)O-$  или  $-OC(O)(CR^3R^4)C(O)-$ ;

Z - отсутствует, алкилен или  $-O-P(O)(OH)-O-$ ;

каждая ----- прикрепленная к Z является необязательной связью, так что, когда Z отсутствует,  $Q^3$  и  $Q^4$  не непосредственно ковалентно связаны друг с другом;

a = 1, 2, 3, 4, 5 или 6;

b = 0, 1, 2 или 3;

d, e, i, j, m, n, q и r являются, каждый независимо, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

g и h, каждый независимо, 0, 1 или 2;

сумма d + 3h, по меньшей мере 4, и сумма e + 3g составляет по меньшей мере 4;

$k$  и  $l$ , каждый независимо, 0 или 1, где по меньшей мере один  $k$  и  $l = 1$ ; и  $o$  и  $p$ , каждый независимо, 0, 1 или 2,

где  $Q^3$  и  $Q^4$  являются, каждый независимо, отделенными от третичного атома углерода, отмеченного звездочкой (\*), цепочкой из 8 или более атомов (например, 12 или 14 или более атомов).

В одном варианте воплощения  $R'$  в формуле (IA-2) отсутствует или является водородом. В одном варианте воплощения  $R'$  в формуле (IA-2) отсутствует или является алкилом (например, метилом).

В одном варианте воплощения  $R^1$  и  $R^2$  в формуле (IA-2), каждый независимо, являются  $C_1$ - $C_4$ -алкилом (например, метилом или этилом).

В одном варианте воплощения в каждом случае  $R$  в формуле (IA-2) является, независимо,  $-CH_2-$  или  $-CH(CH_3)-$ .

В одном из вариантов воплощения,  $Q^3$  и  $Q^4$  в формуле (IA-2) являются, каждый независимо, H, арилом или фрагментом холестерина.

В одном варианте воплощения в каждом случае  $A^1$ ,  $A^2$ ,  $A^3$  и  $A^4$  в формуле (IA-2) является, независимо,  $-(CH_2-CH=CH)-$ ;

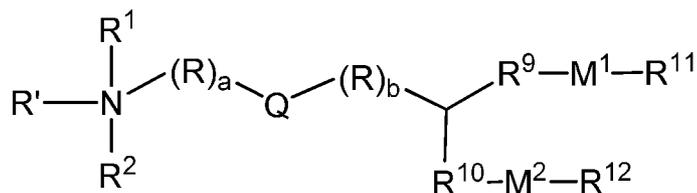
В одном из вариантов воплощения,  $M^1$  и  $M^2$  в формуле (IA-2), являются каждый -C(O)-O-.

В одном варианте воплощения соединения формулы (IA-2), Z отсутствует, и каждая ----- отсутствует (т.е.,  $Q^3$  и  $Q^4$  не являются непосредственно ковалентно связанными друг с другом).

В одном варианте воплощения сумма  $e+3g+i+m+3o+q$  в формуле (IA-2) составляет примерно от 8 до примерно 20. В другом варианте воплощения сумма  $e+3g+i+m+3o+q$  в формуле (IA-2) составляет от около 12 до около 20.

В одном из вариантов воплощения, сумма  $d+3h+j+n+3r+g$  в формуле (IA-2) составляет примерно от 8 до примерно 20. В другом варианте воплощения сумма  $d+3h+j+n+3r+g$  в формуле (IA-2) составляет от около 12 до около 20.

В другом варианте воплощения, катионный липид представляет собой соединение формулы



Формула (IB)

где

$\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}$ ,  $a$ ,  $b$ ,  $\text{M}^1$  и  $\text{M}^2$  такие, как определено в формуле (I);

$\text{Q}$  отсутствует или представляет собой  $-\text{O}-$ ,  $-\text{NH}-$ ,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^4)-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{S}-\text{S}-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{N}=\text{C}(\text{R}^5)-$ ,  $-\text{C}(\text{R}^5)=\text{N}-\text{O}-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^5)-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^5)-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{S}-$ ,  $-\text{C}(\text{S})\text{O}-$  или  $-\text{C}(\text{R}^5)=\text{N}-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$ ;

$\text{R}'$  - отсутствует, водород или алкил (например,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$  -алкил);

каждый из  $\text{R}^9$  и  $\text{R}^{10}$  независимо представляют собой алкилен или алкенилен; и

каждый из  $\text{R}^{11}$  и  $\text{R}^{12}$  независимо представляют собой алкил или алкенил, опционально заканчивающийся  $\text{COOR}^{13}$ , где каждый  $\text{R}^{13}$  независимо представляет собой алкил (например,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$  -алкил, такой как метил или этил);

$\text{R}^9$ ,  $\text{M}^1$  и  $\text{R}^{11}$  содержат вместе по меньшей мере 8 атомов углерода в длину (например, 12 или 14 атомов углерода и более); а также

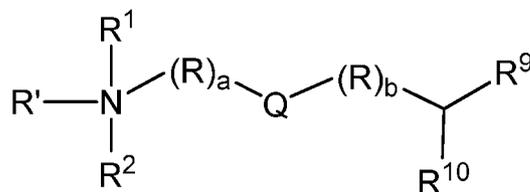
$\text{R}^{10}$ ,  $\text{M}^2$  и  $\text{R}^{12}$  содержат вместе по меньшей мере 8 атомов углерода в длину (например, 12 или 14 атомов углерода и более).

В предпочтительном варианте воплощения соединения формулы (IB),  $\text{R}^9$  и  $\text{R}^{10}$  - независимо друг от друга  $\text{C}_4$ - $\text{C}_{12}$  алкилен или  $\text{C}_4$ - $\text{C}_{12}$  алкенилен,  $\text{M}^1$  и  $\text{M}^2$  -  $\text{C}(\text{O})\text{O}-$ , и  $\text{R}^{11}$  и  $\text{R}^{12}$  -  $\text{C}_4$ - $\text{C}_{12}$  алкилен или  $\text{C}_4$ - $\text{C}_{12}$  алкенилен. В одном из вариантов воплощения  $\text{R}^9$ ,  $\text{M}^1$  и  $\text{R}^{11}$  содержат вместе от 12 до 24 атомов углерода в длину. В другом варианте воплощения  $\text{R}^9$ ,  $\text{M}^1$  и  $\text{R}^{11}$  содержат вместе от 14 до 18 атомов углерода в длину. В одном из вариантов воплощения  $\text{R}^{10}$ ,  $\text{M}^2$  и  $\text{R}^{12}$  составляют вместе от 12 до 24 атомов углерода в длину. В другом варианте воплощения  $\text{R}^{10}$ ,  $\text{M}^2$  и  $\text{R}^{12}$  составляют вместе от 14 до 18 атомов углерода в длину.

$\text{R}'\text{R}^1\text{R}^2\text{N}(\text{R})_a\text{Q}(\text{R})_b$  - группа может быть любой из головных групп, описанных здесь, в том числе из показанных в Таблице 1 ниже, и их соли. В одном предпочтительном

варианте воплощения,  $R'R^1R^2N-(R)_a-Q-(R)_b$  является  $(CH_3)_2N-(CH_2)_3-C(O)O-$ ,  $(CH_3)_2N-(CH_2)_2-NH-C(O)O-$ ,  $(CH_3)_2N-(CH_2)_2-OC(O)-NH-$  или  $(CH_3)_2N-(CH_2)_3-C(CH_3)=N-O-$ .

В еще одном варианте воплощения, катионный липид представляет собой соединение формулы



Формула (IC)

где

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R$ ,  $a$  и  $b$  такие, как определено в формуле (I);

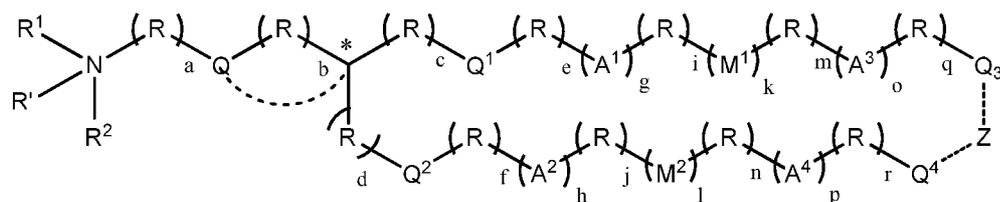
$Q$  отсутствует или представляет собой  $-O-$ ,  $-NH-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)N(R^4)-$ ,  $-N(R^5)C(O)-$ ,  $-S-S-$ ,  $-OC(O)O-$ ,  $-O-N=C(R^5)-$ ,  $-C(R^5)=N-O-$ ,  $-OC(O)N(R^5)-$ ,  $-N(R^5)C(O)N(R^5)-$ ,  $-N(R^5)C(O)O-$ ,  $-C(O)S-$ ,  $-C(S)O-$  или  $-C(R^5)=N-O-C(O)-$ ;  $R'$  отсутствует, или представляет собой водород или алкил (например,  $C_1-C_4$ -алкил);

каждый из  $R^9$  и  $R^{10}$  являются независимо друг от друга  $C_{12}-C_{24}$  алкилом или алкенилом, замещенным на его конце биоразлагаемой группой, такой как  $-COOR^{13}$ , где каждый  $R^{13}$  независимо представляет собой алкил (предпочтительно  $C_1-C_4$ -алкил, такой как метил или этил).

В предпочтительном варианте воплощения соединение формулы (IC),  $R^9$  и  $R^{10}$  являются, каждый независимо,  $C_{14}-C_{18}$  алкиленом или  $C_{14}-C_{18}$  алкениленом. В другом предпочтительном варианте воплощения, биоразлагаемая группа  $-COOR^{13}$ , где  $R^{13}$  представляет собой  $C_1-C_4$ -алкил (например, метил или этил).

$R'R^1R^2N-(R)_a-Q-(R)_b$ -группа может быть любой из головных групп, описанных здесь, в том числе как показано в Таблице 1 ниже. В одном предпочтительном варианте воплощения,  $R'R^1R^2N-(R)_a-Q-(R)_b$  является  $(CH_3)_2N-(CH_2)_3-C(O)O-$ ,  $(CH_3)_2N-(CH_2)_2-NH-C(O)O-$ ,  $(CH_3)_2N-(CH_2)_2-OC(O)-NH-$  или  $(CH_3)_2N-(CH_2)_3-C(CH_3)=N-O-$ .

Еще одним вариантом воплощения являются интермедиаты по формуле:



## Формула (ID)

или их соли (например, фармацевтически приемлемой соли),

где

R' отсутствует, или является водородом или алкилом (например, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> -алкилом);

R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup>, каждый независимо, опционально замещенный алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, циклоалкилалкил или гетероцикл; или

R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют опционально замещенное гетероциклическое кольцо;

в каждом случае R является, независимо, -(CR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>)-;

в каждом случае R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> независимо друг от друга - H, OH, алкил, алкокси, -NH<sub>2</sub>, алкиламино или диалкиламино (в одном из предпочтительных вариантов воплощения, в каждом случае, R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> независимо друг от друга - H или алкил);

или R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> вместе с атомом углерода, к которому они непосредственно присоединены, образуют циклоалкильную группу, причем не более трех групп R в каждой цепи прикреплено к углероду C\* являются циклоалкилом (например, циклопропил);

пунктирная линия к Q отсутствует или связь;

когда пунктирная линия к Q отсутствует, Q отсутствует или представляет собой -O-, -NH-, -S-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(R<sup>4</sup>)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)-, -S-S-, -OC(O)O-, -O-N=C(R<sup>5</sup>)-, -C(R<sup>5</sup>)=N-O-, -OC(O)N(R<sup>5</sup>)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)N(R<sup>5</sup>)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)O-, -C(O)S-, -C(S)O- или -C(R<sup>5</sup>)=N-O-C(O)-; или

когда пунктирная линия к Q представляет собой связь, b равен 0, а Q и третичный углерод, прилегающий к нему (C\*), образуют замещенную или незамещенную, моно- или би-циклическую гетероциклическую группу, имеющую от 5 до 10 кольцевых атомов (например, гетероатомы в гетероциклической группе выбраны из O и S, предпочтительно O);

Q<sup>1</sup> и Q<sup>2</sup>, каждый независимо, отсутствует или является -O-, -S-, -OC(O)-, -C(O)O-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(S)-, -C(S)O-, -S-S-, -C(O)(NR<sup>5</sup>)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)-, -C(S)(NR<sup>5</sup>)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)N(R<sup>5</sup>)- или -OC(O)O-;

Q<sup>3</sup> и Q<sup>4</sup>, каждый независимо, является H, -(CR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>)-, арилом, -OH или фрагментом холестерина;

в каждом случае A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup> или A<sup>4</sup> являются, независимо, -(CR<sup>5</sup>R<sup>5</sup>-CR<sup>5</sup>=CR<sup>5</sup>)-;

в каждом случае R<sup>5</sup> представляет собой, независимо, H или алкил;

M<sup>1</sup> и M<sup>2</sup>, каждый независимо, представляет собой биоразлагаемые группы (например, -OC(O)-, -C(O)O-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(S)-, -C(S)O-, -S-S-, -C(R<sup>5</sup>)=N-, -

$N=C(R^5)-$ ,  $-C(R^5)=N-O-$ ,  $-O-N=C(R^5)-$ ,  $-C(O)(NR^5)-$ ,  $-N(R^5)C(O)-$ ,  $-C(S)(NR^5)-$ ,  $-N(R^5)C(O)-$ ,  $-N(R^5)C(O)N(R^5)-$ ,  $-OC(O)O-$ ,  $-OSi(R^5)_2O-$ ,  $-C(O)(CR^3R^4)C(O)O-$  или  $-OC(O)(CR^3R^4)C(O)-$ ;

Z отсутствует, или является алкиленом или  $-O-P(O)(OH)-O-$ ;

каждая ----- прикрепленная к Z является необязательной связью, так что, когда Z отсутствует,  $Q^3$  и  $Q^4$  не непосредственно ковалентно связаны друг с другом;

a = 1, 2, 3, 4, 5 или 6;

b = 0, 1, 2 или 3;

c, d, e, f, i, j, m, n, q и r, каждый независимо, являются 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

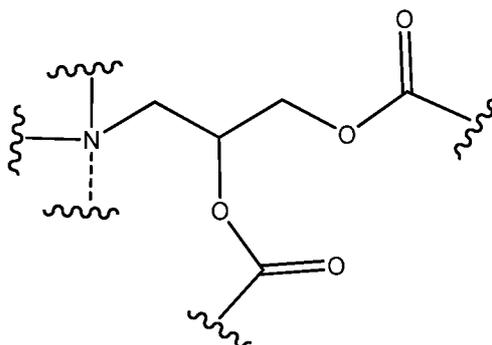
g и h, каждый независимо, являются 0, 1 или 2;

k и l, каждый независимо, являются 0 или 1;

o и p, каждый независимо, являются 0, 1 или 2,

где

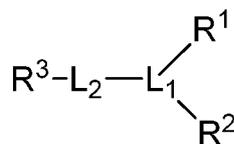
(i) соединение не содержит следующий фрагмент:



где ---- является дополнительной связью; и

(ii)  $Q^3$  и  $Q^4$  являются, каждый независимо, отделенными от третичного атома углерода, отмеченного звездочкой (\*), цепочкой из 8 или более атомов (например, 12 или 14 или более атомов).

В еще одном варианте воплощения, катионный липид представляет собой соединение формулы IE:



## Формула (IE)

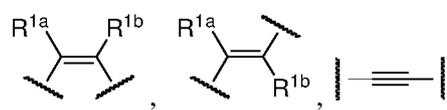
или его соли (например, фармацевтически приемлемой соли),

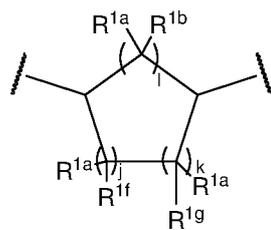
где

$R^1$  представляет собой  $C_{10}$  к  $C_{30}$  группу, имеющую формулу  $-L^{1a}-(CR^{1a}R^{1b})_a-[L^{1b}-(CR^{1a}R^{1b})_b]-L^{1c}-R^{1c}$ , где  $L^{1a}$  представляет собой связь,  $-CR^{1a}R^{1b}$ -,  $-O$ -,  $-CO$ -,  $-NR^{1d}$ -,  $-S$ - или их комбинацию;

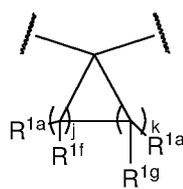
каждый  $R^{1a}$  и каждый  $R^{1b}$ , независимо, представляет собой H, гало, гидроксид, циано,  $C_1$ - $C_6$ -алкил, опционально замещенный галогеном, гидроксид или алкокси,  $C_3$ - $C_8$  циклоалкил, опционально замещенный галогеном, гидроксид или алкокси;  $-OR^{1c}$ ;  $-NR^{1c}R^{1d}$ ; арил, гетероарил или гетероцикл;

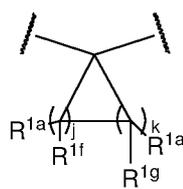
каждый  $L^{1b}$ , независимо, представляет собой связь,  $-(CR^{1a}R^{1b})_{1-2}$ -,  $-O$ -,  $-CO$ -,  $-NR^{1d}$ -,

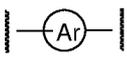
$-S$ -,  или их комбинации; или может иметь формулу

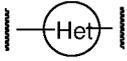


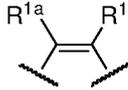
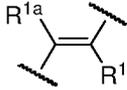
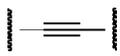
где  $j$ ,  $k$  и  $l$  являются независимо друг от друга 0, 1, 2 или 3, при условии, что сумма  $j$ ,  $k$  и  $l$  составляет не менее 1 и не более 8, а  $R^{1f}$  и  $R^{1g}$  являются независимо друг от друга  $R^{1b}$ , или соседними  $R^{1f}$  и  $R^{1g}$ , связанными вместе через опциональную связь;



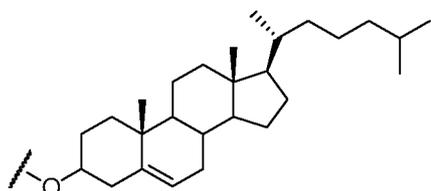
или может иметь формулу  где  $j$ ,  $k$  и  $l$  являются независимо друг от друга 0, 1, 2, 3 или 4, при условии, что сумма  $j$  и  $k$  составляет не менее 1; и  $R^{1f}$  и  $R^{1g}$  являются независимо друг от друга  $R^{1b}$ , или соседними  $R^{1f}$  и  $R^{1g}$ , связанными вместе через опциональную связь;

или может иметь формулу:  где  $-Ar$ - является от 6 до 14 членной ариленовой группой, опционально замещенной от нуля до 6 независимыми  $R^{1a}$  группами;

или может иметь формулу:  где -Het- является от 3 до 14 членной гетероциклической или гетероариленовой группой, опционально замещенной от нуля до 6 независимыми R<sup>1a</sup> группами;

L<sup>1c</sup> является -(CR<sup>1a</sup>R<sup>1b</sup>)<sub>1-2</sub>-, -O-, -CO-, -NR<sup>1d</sup>-, -S-, , ,  или их комбинацией;

R<sup>1c</sup> является H; гало; гидрокси; циано; C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилом опционально замещенным гало, гидрокси, алкокси или арилом; C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкилом опционально замещенным гало, гидрокси, алкокси или арилом; арил; гетероарил; или гетероциклил; или R<sup>1c</sup> который

имеет формулу:  ;

R<sup>1d</sup> является H; гало; гидрокси; циано; C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилом опционально замещенным гало, гидрокси или алкокси; C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкилом опционально замещенным гало, гидрокси или алкокси; арил; гетероарил; или гетероциклил;

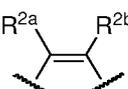
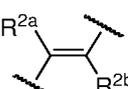
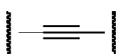
α является 0-6, включительно;

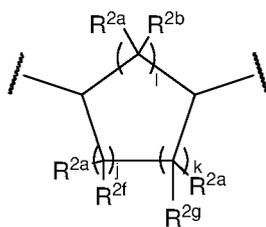
каждая β, независимо, является 0-6, включительно;

γ является 0-6, включительно;

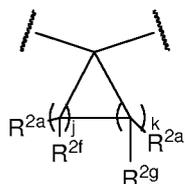
R<sup>2</sup> представляет собой от C<sub>10</sub> до C<sub>30</sub> группу, имеющую формулу -L<sup>2a</sup>-(CR<sup>2a</sup>R<sup>2b</sup>)<sub>δ</sub>-[L<sup>2b</sup>-(CR<sup>2a</sup>R<sup>2b</sup>)<sub>ε</sub>]-L<sup>2c</sup>-R<sup>2c</sup>, где L<sup>2a</sup> представляет собой связь, -CR<sup>2a</sup>R<sup>2b</sup>-, -O-, -CO-, -NR<sup>2d</sup>-, -S- или их комбинацию;

каждый R<sup>2a</sup> и каждый R<sup>2b</sup>, независимо, может быть H; гало, гидрокси, циано, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкилом, опционально замещенным галогеном, гидрокси или алкокси; C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкилом, опционально замещенным галогеном, гидрокси или алкокси; -OR<sup>2c</sup>; -NR<sup>2c</sup>R<sup>2d</sup>; арил, гетероарил или гетероциклил;

каждый L<sup>2b</sup>, независимо, может быть связью, -(CR<sup>2a</sup>R<sup>2b</sup>)<sub>1-2</sub>-, -O-, -CO-, -NR<sup>2d</sup>-, -S-, , ,  или их комбинацией;



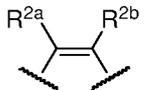
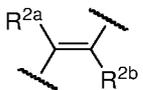
или может иметь формулу  $\text{---}(\text{---})^j\text{---}(\text{---})^k\text{---}(\text{---})^l\text{---}$  где j, k и l являются независимо друг от друга 0, 1, 2 или 3, при условии, что сумма j, k и l составляет не менее 1 и не более 8; а  $R^{2f}$  и  $R^{2g}$  являются независимо друг от друга  $R^{2b}$ , или соседними  $R^{2f}$  и  $R^{2g}$ , связанными вместе через опциональную связь;



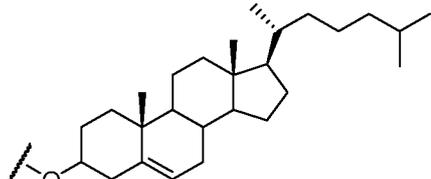
или может иметь формулу  $\text{---}(\text{---})^j\text{---}(\text{---})^k\text{---}$  где j и k являются независимо друг от друга 0, 1, 2, 3 или 4, при условии, что сумма j и k составляет не менее 1; и  $R^{2f}$  и  $R^{2g}$  являются независимо друг от друга  $R^{2b}$ , или соседними  $R^{2f}$  и  $R^{2g}$ , связанными вместе через опциональную связь;

или может иметь формулу:  $\text{---}(\text{Ar})\text{---}$  где -Ar- является от 6 до 14 членной ариленовой группой, опционально замещенной от нуля до 6 независимыми  $R^{2a}$  группами;

или может иметь формулу:  $\text{---}(\text{Het})\text{---}$  где -Het- является от 3 до 14 членной гетероциклиленовой или гетероариленовой группой, опционально замещенной от нуля до 6 независимыми  $R^{2a}$  группами;

$L^{2c}$  является  $-(CR^{2a}R^{2b})_{1-2}$ -, -O-, -CO-, -NR<sup>2d</sup>-, -S-, , ,  $\text{---}\equiv\text{---}$  или их комбинацией;

$R^{2c}$  является H; гало; гидроксид; циано; C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилом опционально замещенным гало, гидроксид, алкокси или арилом; C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкилом опционально замещенным гало, гидроксид, алкокси или арилом; арил; гетероарил; или гетероцикл; или  $R^{2c}$  который

имеет формулу:  ;

$R^{2d}$  является H; гало; гидроксид; циано;  $C_1$ - $C_6$  алкилом опционально замещенным гало, гидроксид или алкокси;  $C_3$ - $C_8$  циклоалкилом опционально замещенным гало, гидроксид или алкокси; арил; гетероарил; или гетероцикл;

$\delta$  является 0-6, включительно;

каждая  $\epsilon$ , независимо, является 0-6, включительно;

$\zeta$  является 0-6, включительно;

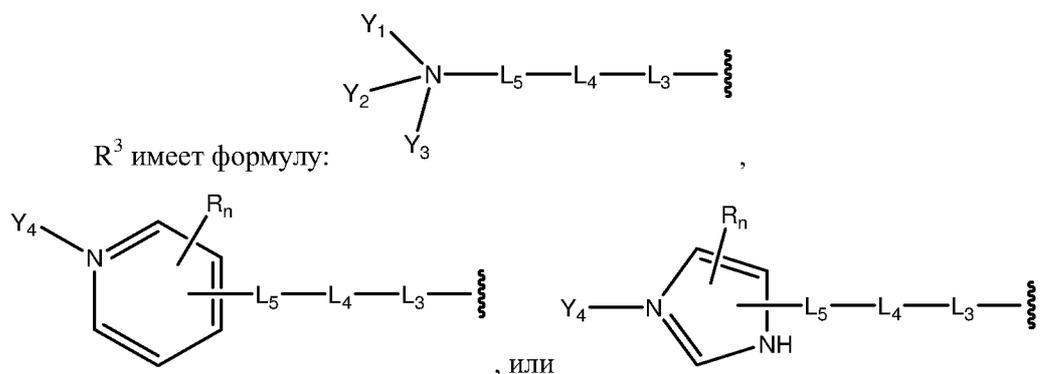
$L_1$  является  $C(R^a)$ ,  $-(CR^5R^6)_x C(R^a)-$  или  $P(Q_2)$ ;

$R^a$  является H, алкилом, алкокси, -OH, -N(Q)Q или -SQ;

$L_2$  является  $-(CR^5R^6)_x-$ ,  $-C(O)-(CR^5R^6)_x-$ ,  $-(CR^5R^6)_x-C(O)-$ ,  $-(CR^5R^6)_x-CR^5=CR^5-(CR^5R^6)_y-$ ,  $-C(O)-(CR^5R^6)_x-CR^5=CR^5-(CR^5R^6)_y-$ ,  $-(CR^5R^6)_x-CR^5=CR^5-(CR^5R^6)_y-C(O)-$ , -O-, -S-, -N(Q)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)-, -N(Q)C(O)-, -C(O)N(Q)-, -N(Q)C(O)O-, -OC(O)N(Q)-, S(O), -N(Q)S(O)<sub>2</sub>N(Q)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(Q)S(O)<sub>2</sub>-, -SS-, -O-N=, =N-O-, -C(O)-N(Q)-N=, -N(Q)-N=, -N(Q)-O-, -C(O)S-, арилен, гетероарил, циклоалкилен или гетероциклилен;

каждый  $x$ , независимо, может быть 0-6, включительно;

каждый  $y$ , независимо, может быть 0-6, включительно;



$Y_1$  представляет собой алкил, циклоалкил, арил, аралкил или алкинил, где  $Y_1$  опционально замещен от 0 до 6 независимых  $R_n$ ;

$Y_2$  представляет собой алкил, циклоалкил, арил, аралкил или алкинил, где  $Y_2$  опционально замещен от 0 до 6 независимых  $R_n$ ;

$Y_3$  отсутствует, или, если он присутствует, алкил, циклоалкил, арил, аралкил или алкинил, где  $Y_3$  опционально замещен от 0 до 6 независимых  $R_n$ ;

$Y_4$  отсутствует, или, если он присутствует, алкил, циклоалкил, арил, аралкил или алкинил, где  $Y_4$  опционально замещен от 0 до 6 независимых  $R_n$ ;

или любые два из  $Y_1$ ,  $Y_2$  и  $Y_3$ , взятые вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют от 3 до 8 членный гетероцикл, опционально замещенный от 0 до

6 независимых  $R_n$ ;

или  $Y_1$ ,  $Y_2$  и  $Y_3$  все, взятые вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют бициклический от 5 до 12 членный гетероцикл, опционально замещенный от 0 до 6 независимых  $R_n$ ;

каждый  $R_n$ , независимо, может быть H, галоген, циано, гидроксигруппа, амино, алкил, алкокси, циклоалкил, арил, гетероарил или гетероциклил;

$L_3$  представляет собой связь,  $-N(Q)-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-(CR_7R_8)_a-$ ,  $-C(O)-$ , или сочетание любых двух из них;

$L_4$  представляет собой связь,  $-N(Q)-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-(CR_7R_8)_a-$ ,  $-C(O)-$ , или сочетание любых двух из них;

$L_5$  является связью,  $-N(Q)-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-(CR_7R_8)_a-$ ,  $-C(O)-$ , или сочетанием любых двух из них;

в каждом случае  $R_7$  и  $R_8$  являются независимо H, галогеном, циано, гидроксигруппа, амино, алкилом, алкокси, циклоалкил, арил, гетероарил или гетероциклил;

или две  $R_7$  группы на соседних атомах углерода могут быть взяты вместе с образованием двойной связи между их атомами углерода;

или две  $R_7$  группы на соседних атомах углерода и две группы  $R_8$  на тех же соседних атомах углерода могут быть взяты вместе с образованием тройной связи между их атомами углерода;

или  $R_7$  и  $R_8$  заместитель в любом из  $L_3$ ,  $L_4$  или  $L_5$  опционально может быть связан с  $R_7$  или  $R_8$  заместителем из любого  $L_3$ ,  $L_4$  или  $L_5$  с образованием 3 до 8 членной циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил группы;

или один из  $Y_1$ ,  $Y_2$  или  $Y_3$ , опционально может быть связан вместе с  $R_7$  или  $R_8$  группой из любого  $L_3$ ,  $L_4$  или  $L_5$  и атомами, к которым они присоединены, с образованием 3 до 8 членной гетероциклил группы;

каждый a, независимо, может быть 0, 1, 2 или 3;

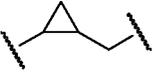
в каждом случае  $R_5$  и  $R_6$  могут быть, независимо, H, галоген, циано, гидроксигруппа, амино, алкил, алкокси, циклоалкил, арил, гетероарил или гетероциклил;

каждый Q независимо представляет собой H, алкил, ацил, циклоалкил, алкенил, алкинил, арил, гетероарил или гетероциклил; и

Каждый  $Q_2$ , независимо, представляет собой O, S,  $N(Q)Q$ , алкил или алкокси.

В некоторых вариантах воплощения  $L_1$  может быть  $-C(R_5R_6)_x C(R_a)-$ ; или  $L_1$  может быть  $-CH_2-C(R_a)-$ .  $L_2$  может быть  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-N(Q)C(O)-$ ,  $-C(O)N(Q)-$ ,  $-N(Q)C(O)O-$ ,  $-OC(O)N(Q)-$ ,  $-SS-$ ,  $-O-N=$  или  $=N-O-$ .  $L_2$  может быть  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-SS-$  или  $=N-O-$ .

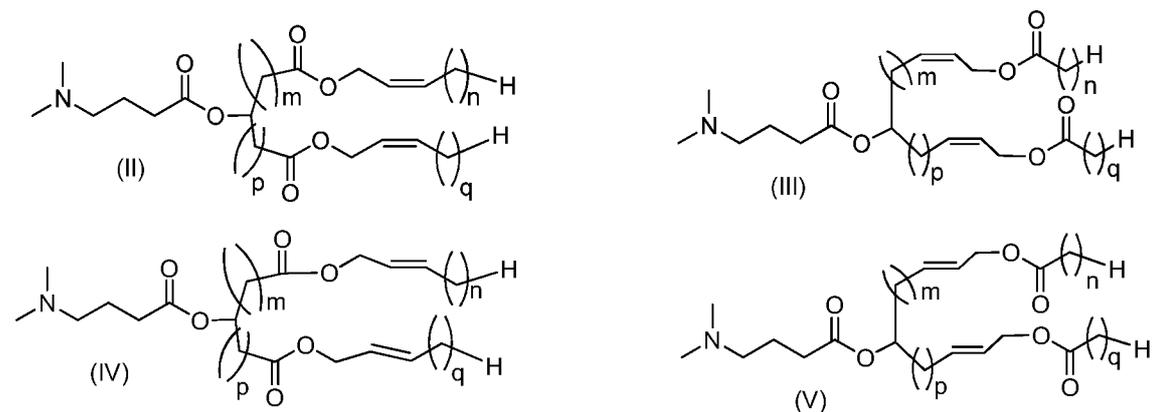
В некоторых вариантах воплощения  $-L^{1a}-(CR^{1a}R^{1b})_{\alpha}-$  может быть  $-(CH_2)_8-$ .  $L^{2a}-(CR^{2a}R^{2b})_{\delta}-$  может быть  $-(CH_2)_8-$ .  $L^{1b}-(CR^{1a}R^{1b})_{\beta}$  может быть  $CH_2CH_2CH_2$ ,  $CH=CH-CH_2$

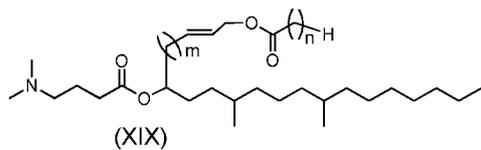
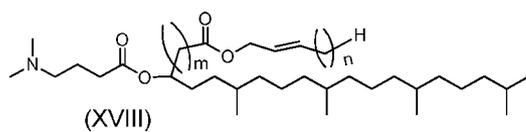
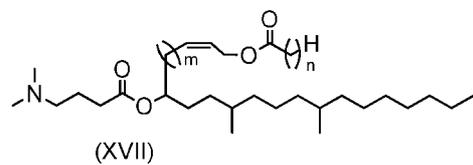
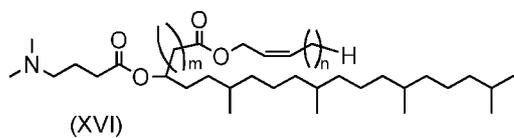
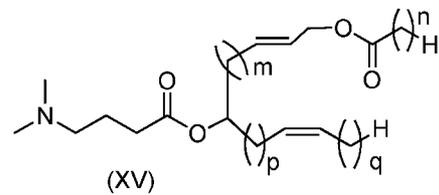
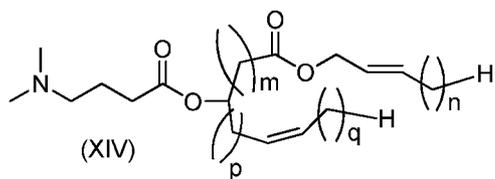
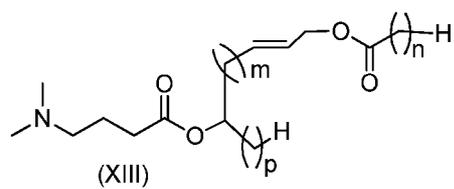
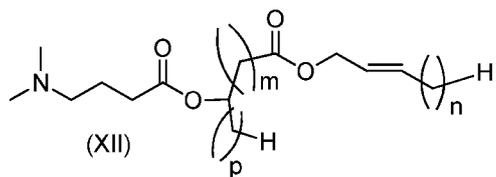
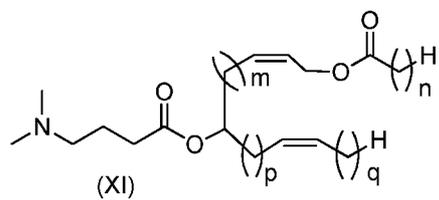
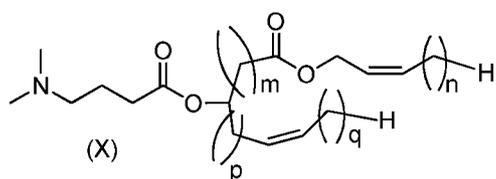
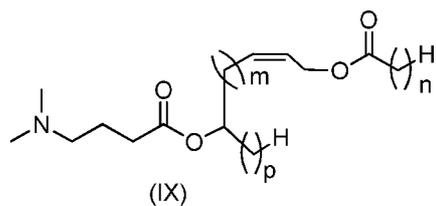
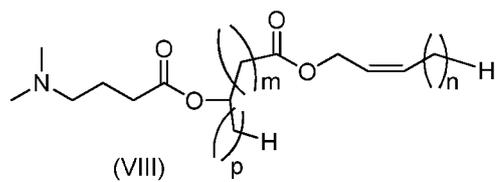
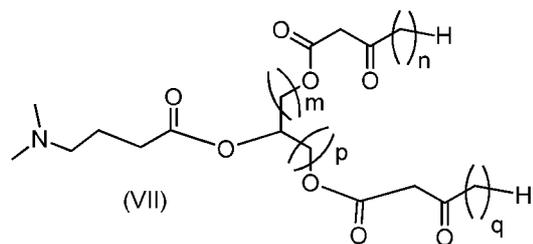
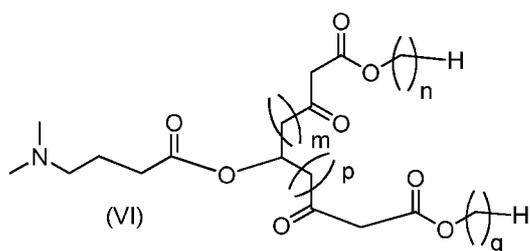
или , и  $\beta = 1, 2$  или  $3$ .  $L^{2b}-(CR^{2a}R^{2b})_{\varepsilon}$  может быть  $CH_2CH_2CH_2$ ,  $CH=CH-CH_2$

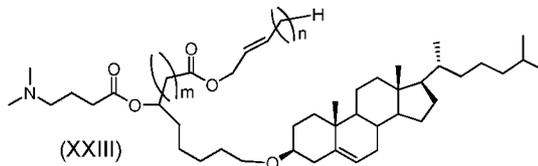
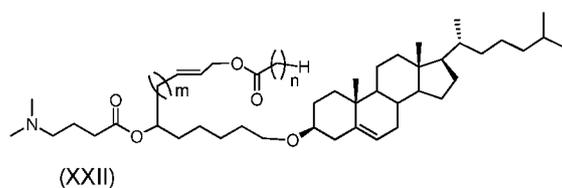
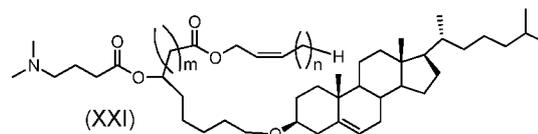
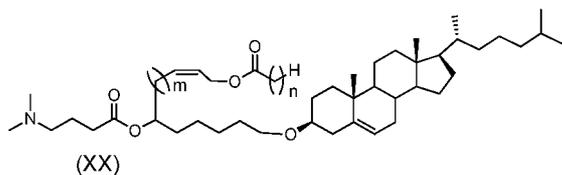
или , и  $\varepsilon = 1, 2$  или  $3$ .

В одном варианте воплощения соединения формулы IE, по меньшей мере один  $L^{1a}$ ,  $L^{1b}$ ,  $L^{1c}$ ,  $L^{2a}$ ,  $L^{2b}$  или  $L^{2c}$ , присутствующий в соединении, является биоразлагаемой группой, такой как эфирные  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ , дисульфидные  $(-S-S-)$ ,  $-C(R^5)=N-$ ,  $-O-C(O)O-$ ,  $-C(O)N(R^5)$ ,  $-N(R^5)C(O)-$ ,  $-N(R^5)C(O)N(R^5)-$ ,  $-C(O)S-$ ,  $-SC(O)-$ ,  $-C(O)(CR^{1a}R^{1b})C(O)O-$  или  $-OC(O)(CR^{1a}R^{1b})C(O)-$ . В другом варианте воплощения соединения формулы IE, по меньшей мере один  $L^{1a}$ ,  $L^{1b}$  и  $L^{1c}$  присутствует в соединении в виде биоразлагаемой группы, и на одном  $L^{2a}$ ,  $L^{2b}$  или  $L^{2c}$  присутствующем в соединении в виде биоразлагаемой группы (такие, как упомянутые выше). В еще одном варианте воплощения соединения формулы IE,  $\alpha$  в  $R^1$  по меньшей мере  $4$ ,  $\delta$  в  $R^2$  является по меньшей мере  $4$ , по меньшей мере один  $L^{1a}$ ,  $L^{1b}$  и  $L^{1c}$  присутствующий в соединении является биоразлагаемой группой, и на одном  $L^{2a}$ ,  $L^{2b}$  или  $L^{2c}$  присутствующем в соединении в виде биоразлагаемой группы (такие, как упоминалось выше). В другом варианте воплощения углеродные цепи  $R^1$  и / или  $R^2$  являются насыщенными. В еще одном варианте воплощения в углеродной цепи  $R^1$  и / или  $R^2$  содержится одна или две двойные связи.

В еще одном варианте воплощения, катионный липид представляет собой соединение, выбранное из соединений формулы II-XXIII:







и их соли (например, фармацевтически приемлемые соли),

где

$m$ ,  $n$ ,  $o$  и  $p$ , каждый в отдельности, 1-25, при условии, что:

(i) в формулах (II), (IV), (VI) и (VII),  $m$  и  $p = 4$  или больше;

(ii) в формулах (VIII), (X), (XII), (XIV), (XVI), (XVIII), (XXI) и (XXIII),  $m = 4$  или больше;

и

(iii) в формулах (VIII), (IX), (XII) и (XIII),  $p = 8$  или больше (например, 12 или 14 или больше).

В другом варианте воплощения настоящее изобретение относится к катионному липиду или его соли, имеющему:

(i) центральный атом углерода,

(ii) азотсодержащие головные группы, непосредственно связанные с центральным атомом углерода, и

(iii) два гидрофобных хвоста, непосредственно связанные с центральным атомом углерода, каждый гидрофобный хвост содержит  $C_8$  или более алифатическую группу (предпочтительно  $C_{14}$  или более алифатическую группу), соединенные с центральным атомом углерода, где одна или обе алифатическая (ие) группа (ы) (а) является разрываемой биоразлагаемой группой, такой, что существует цепочка, по меньшей мере, из четырех атомов углерода между биоразлагаемой группой и центральным атомом углерода, или (b) включает в себя биоразлагаемую группу на терминальном конце гидрофобного хвоста. Например, биоразлагаемую группу выбирают из  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-SC(O)-$ ,  $-C(O)S-$ ,  $-OC(S)-$ ,  $-C(S)O-$ ,  $-S-S-$ ,  $-C(O)(NR^5)-$ ,  $-N(R^5)C(O)-$ ,  $-C(S)(NR^5)-$ ,  $-N(R^5)C(O)-$ ,  $-N(R^5)C(O)N(R^5)-$  и  $-OC(O)O-$ .

Еще одним вариантом воплощения является липидная частица, которая включает катионный липид настоящего изобретения. В одном варианте воплощения липидная

частица включает в себя соединения по любой из формул II-XXIII, как описано здесь. В другом варианте воплощения липидная частица включает в себя соединение формулы I, как описано здесь. В другом варианте воплощения липидная частица включает в себя соединение формулы IA-1, IA-2, IB, IC, ID или IE, как описано здесь.

В предпочтительном варианте воплощения, липидная частица включает в себя нейтральные липиды, липиды, способные снизить агрегацию, катионные липиды, и, возможно, стеринны (например, холестерин). Подходящие нейтральные липиды включают, но не ограничиваются, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ), POPC, DOPE и SM. Подходящие липиды, способные снизить агрегацию, включают, но не ограничиваются этим, липиды PEG, такие как PEG-DMA, PEG-DMG, или их комбинации.

Липидная частица может дополнительно включать в себя активное вещество (например, терапевтический агент). Активным веществом могут быть нуклеиновые кислоты, такие как плазмиды, иммуностимулирующие олигонуклеотиды, мРНК, антисмысловые олигонуклеотиды, микроРНК, антагомир, аптамер или рибозим.

В другом варианте воплощения липидная частица включает катионный липид настоящего изобретения, нейтральный липид и стерол. Липидная частица может дополнительно включать в себя активное вещество, такое как нуклеиновая кислота.

Еще одним вариантом воплощения изобретения является фармацевтическая композиция, которая включает в себя липидную частицу по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Еще одним вариантом воплощения является способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты в субъект, включающий введение субъекту липидной частицы, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты и катионного липида (или его соли), катионного липида, имеющего

(i) центральный атом углерода,

(ii) азотсодержащие головные группы, непосредственно связанные с центральным атомом углерода, и

(iii) два гидрофобных хвоста, непосредственно связанные с центральным атомом углерода, каждый гидрофобный хвост содержит C<sub>8</sub> или более алифатическую группу (предпочтительно C<sub>14</sub> или более алифатическую группу), соединенные с центральным

атомом углерода, где одна или обе алифатическая (ие) группа (ы) (а) является разрываеваемой биоразлагаемой группой такой, что существует цепочка, по меньшей мере, из четырех атомов углерода между биоразлагаемой группой и центральным атомом углерода, или (b) включает в себя биоразлагаемую группу на терминальном конце гидрофобного хвоста.

В одном варианте воплощения катионный липид остается нетронутым до доставки молекулы нуклеиновой кислоты, после чего расщепление гидрофобного хвоста происходит *in vivo*.

Еще одним аспектом является способ модуляции экспрессии целевого гена в клетке, обеспечивающий в клетку липидную частицу настоящего изобретения. Активный агент может быть нуклеиновой кислотой, выбранной из плазмиды, иммуностимулирующего олигонуклеотида, миРНК, антисмыслового олигонуклеотида, микроРНК, антагомира, аптамера и рибозима.

Еще одним аспектом является способ лечения заболевания или расстройства, характеризующегося избыточной экспрессией полипептида в субъекте, путем предоставления субъекту фармацевтической композиции по настоящему изобретению, в которой активное вещество является нуклеиновой кислотой, выбранной из миРНК, микроРНК или антисмыслового олигонуклеотида, и где миРНК, микроРНК или антисмысловой олигонуклеотид включает в себя полинуклеотид, который специфически связывается с полинуклеотидом, который кодирует полипептид или комплементарный ему.

Еще одним аспектом является способ лечения заболевания или расстройства, характеризующегося избыточной экспрессией полипептида в субъекте, путем предоставления субъекту фармацевтической композиции по настоящему изобретению, в которой активное вещество представляет собой плазмиду, которая кодирует полипептид или функциональный вариант или его фрагмент.

Еще одним аспектом является способ индукции иммунного ответа у субъекта путем предоставления субъекту фармацевтической композиции, в которой активный агент является иммуностимулирующим олигонуклеотидом.

Еще одним аспектом является трансфекция агента, который включает в себя композицию или липидные частицы, описанные выше, где композиция или липидная частица включают нуклеиновые кислоты. Агент, при контакте с клетками, может эффективно доставлять нуклеиновые кислоты в клетки. Еще одним аспектом является способ доставки нуклеиновых кислот внутрь клетки, путем получения или формирования

композиции или липидных частиц, описанных выше, и контактирования композиции или липидных частиц с клеткой.

Другие признаки и аспекты будут очевидны из описания и формулы изобретения.

### **Краткое описание фигур**

На Фигуре 1 представлен график концентрации катионных липидов (соединения 1-3 и референсного липида) в печени мышей с течением времени, после введения катионных липидов в липидных частицах, как описано в Примере 14.

На Фигуре 2 показан ожидаемый метаболический путь для соединений 1 и 3 из Примера 14.

На Фигуре 3 показан график концентрации катионных липидов (соединения 1-3 и референсного липида) в селезенке мышей с течением времени, после введения катионных липидов в липидных частицах, как описано в Примере 14.

На Фигуре 4 показан график концентрации катионных липидов (соединения 1-3 и референсного липида) в плазме мышей с течением времени, после введения катионных липидов в липидных частицах, как описано в Примере 14.

### **Подробное описание**

В одном аспекте настоящее изобретение относится к липидной частице, которая включает в себя нейтральные липиды, липиды, способные снизить агрегацию, катионные липиды и, необязательно, стеролы. В некоторых вариантах воплощения липидная частица дополнительно включает в себя активное вещество (например, терапевтический агент). Различные примерные варианты воплощения этих липидов, липидных частиц и композиций, содержащие то же самое, и их использование для доставки терапевтических агентов и модуляции генной экспрессии белка описаны более подробно ниже.

#### **Катионный липид**

В одном из вариантов воплощения, катионный липид представляет собой соединение формулы I-XXIII. В другом варианте воплощения, катионный липид представляет собой соединение одной из формул II-XXIII. В одном из вариантов воплощения, катионный липид представляет собой соединение формулы I. В другом

варианте воплощения, катионный липид представляет собой соединение формулы IA-1, IA-2, IB, IC или ID. Следующие раскрытия представляют различные варианты воплощения соединения формулы I.

В одном из вариантов воплощения  $M^1$  и  $M^2$ , каждый независимо:

$-\text{OC}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{SC}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{S}-$ ,  $-\text{OC}(\text{S})-$ ,  $-\text{C}(\text{S})\text{O}-$ ,  $-\text{S}-\text{S}-$ ,  $-\text{C}(\text{R}^5)=\text{N}-$ ,  $-\text{N}=\text{C}(\text{R}^5)-$ ,  $-\text{C}(\text{R}^5)=\text{N}-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{N}=\text{C}(\text{R}^5)-$ ,  $-\text{C}(\text{O})(\text{NR}^5)-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{S})(\text{NR}^5)-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^5)-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{OSi}(\text{R}^5)_2\text{O}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})(\text{CR}^3\text{R}^4)\text{C}(\text{O})\text{O}-$  или  $-\text{OC}(\text{O})(\text{CR}^3\text{R}^4)\text{C}(\text{O})-$ .

В другом варианте воплощения  $M^1$  и  $M^2$ , каждый независимо:

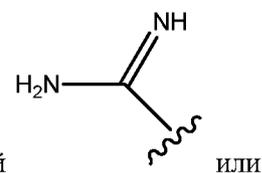
$-\text{OC}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ ,  $-\text{C}(\text{R}^5)=\text{N}-$ ,  $-\text{N}=\text{C}(\text{R}^5)-$ ,  $-\text{C}(\text{R}^5)=\text{N}-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{N}=\text{C}(\text{R}^5)-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^5)-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{S}-$ ,  $-\text{SC}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{S})\text{O}-$ ,  $-\text{OC}(\text{S})-$ ,  $-\text{OSi}(\text{R}^5)_2\text{O}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})(\text{CR}^3\text{R}^4)\text{C}(\text{O})\text{O}-$  или  $-\text{OC}(\text{O})(\text{CR}^3\text{R}^4)\text{C}(\text{O})-$ .

В еще одном варианте воплощения  $M^1$  и  $M^2$ , каждый независимо:

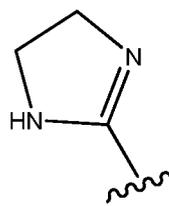
$-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{R}^5)=\text{N}-$ ,  $-\text{C}(\text{R}^5)=\text{N}-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^5)-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{S}-$ ,  $-\text{C}(\text{S})\text{O}-$ ,  $-\text{OSi}(\text{R}^5)_2\text{O}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})(\text{CR}^3\text{R}^4)\text{C}(\text{O})\text{O}-$  или  $-\text{OC}(\text{O})(\text{CR}^3\text{R}^4)\text{C}(\text{O})-$ .

В другом варианте воплощения  $M^1$  и  $M^2$ , каждый,  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ .

В одном варианте воплощения  $R^1$  и  $R^2$ , каждый в отдельности, опционально замещенный алкил, циклоалкил, циклоалкилалкил или гетероцикл. В одном варианте воплощения  $R^1$  представляет собой алкил,  $R^2$  представляет собой алкил, циклоалкил или циклоалкилалкил. В одном варианте воплощения  $R^1$  и  $R^2$ , каждый в отдельности представляет собой алкил (например,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ -алкил, такой как метил, этил или изопропил). В одном варианте воплощения  $R^1$  и  $R^2$  оба представляют собой метил. В другом варианте воплощения  $R^1$  и  $R^2$  вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют опционально замещенное гетероциклическое кольцо (например, N-метилпиперазинил). В



другом варианте воплощения, один из  $R^1$  и  $R^2$  представляет собой



(например,  $R^1$  является одной из двух вышеупомянутых групп и  $R^2$

представляет собой водород).

В одном варианте воплощения R' представляет собой водород или алкил. В другом варианте воплощения R' представляет собой водород или метил. В одном варианте воплощения R' отсутствует. В одном варианте воплощения R' отсутствует или метил.

Для соединений, в которых R' не отсутствует, атом азота, к которому R' присоединяется, несет на себе положительный заряд, а соединение также содержит отрицательно заряженные противоионы. Противоионом может быть любой анион, такой как органический или неорганический анион. Подходящие примеры анионов включают, но не ограничиваются, тозилат, метансульфонат, ацетат, цитрат, малонат, тартрат, сукцинат, бензоат, аскорбат,  $\alpha$ -кетоглутарат,  $\alpha$ -глицерофосфат, галогенид (например, хлорид), сульфат, нитрат, бикарбонат и карбонат. В одном варианте воплощения противоион является галогенидом (например, Cl).

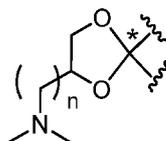
В одном варианте воплощения каждый R является, независимо, - (CR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>) -, где R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup>, каждый независимо, - водород или алкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> -алкил). Например, в одном варианте воплощения каждый R является, независимо, - (CHR<sup>4</sup>) -, где каждый R<sup>4</sup> является, независимо, H или алкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> -алкил). В другом варианте воплощения каждый R является, независимо, -CH<sub>2</sub>-, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>- или -CH(*i*Pr)- (где *i*Pr - изопропил). В другом варианте воплощения каждый R представляет собой -CH<sub>2</sub>-.

В другом варианте воплощения R<sup>5</sup> представляет собой, в каждом случае, водород или метил. Например, R<sup>5</sup> может быть, в каждом случае, водородом.

В одном из вариантов воплощения Q отсутствует, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(R<sup>4</sup>)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)-, -S-S-, -OC(O)O-, -C(R<sup>5</sup>)=N-O-, -OC(O)N(R<sup>5</sup>)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)N(R<sup>5</sup>)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)O-, -C(O)S-, -C(S)O- или -C(R<sup>5</sup>)=N-O-C(O)-. В одном из вариантов воплощения Q представляет собой -C(O)O-.

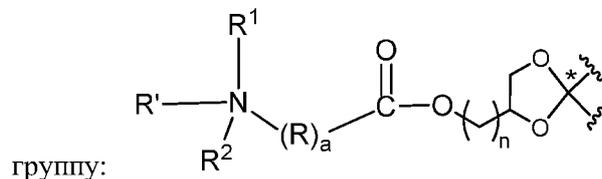
В одном варианте воплощения Q<sup>1</sup> и Q<sup>2</sup>, каждый независимо, отсутствует или -O-. Например, в одном варианте воплощения Q<sup>1</sup> и Q<sup>2</sup>, каждый, отсутствует. В другом варианте воплощения, Q<sup>1</sup> и Q<sup>2</sup>, каждый, -O-.

В одном из вариантов воплощения пунктирная линия к Q отсутствует, b равен 0, а R'R<sup>1</sup>R<sup>2</sup>N-(R)<sub>a</sub>-Q- и третичный углерод, прилегающий к нему (C\*), образуют следующую группу:



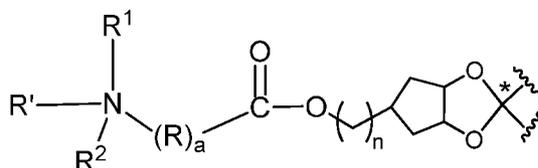
где n = от 1 до 4 (например, n = 2).

В одном из вариантов воплощения пунктирная линия к Q отсутствует, b равен 0, а  $R'R^1R^2N-(R)_a-Q-$  и третичный углерод, прилегающий к нему, образуют следующую

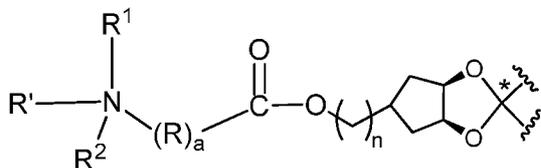


где n = от 1 до 4 (например, n = 2), и  $R^1$ ,  $R^2$ , R, a и b такие, как определено по формуле (I).  
В одном варианте воплощения a = 3.

В одном из вариантов воплощения пунктирная линия к Q отсутствует, b равен 0, а  $R'R^1R^2N-(R)_a-Q-$  и третичный углерод, прилегающий к нему, образуют следующую группу:

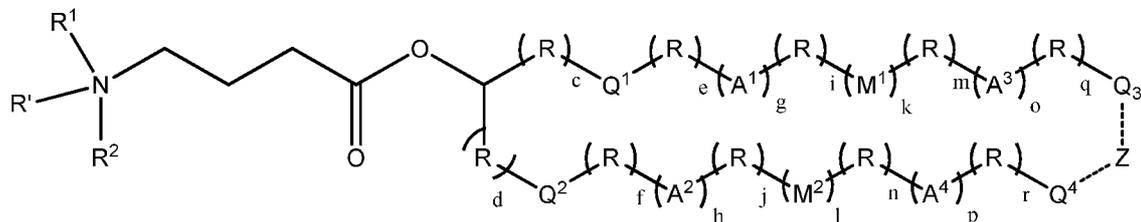


где n = от 1 до 4 (например, n = 2), и  $R^1$ ,  $R^2$ , R, a и b такие, как определено по формуле (I).  
В одном варианте воплощения a = 0. Например, группа может быть:



В одном варианте воплощения b = 0. В другом варианте воплощения a = 2, 3 или 4 и b = 0. Например, в одном варианте воплощения a = 3 и b = 0. В другом варианте воплощения a = 3, b = 0, и Q представляет собой  $-C(O)O-$ .

В одном варианте воплощения соединение формулы (I) имеет подформулу:



Формула (IF), где R,  $R'$ ,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $A^1$ ,  $A^2$ ,  $A^3$ ,  $A^4$ ,  $Q^1$ ,  $Q^2$ ,  $Q^3$ ,  $Q^4$ , c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q и r такие, как определено в любом из вариантов воплощения, описанных здесь.

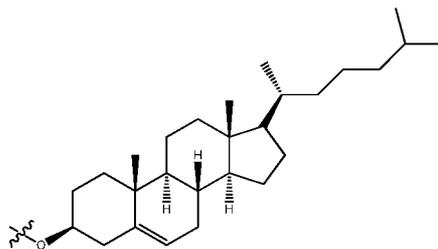
В дополнительных вариантах воплощения соединение формулы (IF) отвечает одному или нескольким из следующих условий:

- (i)  $Q^1$  и  $Q^2$  отсутствуют;
- (ii)  $M^1$  и  $M^2$  являются  $-C(O)O-$ ;
- (iii) g и h оба равны 1;
- (iv) g и h оба равны 0;
- (v) c и e всего 7;
- (vi) d и f всего 7;
- (vii) c, e, и i всего 7;
- (viii) d, f и j всего 7;
- (ix) i и j каждый 7;
- (x) k и l оба равны 1;
- (xi) m и n оба равны 0;
- (xii) m и q всего 1 или m и q всего 2;
- (xiii) m и l всего 6;
- (xiv) r и p всего 6;
- (xv) p и o оба равны 0;
- (xvi) n и g всего 2 или n и g всего 1; и
- (xvii)  $Q^3$  является H.

В некоторых вариантах воплощения биоразлагаемые группы, которые присутствуют в катионном липиде, выбирают из эфирных (например,  $-C(O)O-$  или  $-OC(O)-$ ), дисульфидных ( $-SS-$ ), оксимных (например,  $-C(H)=N-O-$  или  $-O-N=C(H)-$ ),  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(R^5)=N-$ ,  $-N=C(R^5)-$ ,  $-C(R^5)=N-O-$ ,  $-O-N=C(R^5)-$ ,  $-O-C(O)O-$ ,  $-C(O)N(R^5)$ ,  $-N(R^5)C(O)-$ ,  $-C(S)(NR^5)-$ ,  $(NR^5)C(S)-$ ,  $-N(R^5)C(O)N(R^5)-$ ,  $-C(O)S-$ ,  $-SC(O)-$ ,  $-C(S)O-$ ,  $-OC(S)-$ ,  $-OSi(R^5)_2O-$ ,  $-C(O)(CR^3R^4)C(O)O-$  или  $-OC(O)(CR^3R^4)C(O)-$ .

В одном варианте воплощения алифатическая группа в одном или обоих гидрофобных хвостах катионного липида включает в себя по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь.

Подходящий фрагмент холестерина для катионных липидов настоящего изобретения (в том числе соединений формулы (I), IA-2, ID, IE и IF) имеет формулу:



Дополнительные варианты воплощения включают катионный липид, имеющий головную группу, один или более гидрофобный хвост и линкер между головной группой и одним или несколькими хвостами. Головная группы может включать в себя амины, например амин, имеющий желаемые  $pK_a$ .  $pK_a$  может зависеть от структуры липида, в частности, характера головной группы, например, наличия, отсутствия и расположения функциональных групп, таких как анионные функциональные группы, водородная связь донора функциональных групп, водородная связь акцепторных групп, гидрофобные группы (например, алифатические группы), гидрофильные группы (например, гидроксильные или метокси) или арил группы. Амин головной группы может быть катионным амином, первичным, вторичным и третичным амином, головная группы может включать в себя одну аминогруппу (моноамин), две аминогруппы (диамин), три аминогруппы (триамин), или большее число аминогрупп, как и в олигоамине или полиамине. Головная группа может включать в себя функциональную группу, которая слабее, чем основные амины, такие как, например, имидазол, пиридин или группа гуанидиния. Головная группа может быть цвиттерионной. Другие головные группы также являются подходящими.

Один или более гидрофобный хвост может включать в себя две гидрофобные цепи, которые могут быть одинаковыми или разными. Хвосты могут быть алифатическими, например, они могут состоять из углерода и водорода, либо насыщенными или ненасыщенными, но без ароматических колец. Хвосты могут быть хвостами жирных кислот. Некоторые из таких групп включают в себя октанил, нонанил, децил, лаурил, миристил, пальмитил, стеарил,  $\alpha$ -линолеил, стеаридонил, линолеил,  $\gamma$ -линоленил, арахадонил и олеил. Другие гидрофобные хвосты также являются подходящими.

Линкер может включать в себя, например, глицеридный линкер, ациклических глицеридов аналоговый линкер или циклический линкер (в том числе линкер спиро, бициклический линкер и полициклический линкер). Линкер может включать в себя функциональные группы, такие как простые эфирные, сложноэфирные, фосфатные, фосфонатные, фосфоротиоатные, сульфонатные, дисульфидные, ацетальные, кетальные, иминные, гидразонные или оксимные. Другие линкеры и функциональные группы также являются подходящими.

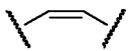
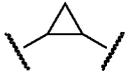
В одном варианте воплощения катионный липид является рацемической смесью. В другом варианте воплощения, катионный липид обогащен одним диастереомером, например, катионный липид имеет по меньшей мере 95%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 70% диастереомера в избытке. В еще одном

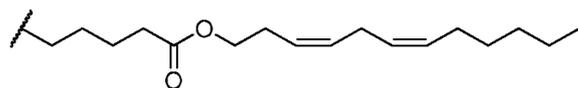
варианте воплощения, катионный липид обогащен одним энантиомером, например, липид имеет по меньшей мере 95%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере 70% энантиомера в избытке. В еще одном варианте воплощения катионный липид хирально чистый, например, является отдельным оптическим изомером. В еще одном варианте воплощения катионный липид обогащен одним оптическим изомером.

В случае, если двойная связь присутствует (например, углерод-углеродная двойная связь или углерод-азот двойная связь), может быть изомерия в конфигурации двойной связи (т.е. цис / транс или E / Z изомерия). Там где конфигурация двойной связи показана в химической структуре, следует понимать, что соответствующий изомер может также присутствовать. Сумма присутствующих изомеров может варьироваться, в зависимости от относительной устойчивости изомеров и энергии, необходимой для перехода между изомерами. Соответственно, некоторые двойные связи, для практических целей, присутствуют только в одной конфигурации, тогда как другие (например, когда относительная стабильность похожа и энергия перехода низкая) могут присутствовать в качестве неотъемлемой равновесной смеси конфигураций.

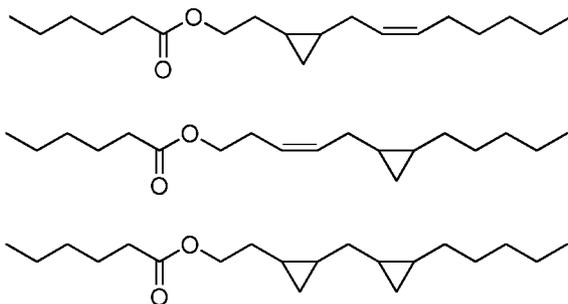
В некоторых случаях ненасыщенная двойная связь может быть заменена на циклические ненасыщенные. Циклические ненасыщенные могут быть циклоалифатическими ненасыщенными, например, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил или циклооктил группы. В некоторых случаях, циклическая группа может быть полициклической группой, например, бициклической группой или трициклической группой. Бициклическая группа может быть мостиковой, смешанной или иметь спиро структуру.

В некоторых случаях фрагмент двойной связи может быть заменен фрагментом

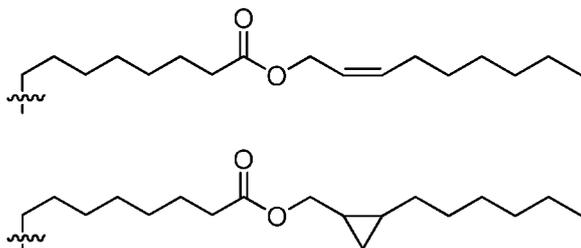
циклопропила, например,  может быть заменен . Например, фрагмент, показанный ниже, имеет две двойных углерод-углеродных связей, каждая из которых может самостоятельно заменить циклический фрагмент, например, циклопропил фрагмент. Таким образом, заместители для:



включают:

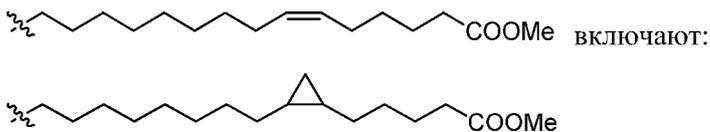


Для следующего примера заместители для

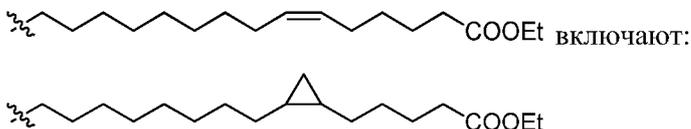


включают:

Для следующего примера заместители для

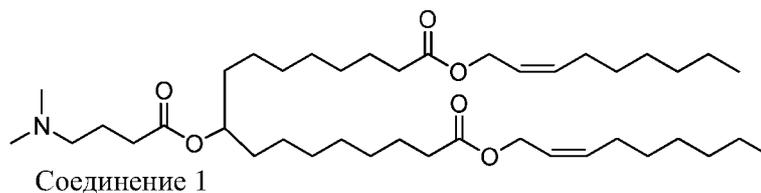


Для следующего примера заместители для

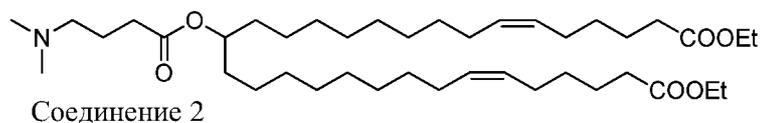


Катионный липид включает в себя одну или более биоразлагаемых групп. Биоразлагаемая (ые) группа (ы) включают одну или более связей, которые могут подвергаться реакции разрыва связей в биологической среде, например, в организме, органе, ткани, клетке или органелле. Функциональные группы, которые содержат биоразлагаемые связи, включают, например, сложные эфиры, дитиолы и оксимы. Биodeградация может быть фактором, который влияет на выведение соединения из организма при введении субъекту. Биodeградация может быть измерена в клетке на основе анализа, когда композиция, включающая катионный липид, вводится в клетки и образцы берутся в различные моменты времени. Липидные фракции могут быть извлечены из клеток и разделены и проанализированы LC-MS. По LC-MS данным скорость биodeградации (например, как  $t_{1/2}$  значение) может быть измерена.

Например, соединение



включает в себя эфирную связь в каждой алифатической цепи, которые могут подвергнуться гидролизу в биологической среде, например, при воздействии, например, липазы или эстеразы. Структура соединения, конечно, влияет на скорость, с которой соединение подвергается биодegradации. Таким образом, связанные соединения, такие как



можно было бы ожидать, что будут обладать различной скоростью биодegradации. Большого влияния на этот показатель можно было бы ожидать от изменений в структуре соединения в месте гидролиза. Одной из модификаций, которая может влиять на скорость гидролиза, и тем самым влиять на скорость биодegradации и выведение из тела субъекта, является уходящая группа реакции гидролиза - первичная спиртовая группа легче, чем вторичная.

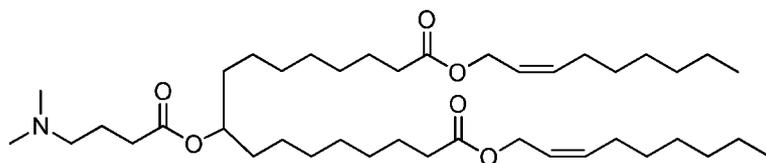
Например, не желая быть связанными теорией, соединения 1 и 2, показанные выше, могут быть метаболизированы, как показано на Фигуре 2.

В одном варианте воплощения катионный липид любого из описанных здесь вариантов имеет *in vivo* период полураспада ( $t_{1/2}$ ) (например, в печени, селезенке или плазме) менее чем примерно 3 часа, например, менее чем около 2,5 часов, менее чем около 2 часов, менее чем около 1,5 часа, менее чем около 1 часа, менее чем около 0,5 часа или менее около 0,25 часа.

В другом варианте воплощения, катионный липид любого из описанных здесь вариантов воплощения, содержащий биоразлагаемую группу или группы, которые имеют *in vivo* период полураспада ( $t_{1/2}$ ) (например, в печени, селезенке или плазме) менее чем примерно 10% (например, менее чем около 7,5%, менее чем около 5%, менее чем около 2,5%), чем тот же катионный липид без биоразлагаемой группы или групп.

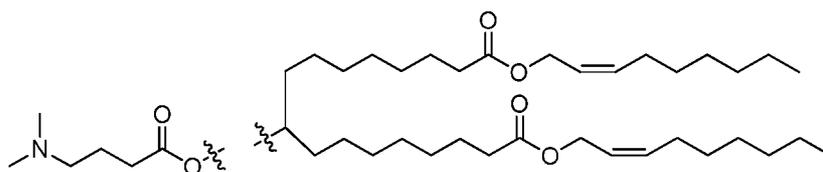
Некоторые катионные липиды могут быть удобно представлены в виде

гидрофобных групп в сочетании с головной группой. Так, например, соединение:



Соединение 1

можно рассматривать как сочетание головной группы и гидрофобной группы следующим образом:

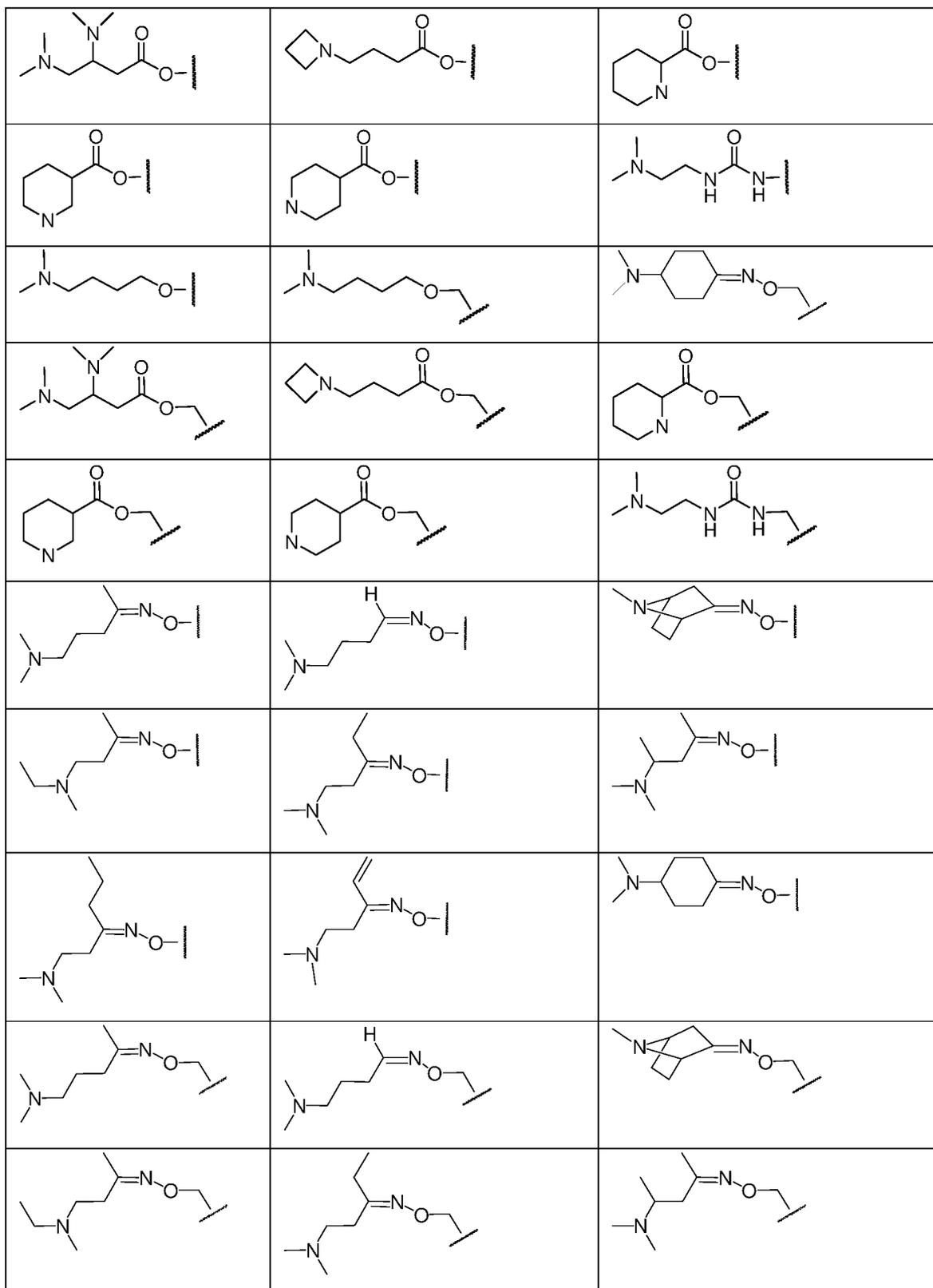


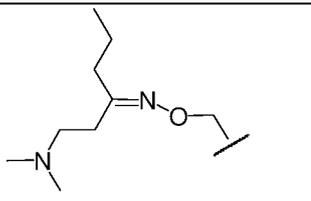
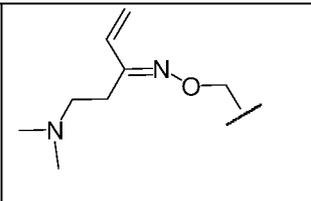
Головная группа

Гидрофобная группа

Таким образом, некоторые подходящие головные группы включают приведенные в Таблице 1:

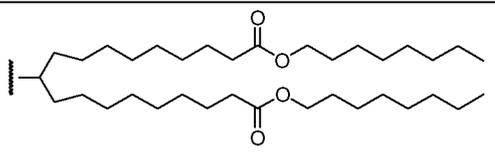
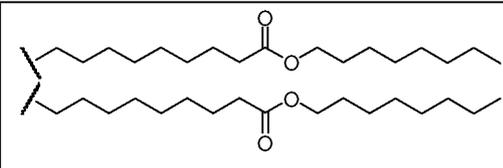
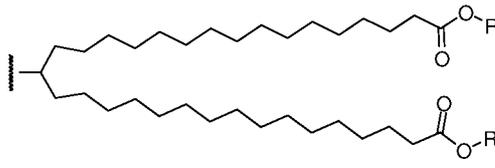
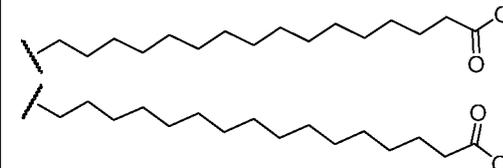
ТАБЛИЦА 1

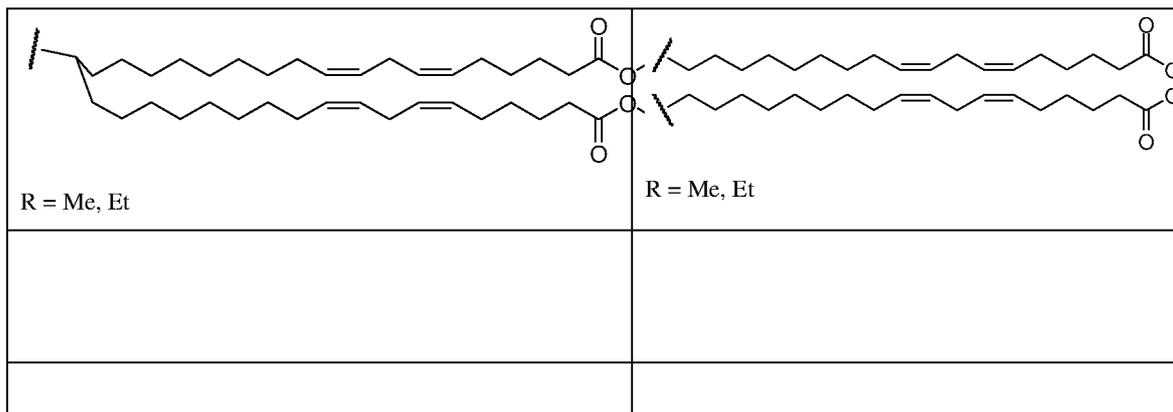



		(Где n является 0-5)
(Где n является 0-5)	(углерод со звездочкой - третичный углерод катионного липида и не является частью головной группы)	(углерод со звездочкой - третичный углерод катионного липида и не является частью головной группы)
R = H, алкил (например, метил) X = галоген (например, Cl)	R = H, алкил (например, метил) X = галоген (например, Cl)	R = H, алкил (например, метил) X = галоген (например, Cl)

Некоторые подходящие группы гидрофобного хвоста включают те, что приведены в Таблице 2:

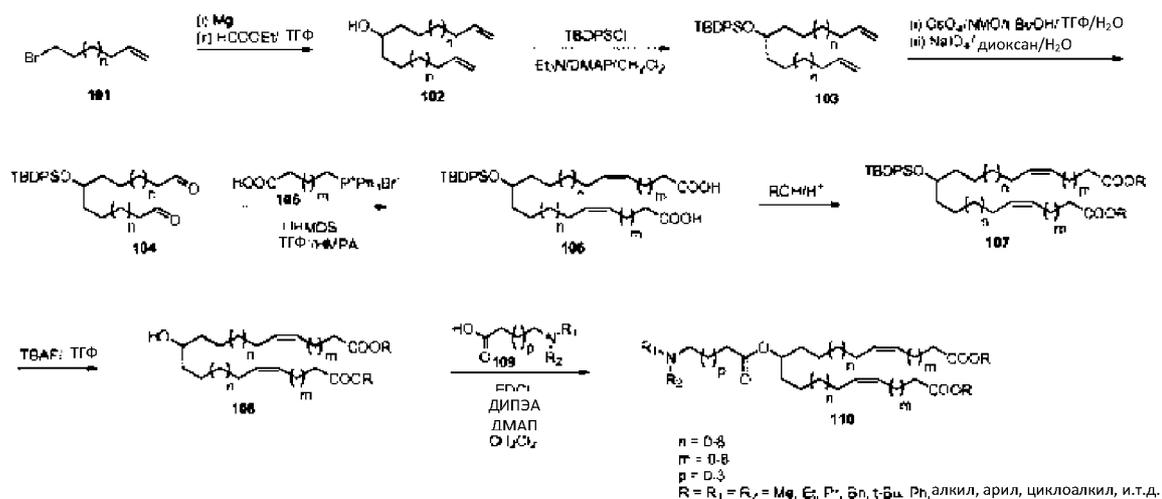
ТАБЛИЦА 2

	
 R = Me, Et	 R = Me, Et



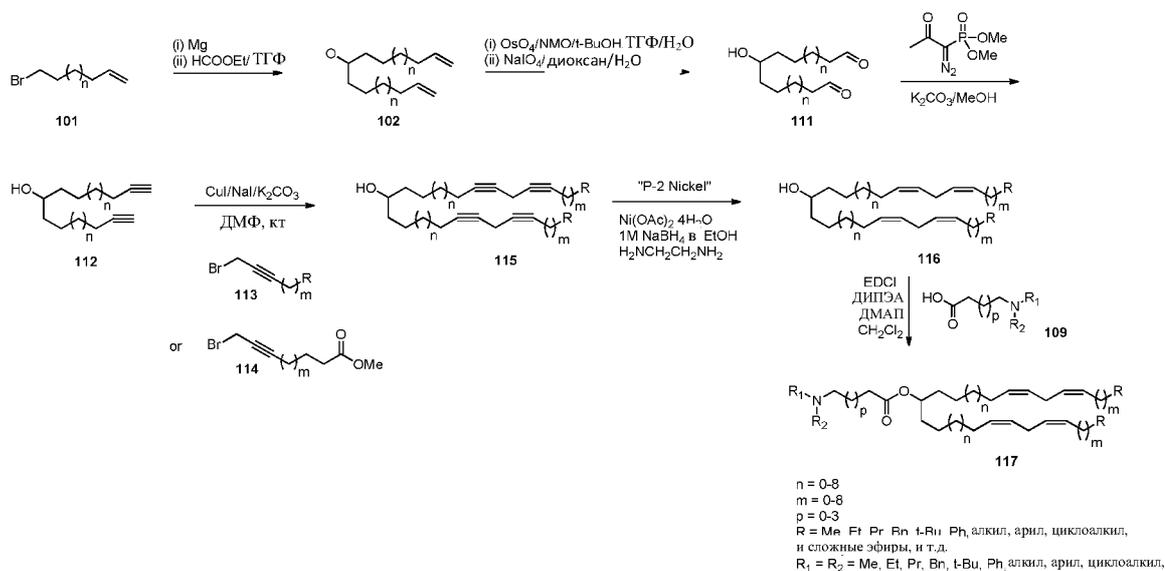
В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения соединения любой из формул I-XXIII. Подходящие образцовые синтетические способы проиллюстрированы на схемах А-С ниже. Переменные в схемах ниже, такие же, как эти переменные в той же позиции в формулах I-XXIII выше.

#### Схема А



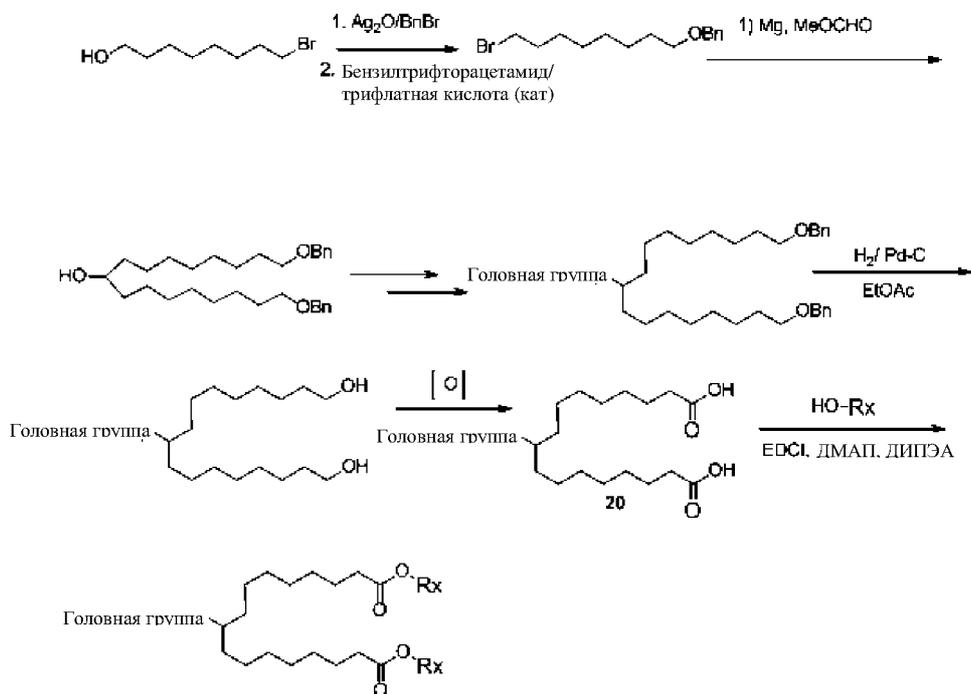
Длина цепи липида и длина линкера в Схеме А может быть изменена. Кроме того, группа R в функциональном эфире и заместители у атома азота могут быть модифицированы.

#### Схема В



Как показано на Схеме В, медно-опосредованная связь дает ди-ин содержащие цепи липидов с концевыми функциональными группами R, которые могут быть уменьшены для создания ди-ен содержащих липидных цепочек. Длина цепи линкера и липида может быть изменена и функциональные группы заместителей (R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>) могут быть модифицированы.

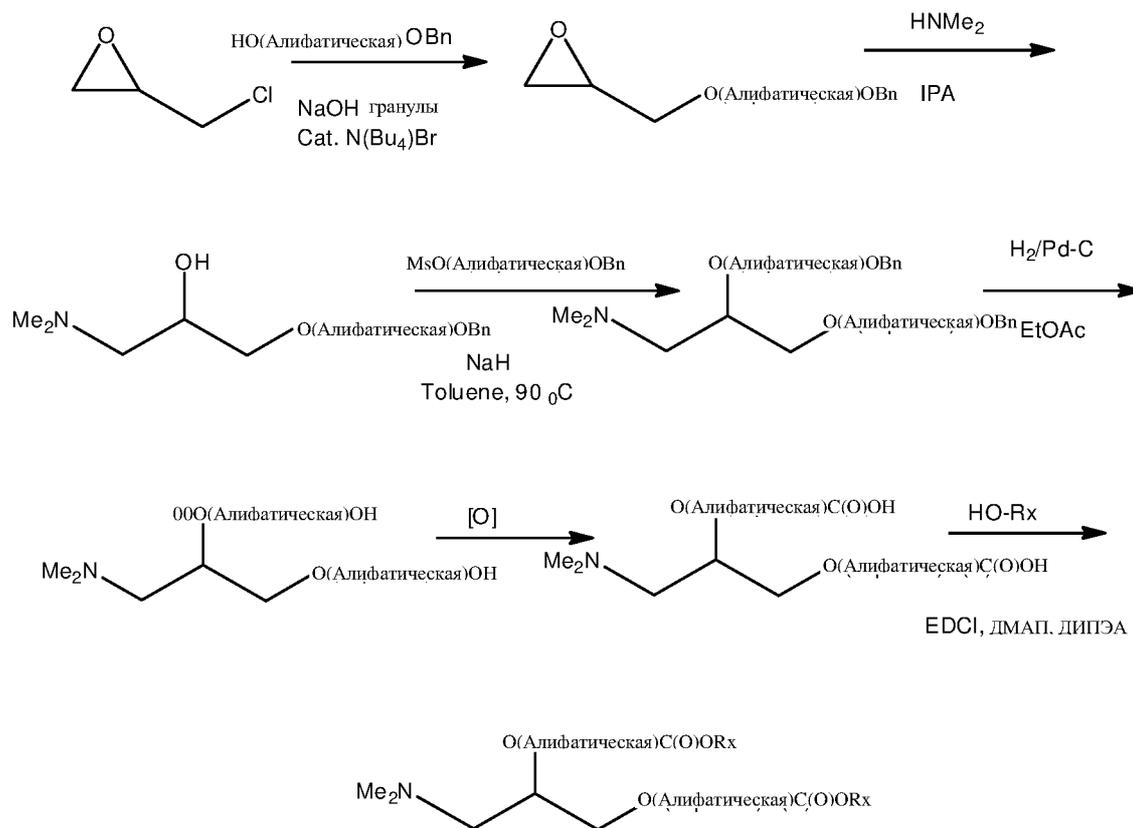
## Схема С



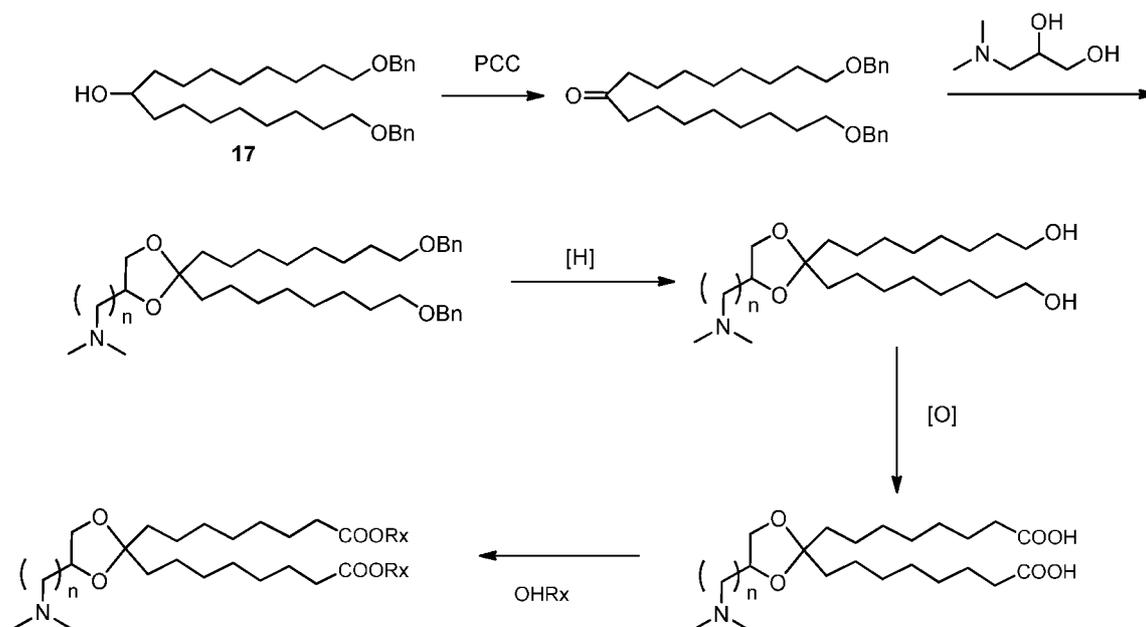
где Rx представляет собой алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, арил или замещенный арил, и головную группу, как определено в Таблице 1.

Головная группа в Схеме С может быть любой головной группой, описанной здесь (см., например, Таблицу 1).

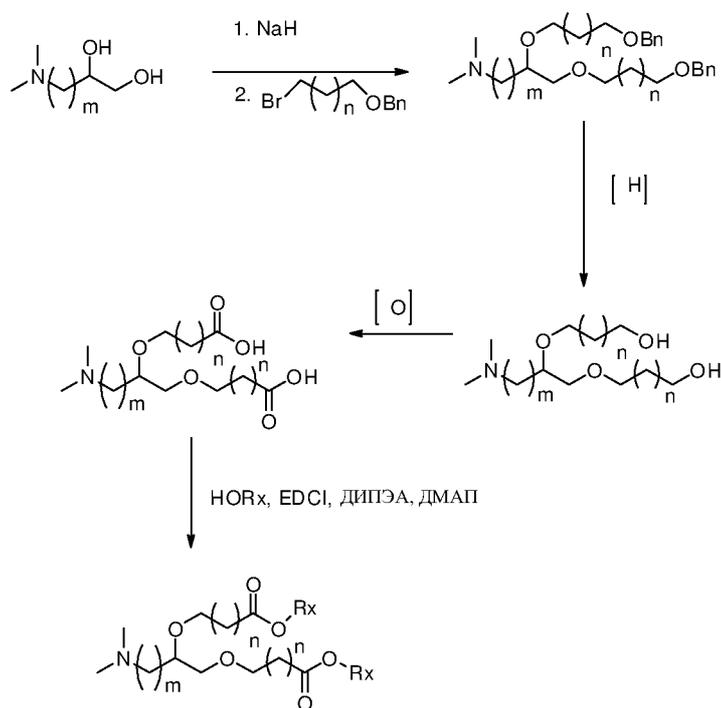
## Схема D



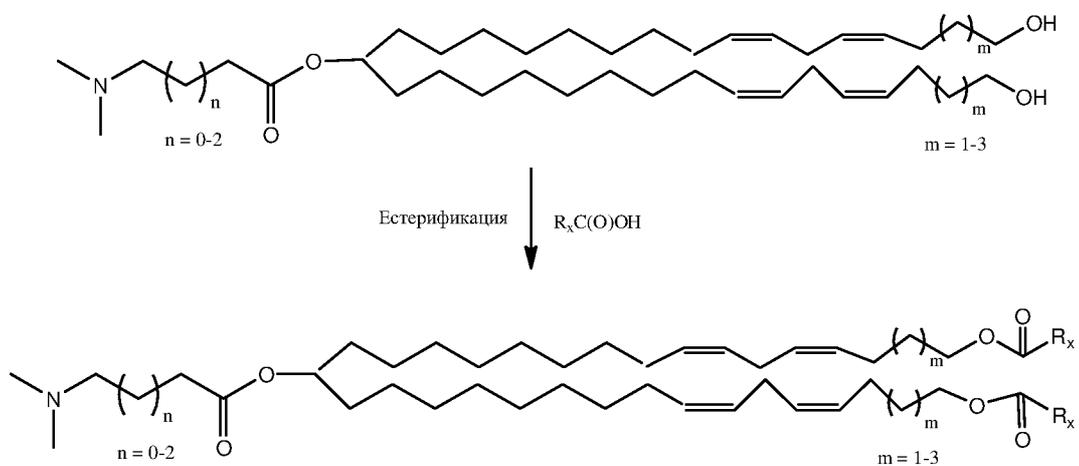
## Схема Е



## Схема F

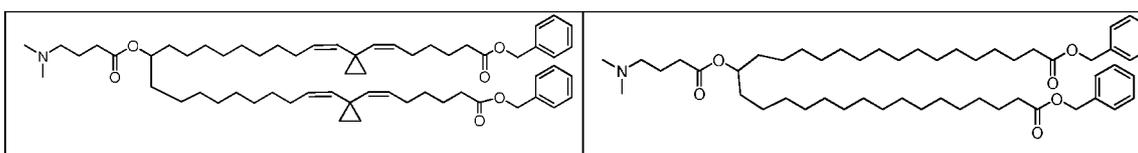


## Схема G



Примеры катионных липидов настоящего изобретения включают те, что приведены в Таблицах 3-13 ниже и их соли (в том числе фармацевтически приемлемые соли).

ТАБЛИЦА 3



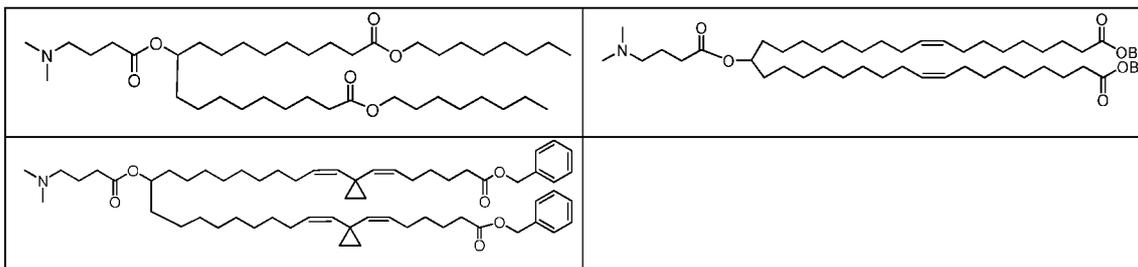
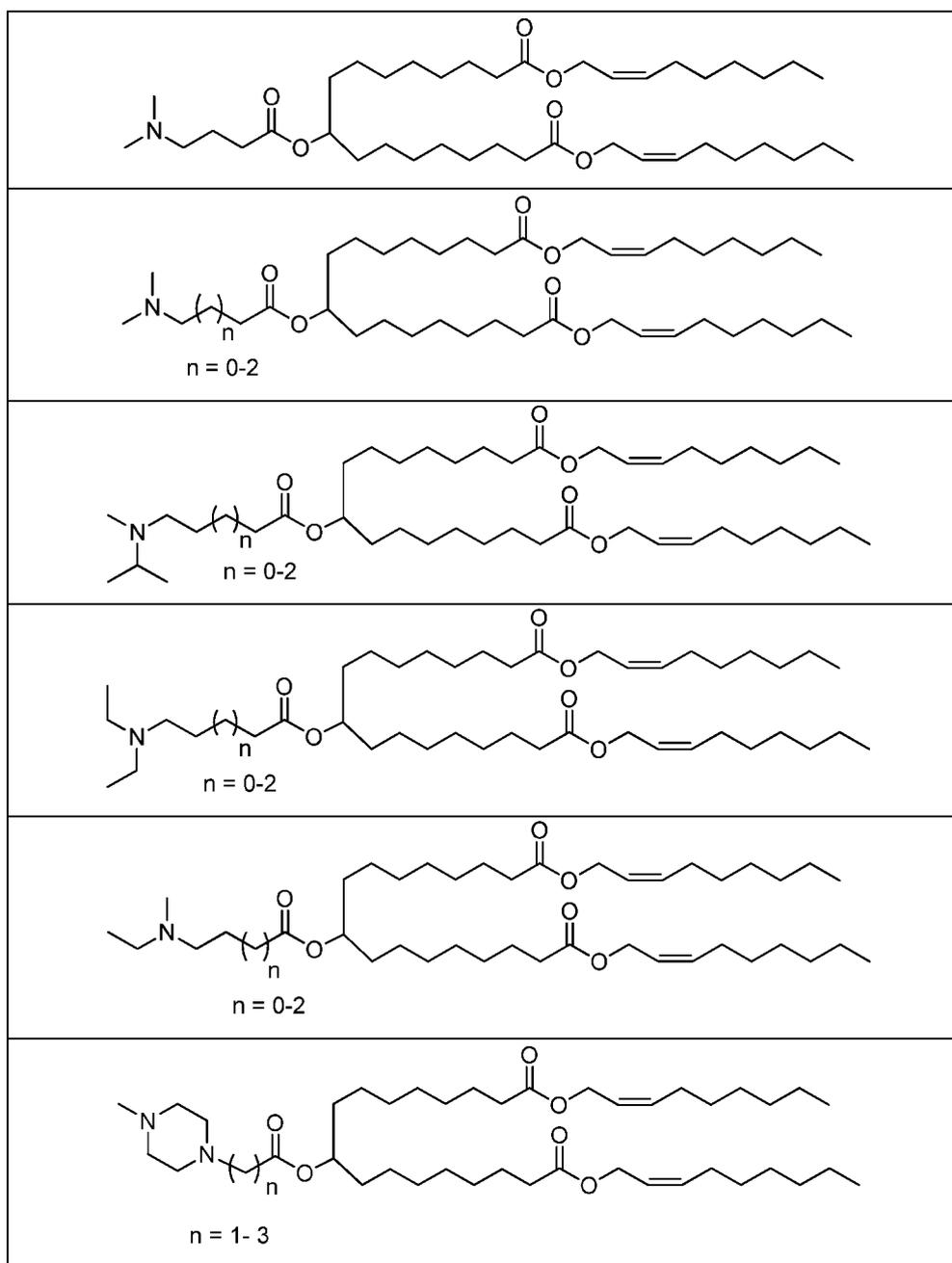
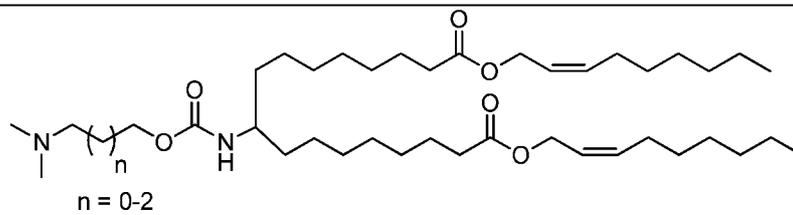
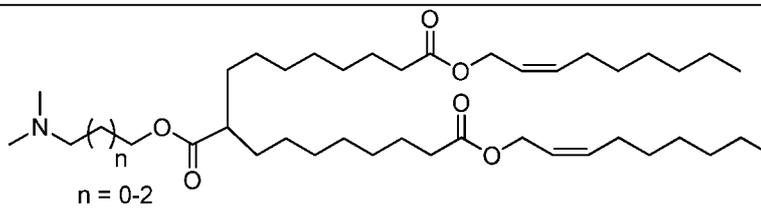
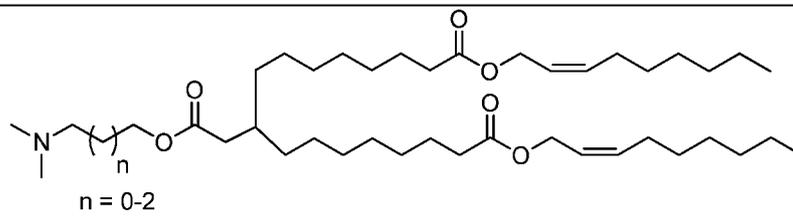
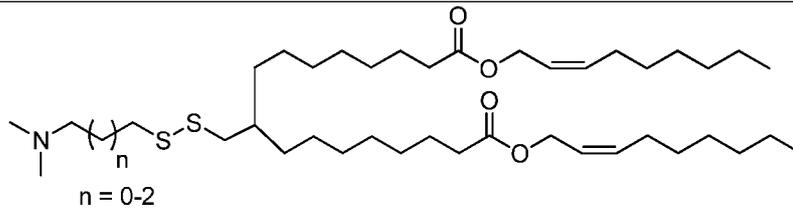
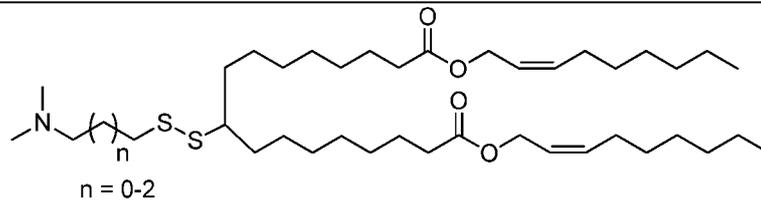
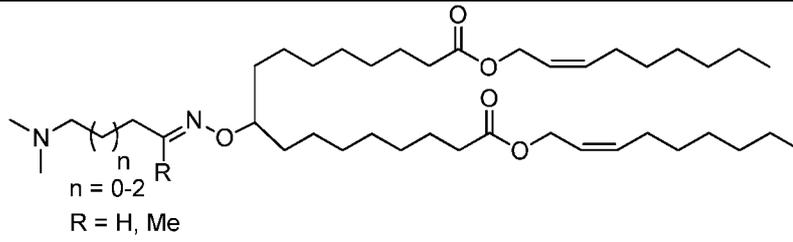
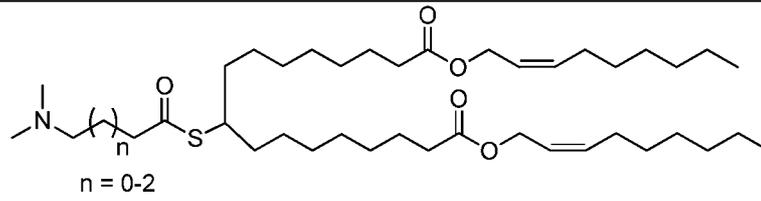
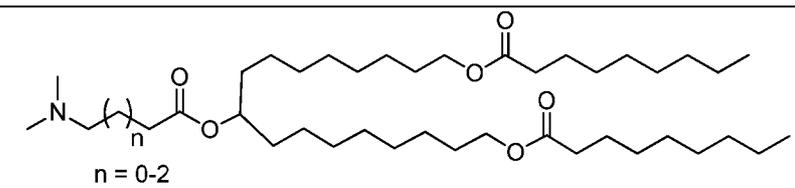
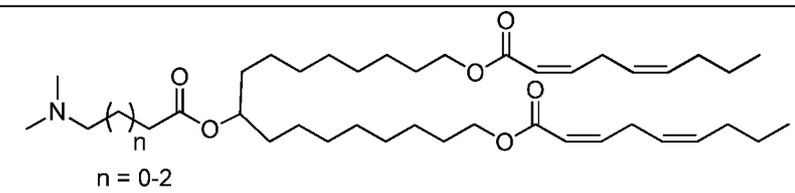
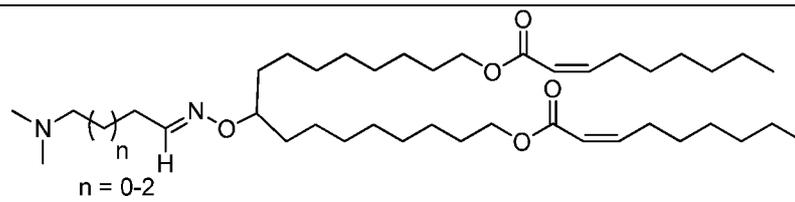
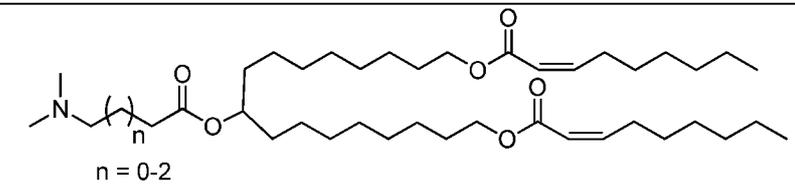
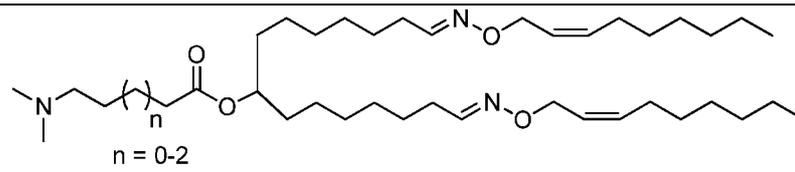
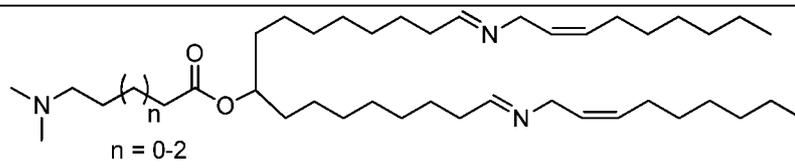
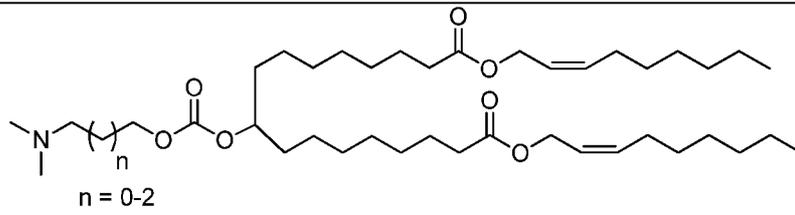
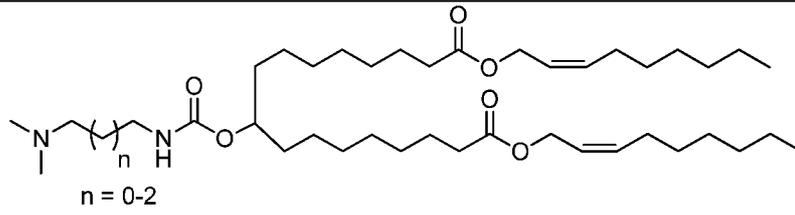
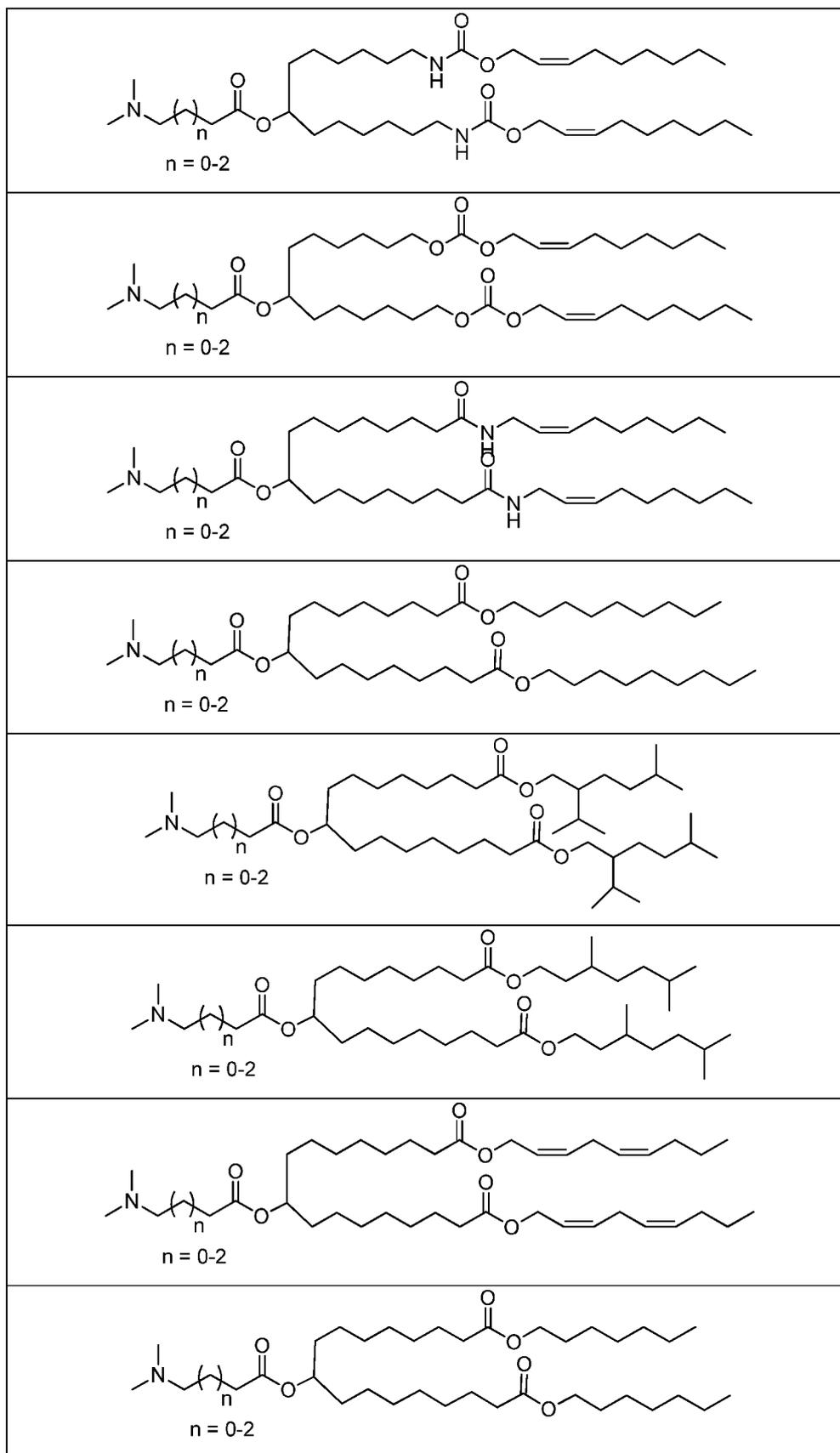


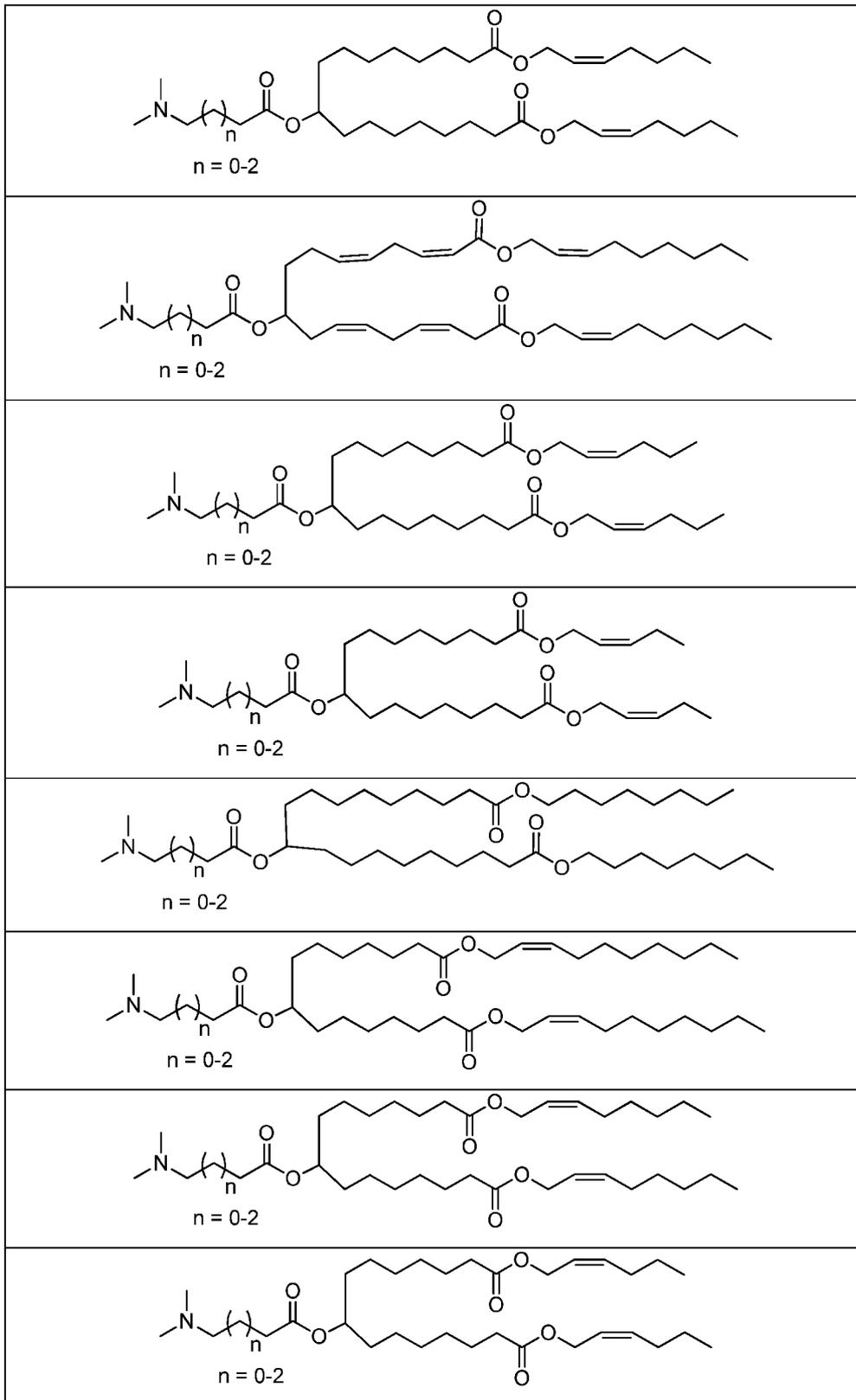
ТАБЛИЦА 4

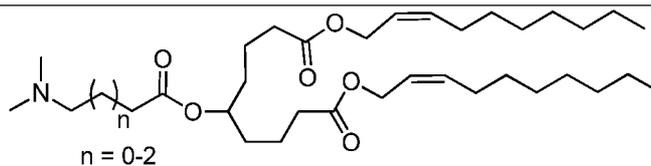
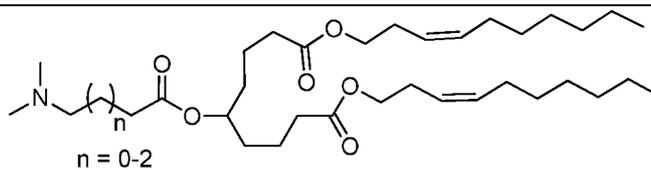
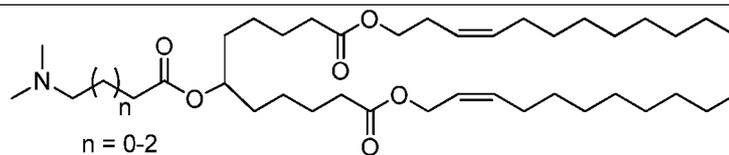
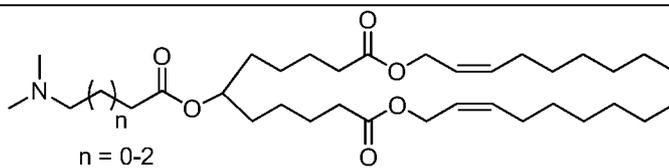
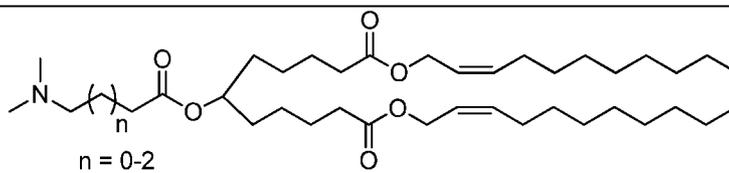
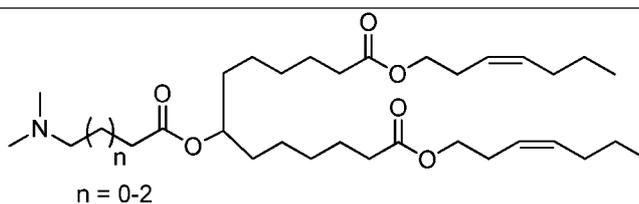
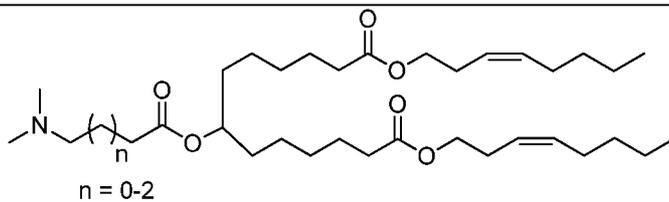
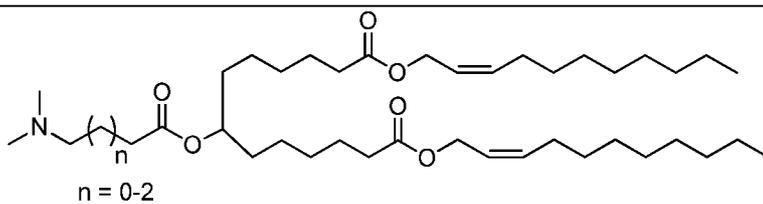


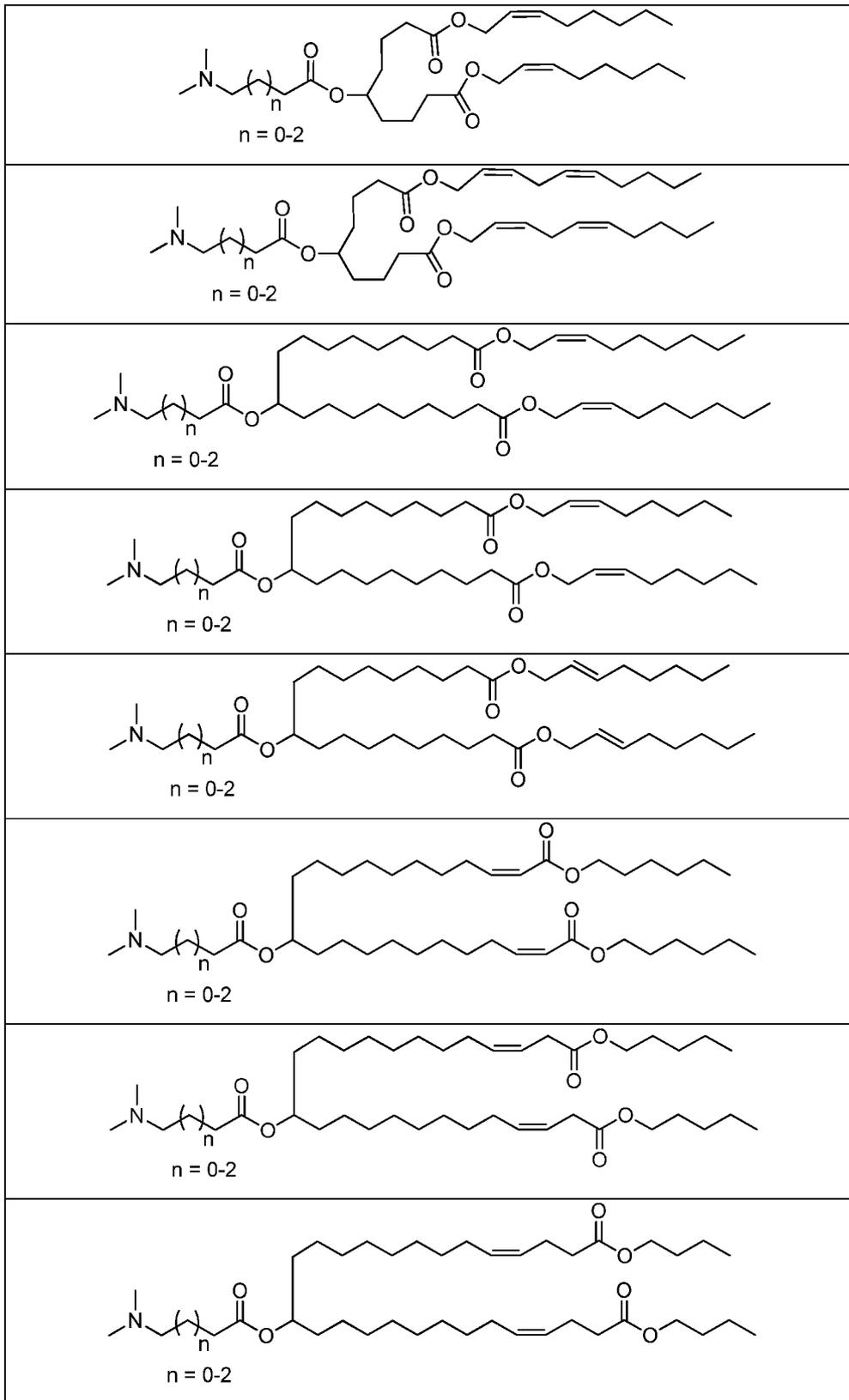


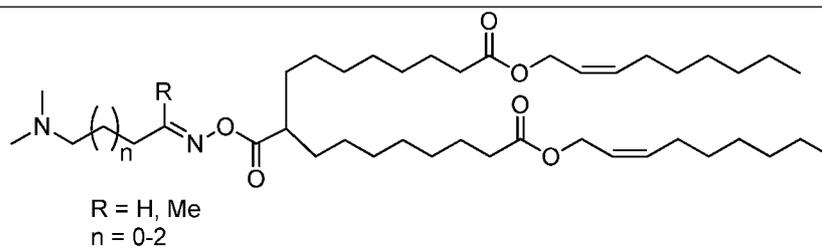
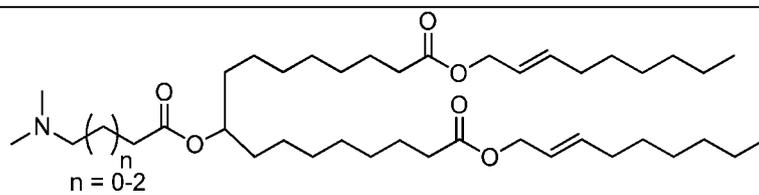
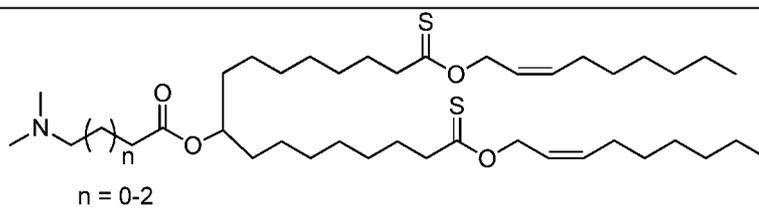
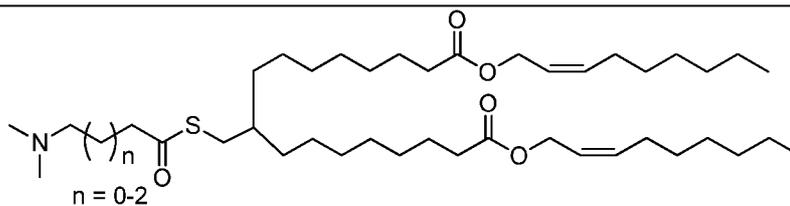
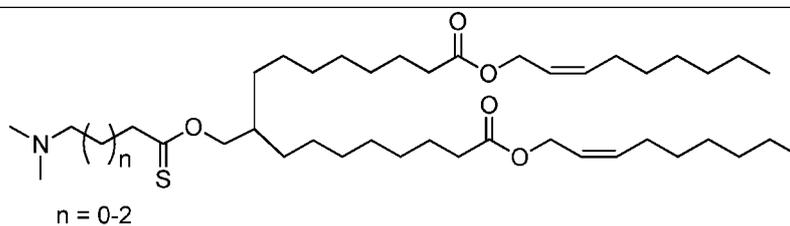
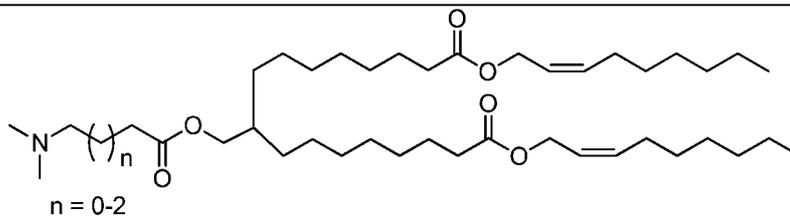
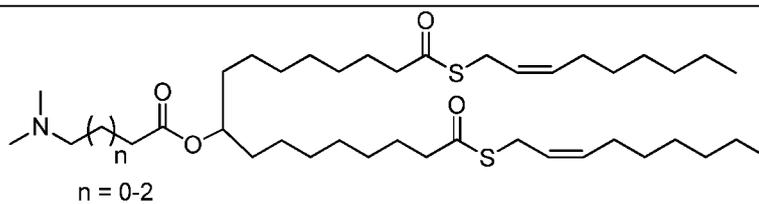


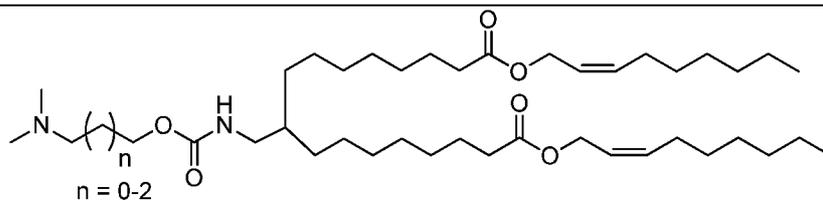
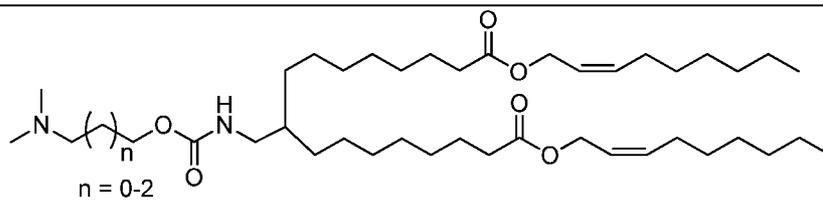
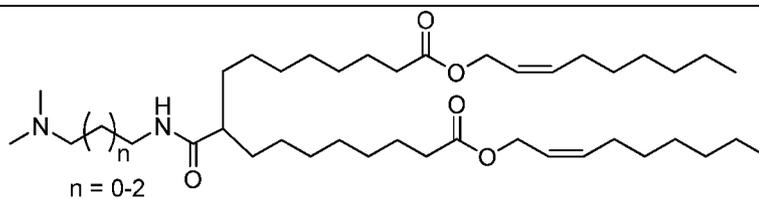
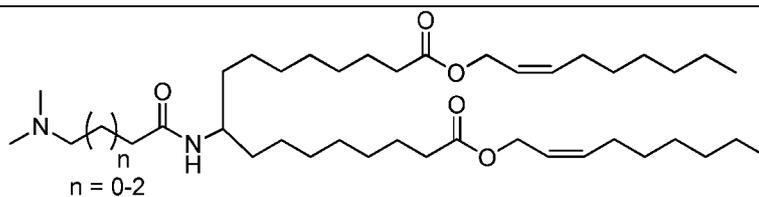
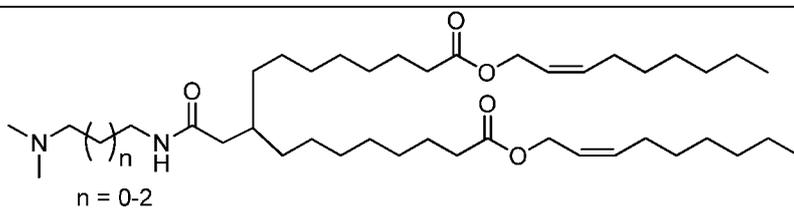
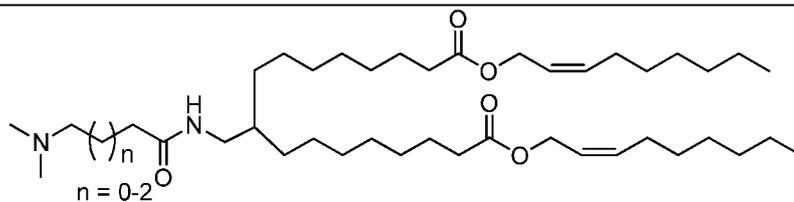
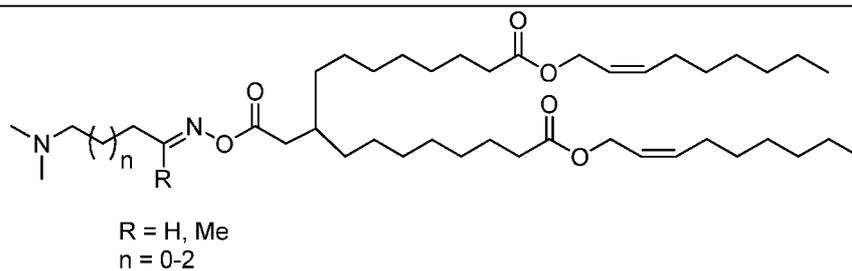


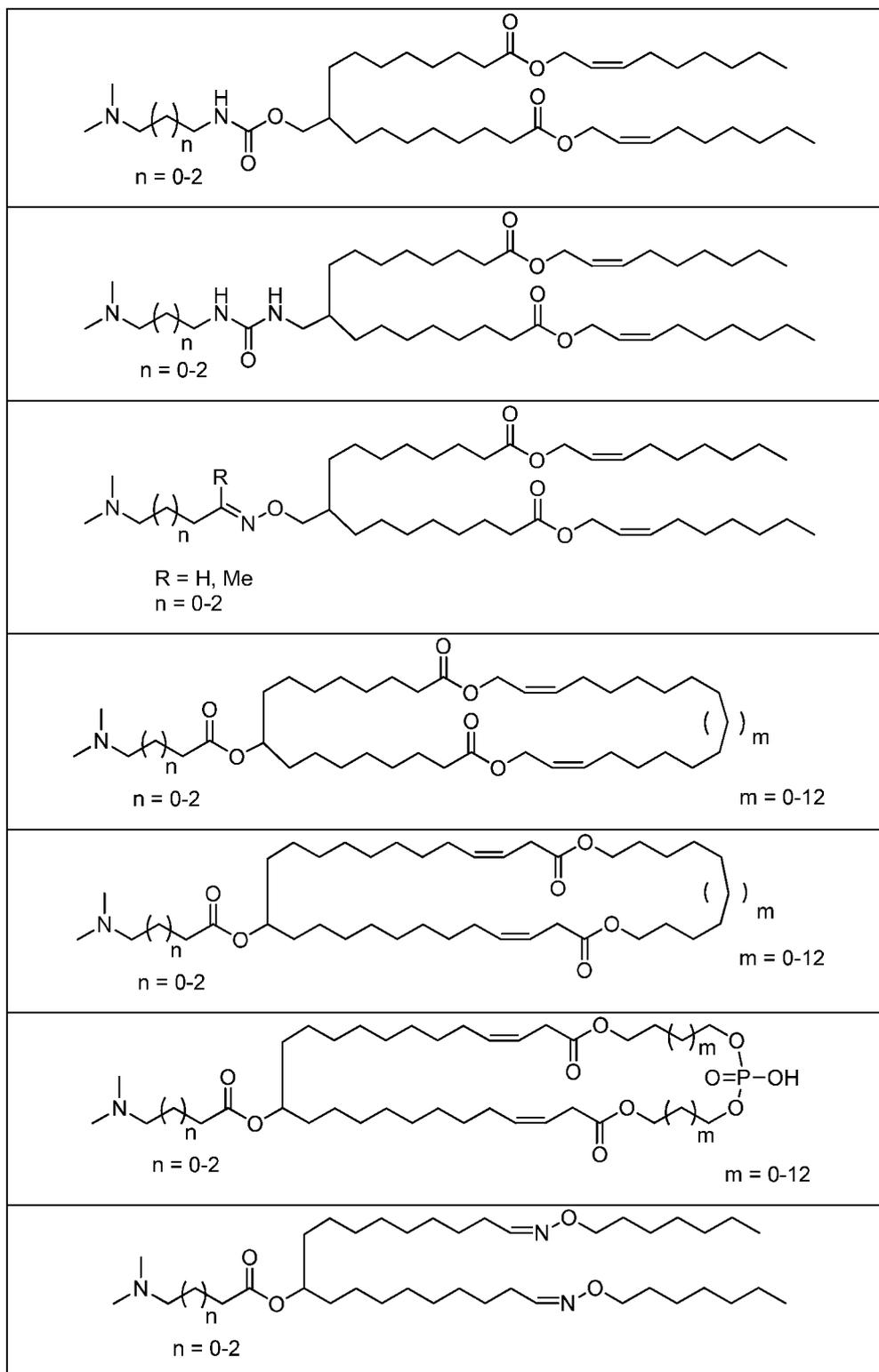


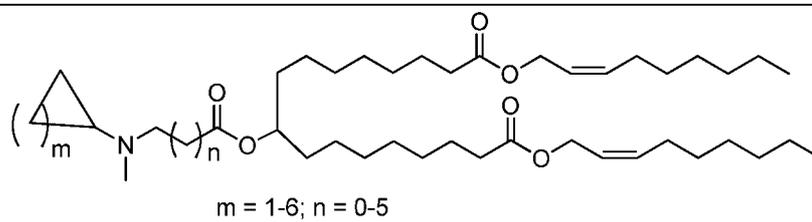
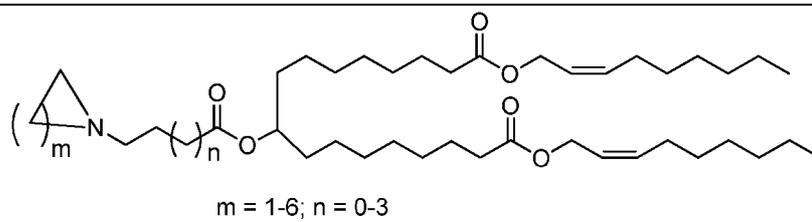
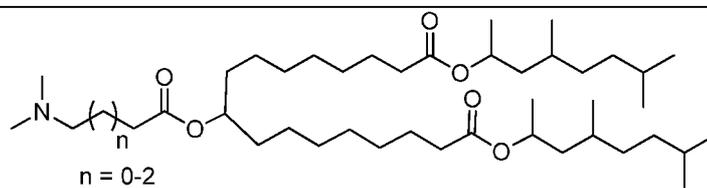
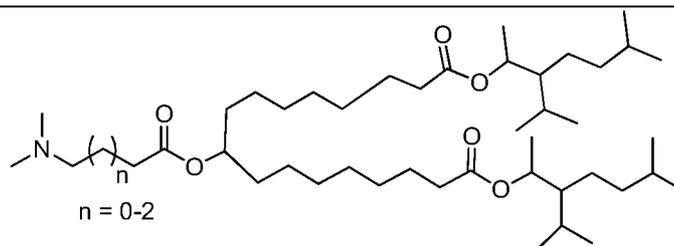
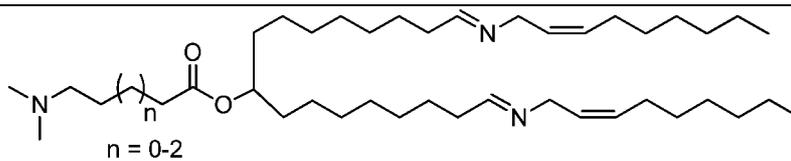
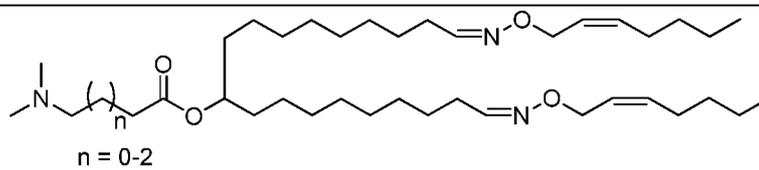
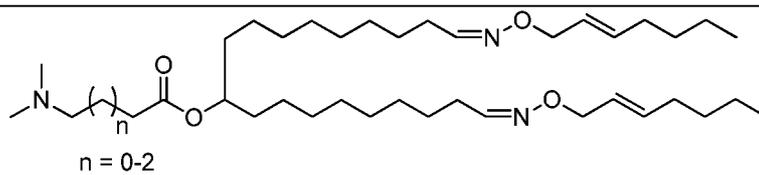


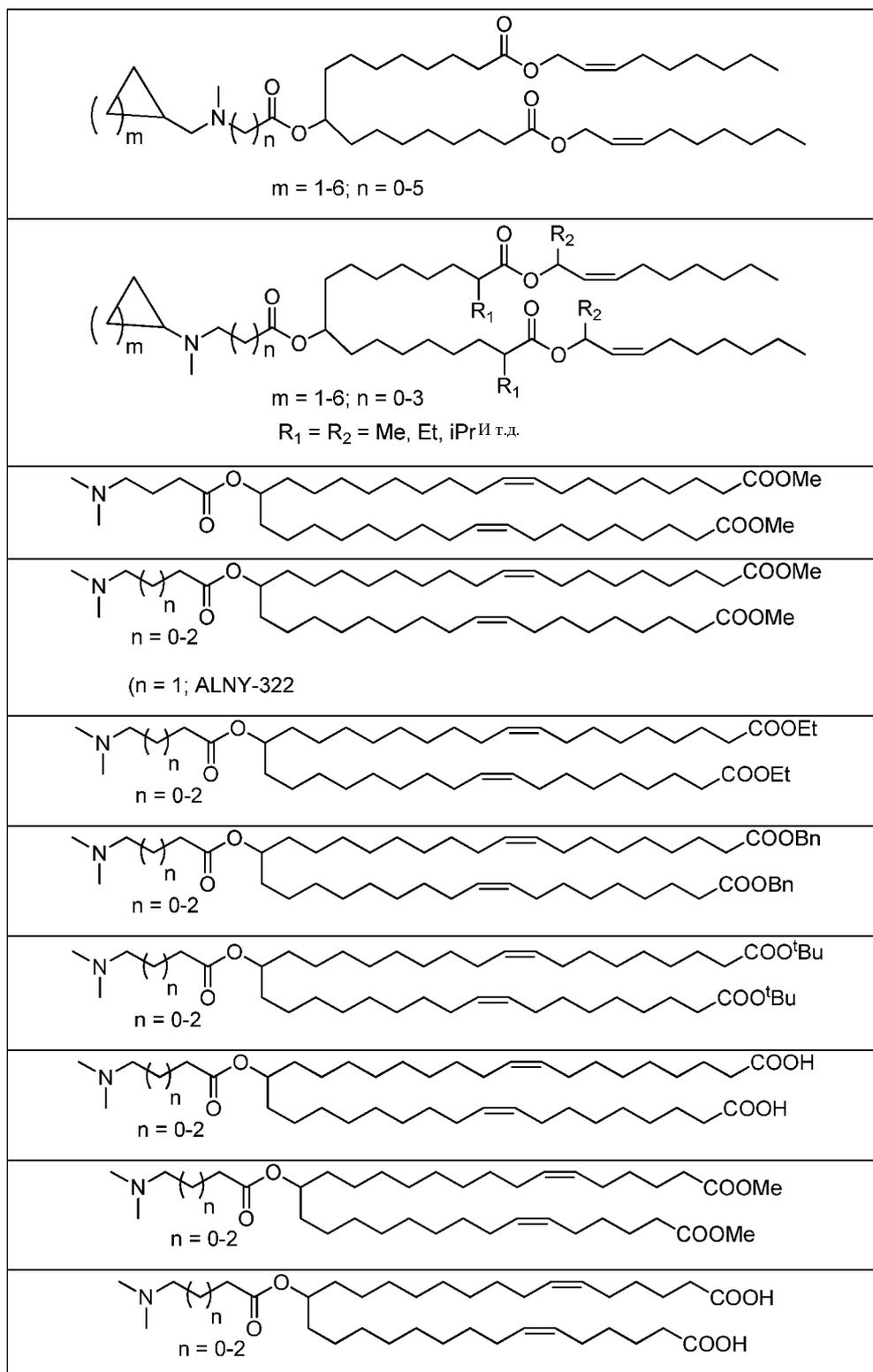


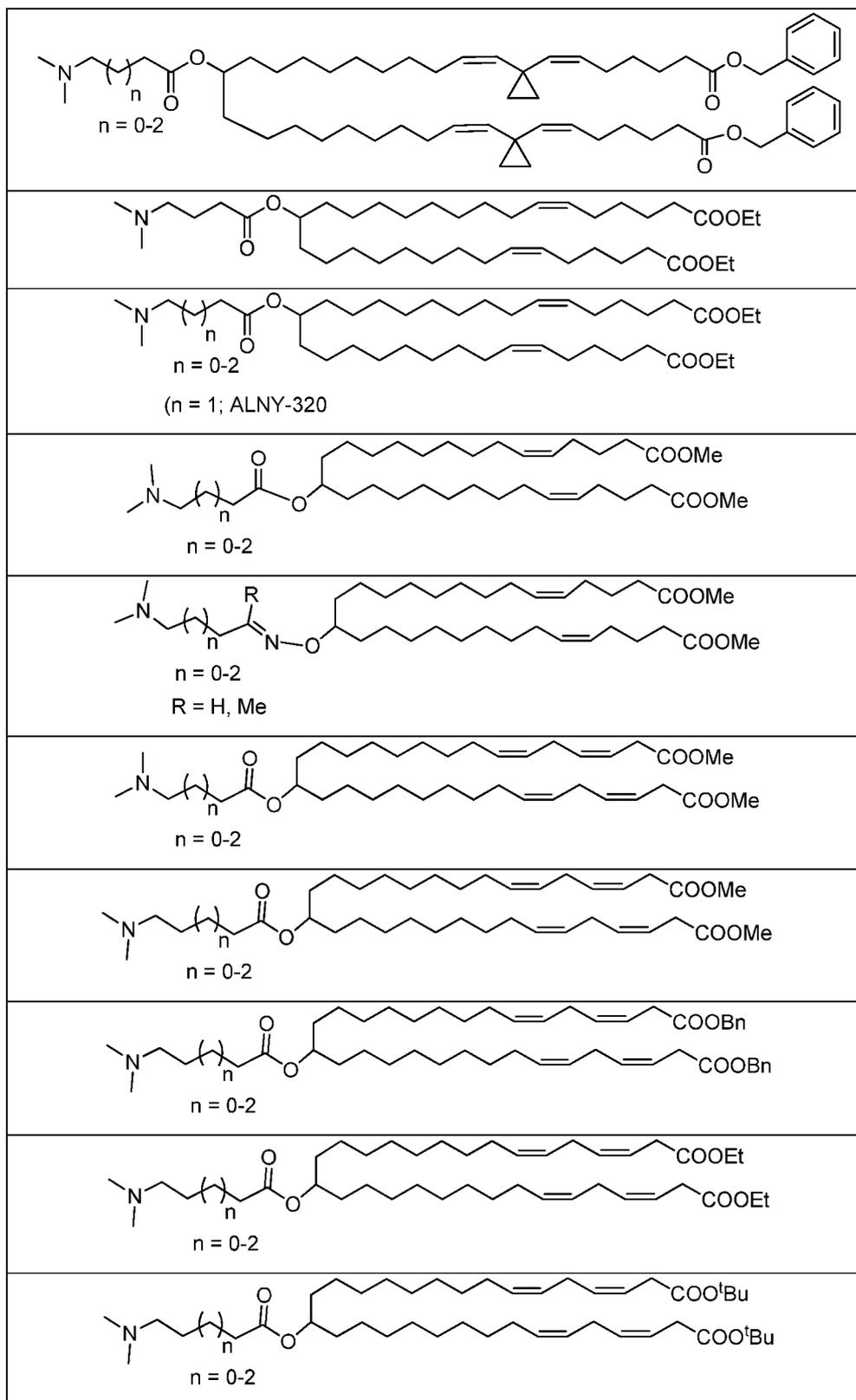


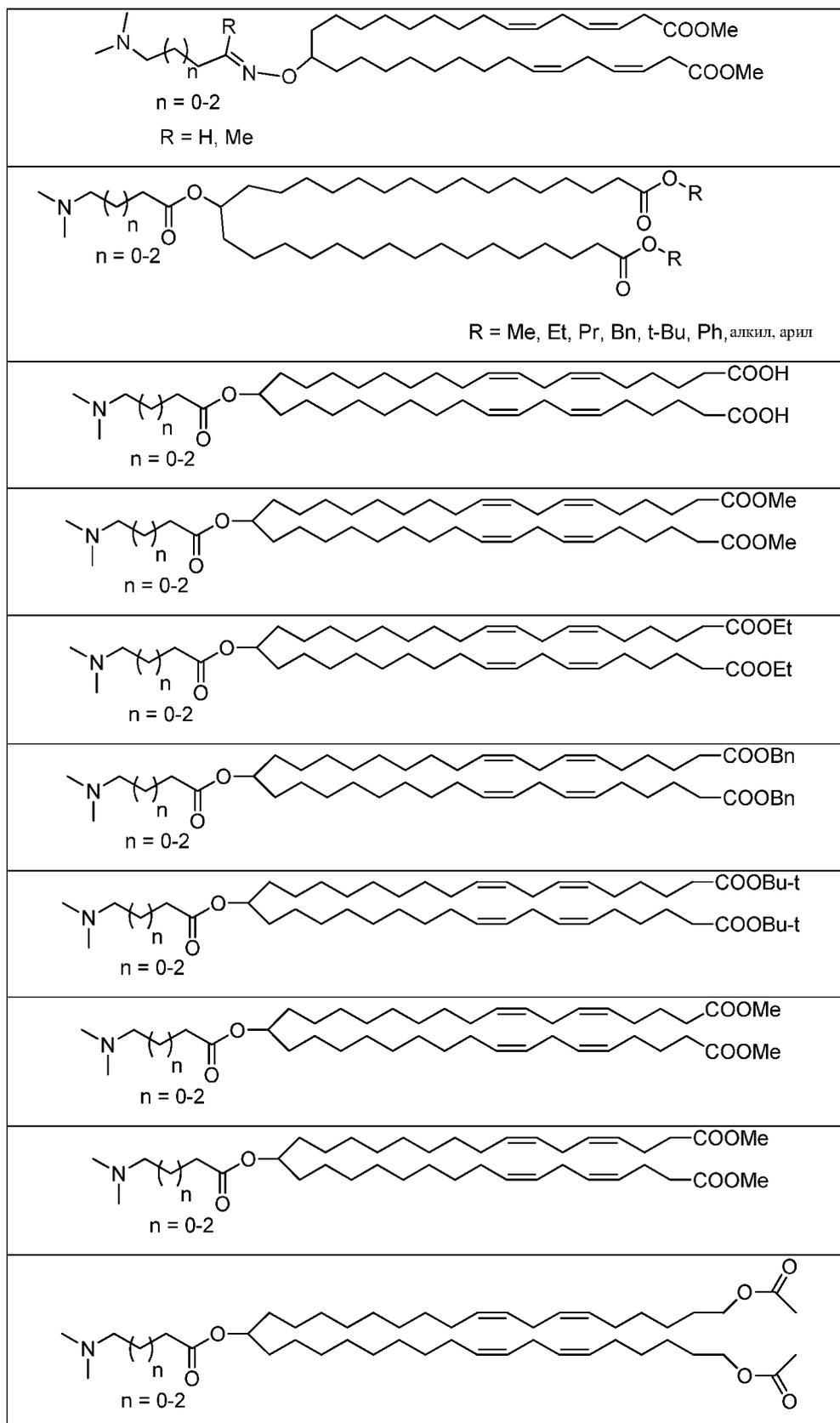


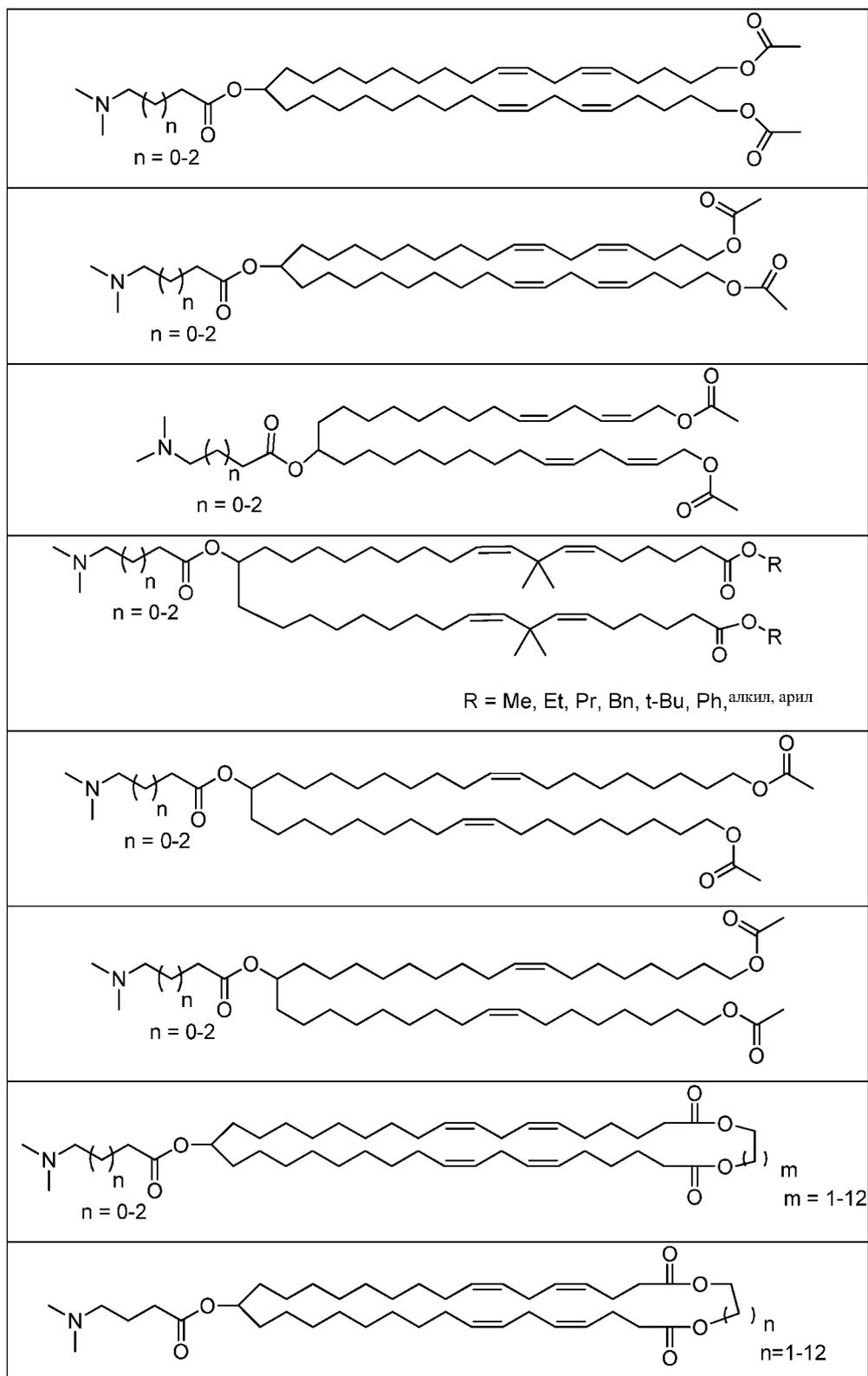




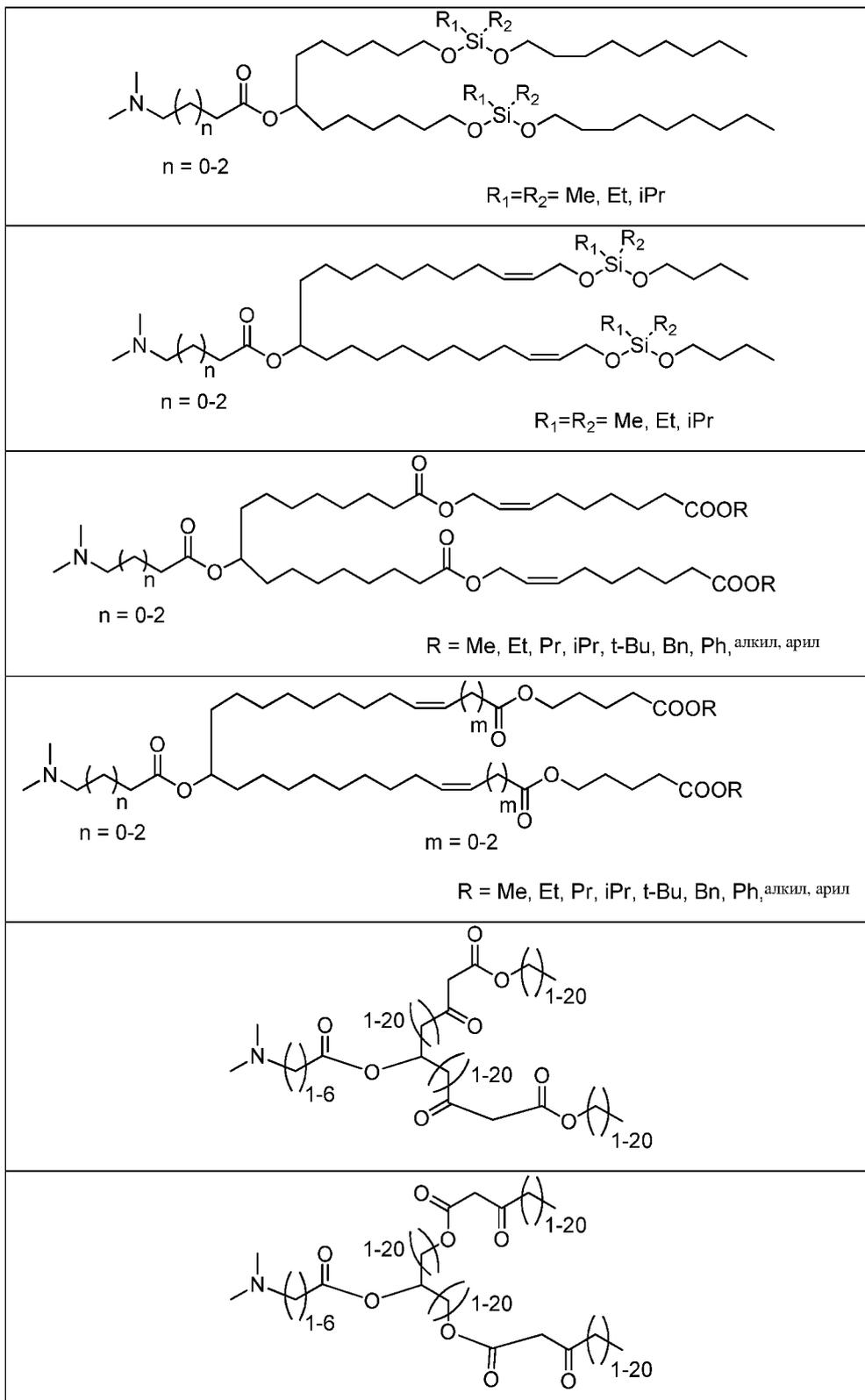












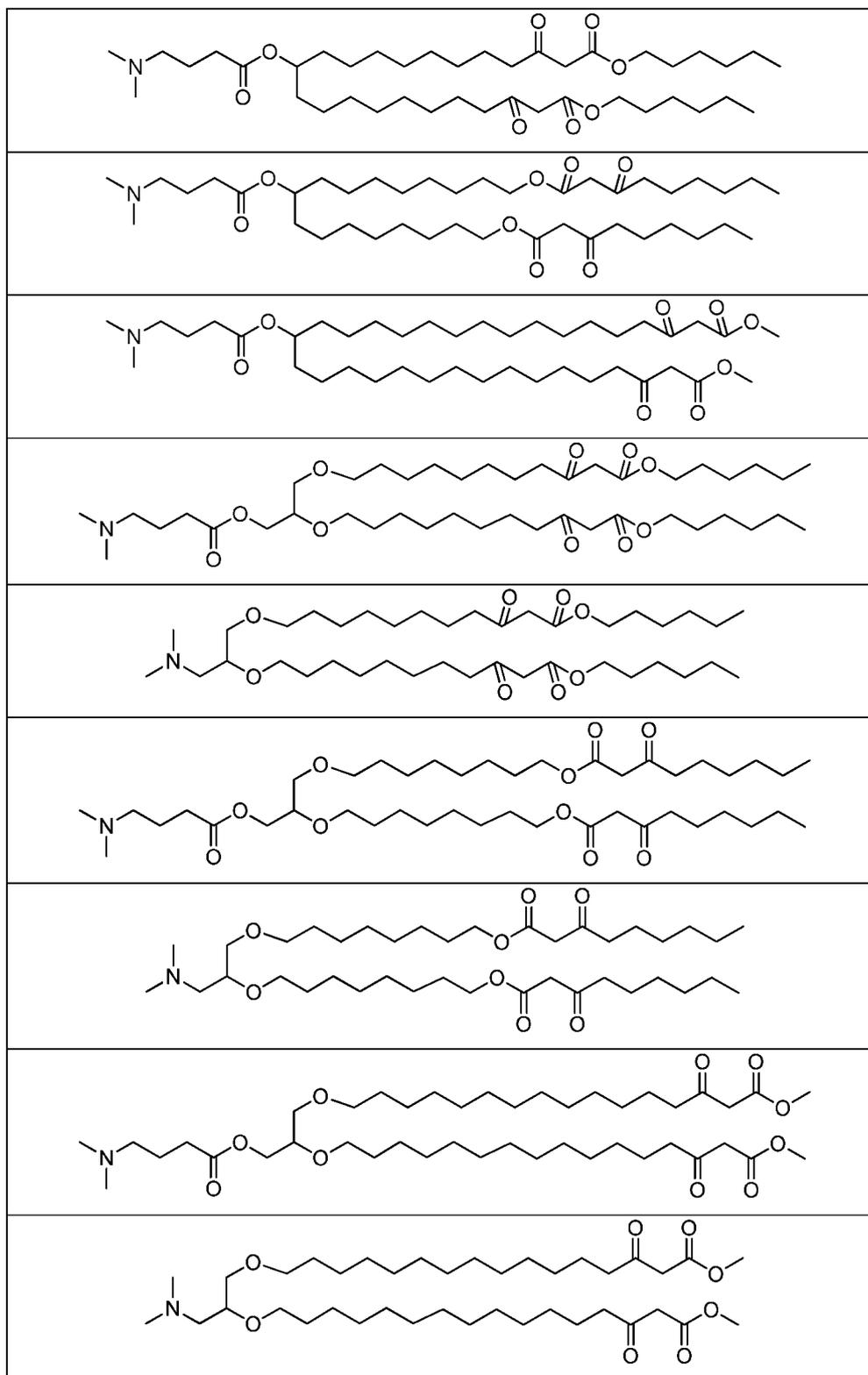
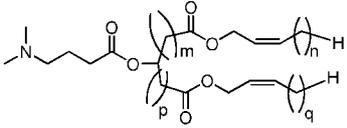
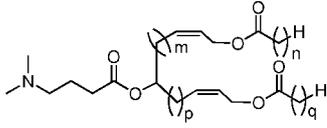


ТАБЛИЦА 5

							
m	n	p	q	m	n	p	q
1	12	1	12	12	1	12	1
2	11	2	11	11	2	11	2
3	10	3	10	10	3	10	3
4	9	4	9	9	4	9	4
5	8	5	8	8	5	8	5
6	7	6	7	7	6	7	6
7	6	7	6	6	7	6	7
8	5	8	5	5	8	5	8
9	4	9	4	4	9	4	9
10	3	10	3	3	10	3	10
11	2	11	2	2	11	2	11
12	1	12	1	1	12	1	12
1	12	2	11	12	1	11	2
2	11	3	10	11	2	10	3
3	10	4	9	10	3	9	4
4	9	5	8	9	4	8	5
5	8	6	7	8	5	7	6
6	7	7	6	7	6	6	7
7	6	8	5	6	7	5	8
8	5	9	4	5	8	4	9
9	4	10	3	4	9	3	10
10	3	11	2	3	10	2	11
11	2	12	1	2	11	1	12
12	1	1	12	1	12	12	1
1	12	3	10	12	1	10	3
2	11	4	9	11	2	9	4
3	10	5	8	10	3	8	5
4	9	6	7	9	4	7	6
5	8	7	6	8	5	6	7
6	7	8	5	7	6	5	8
7	6	9	4	6	7	4	9
8	5	10	3	5	8	3	10

9	4	11	2	4	9	2	11
10	3	12	1	3	10	1	12
11	2	2	11	2	11	11	2
12	1	4	9	1	12	10	3
1	12	4	9	12	1	9	4
2	11	5	8	11	2	8	5
3	10	6	7	10	3	7	6
4	9	7	6	9	4	6	7
5	8	8	5	8	5	5	8
6	7	9	4	7	6	4	9
7	6	10	3	6	7	3	10
8	5	11	2	5	8	2	11
9	4	12	1	4	9	1	12
10	3	2	11	3	10	11	2
11	2	3	10	2	11	10	3
12	1	4	9	1	12	11	2
1	12	5	8	12	1	8	5
2	11	6	7	11	2	7	6
3	10	7	6	10	3	6	7
4	9	8	5	9	4	5	8
5	8	9	4	8	5	4	9
6	7	10	3	7	6	3	10
7	6	11	2	6	7	2	11
8	5	12	1	5	8	1	12
9	4	2	11	4	9	11	2
10	3	3	10	3	10	10	3
11	2	4	9	2	11	11	2
12	1	5	8	1	12	12	1
1	12	6	7	12	1	7	6
2	11	7	6	11	2	6	7
3	10	8	5	10	3	5	8
4	9	9	4	9	4	4	9
5	8	10	3	8	5	3	10
6	7	11	2	7	6	2	11
7	6	12	1	6	7	1	12
8	5	2	11	5	8	11	2

9	4	3	10	4	9	10	3
10	3	4	9	3	10	11	2
11	2	5	8	2	11	12	1
12	1	6	7	1	12	1	12
1	12	7	6	12	1	6	7
2	11	8	5	11	2	5	8
3	10	9	4	10	3	4	9
4	9	8	5	9	4	3	10
5	8	9	4	8	5	2	11
6	7	10	3	7	6	1	12
7	6	11	2	6	7	11	2
8	5	12	1	5	8	10	3
9	4	2	11	4	9	11	2
10	3	3	10	3	10	12	1
11	2	4	9	2	11	1	12
12	1	5	8	1	12	2	11

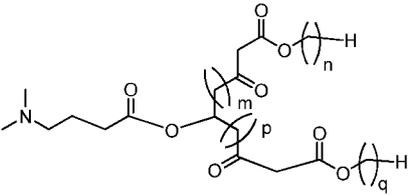
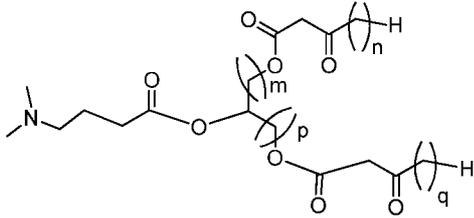
ТАБЛИЦА 6

m	n	p	q	m	n	p	q
1	12	1	12	12	1	12	1
2	11	2	11	11	2	11	2
3	10	3	10	10	3	10	3
4	9	4	9	9	4	9	4
5	8	5	8	8	5	8	5
6	7	6	7	7	6	7	6
7	6	7	6	6	7	6	7
8	5	8	5	5	8	5	8
9	4	9	4	4	9	4	9
10	3	10	3	3	10	3	10
11	2	11	2	2	11	2	11
12	1	12	1	1	12	1	12
1	12	2	11	12	1	11	2
2	11	3	10	11	2	10	3

3	10	4	9	10	3	9	4
4	9	5	8	9	4	8	5
5	8	6	7	8	5	7	6
6	7	7	6	7	6	6	7
7	6	8	5	6	7	5	8
8	5	9	4	5	8	4	9
9	4	10	3	4	9	3	10
10	3	11	2	3	10	2	11
11	2	12	1	2	11	1	12
12	1	1	12	1	12	12	1
1	12	3	10	12	1	10	3
2	11	4	9	11	2	9	4
3	10	5	8	10	3	8	5
4	9	6	7	9	4	7	6
5	8	7	6	8	5	6	7
6	7	8	5	7	6	5	8
7	6	9	4	6	7	4	9
8	5	10	3	5	8	3	10
9	4	11	2	4	9	2	11
10	3	12	1	3	10	1	12
11	2	2	11	2	11	11	2
12	1	4	9	1	12	10	3
1	12	4	9	12	1	9	4
2	11	5	8	11	2	8	5
3	10	6	7	10	3	7	6
4	9	7	6	9	4	6	7
5	8	8	5	8	5	5	8
6	7	9	4	7	6	4	9
7	6	10	3	6	7	3	10
8	5	11	2	5	8	2	11
9	4	12	1	4	9	1	12
10	3	2	11	3	10	11	2
11	2	3	10	2	11	10	3
12	1	4	9	1	12	11	2
1	12	5	8	12	1	8	5
2	11	6	7	11	2	7	6

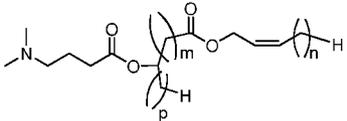
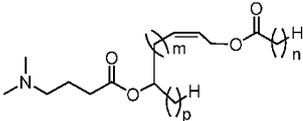
3	10	7	6	10	3	6	7
4	9	8	5	9	4	5	8
5	8	9	4	8	5	4	9
6	7	10	3	7	6	3	10
7	6	11	2	6	7	2	11
8	5	12	1	5	8	1	12
9	4	2	11	4	9	11	2
10	3	3	10	3	10	10	3
11	2	4	9	2	11	11	2
12	1	5	8	1	12	12	1
1	12	6	7	12	1	7	6
2	11	7	6	11	2	6	7
3	10	8	5	10	3	5	8
4	9	9	4	9	4	4	9
5	8	10	3	8	5	3	10
6	7	11	2	7	6	2	11
7	6	12	1	6	7	1	12
8	5	2	11	5	8	11	2
9	4	3	10	4	9	10	3
10	3	4	9	3	10	11	2
11	2	5	8	2	11	12	1
12	1	6	7	1	12	1	12
1	12	7	6	12	1	6	7
2	11	8	5	11	2	5	8
3	10	9	4	10	3	4	9
4	9	8	5	9	4	3	10
5	8	9	4	8	5	2	11
6	7	10	3	7	6	1	12
7	6	11	2	6	7	11	2
8	5	12	1	5	8	10	3
9	4	2	11	4	9	11	2
10	3	3	10	3	10	12	1
11	2	4	9	2	11	1	12
12	1	5	8	1	12	2	11

ТАБЛИЦА 7

							
m	n	p	q	m	n	p	q
1	13	1	13	1	13	1	13
2	12	2	12	2	12	2	12
3	11	3	11	3	11	3	11
4	10	4	10	4	10	4	10
5	9	5	9	5	9	5	9
6	8	6	8	6	8	6	8
7	7	7	7	7	7	7	7
8	6	8	6	8	6	8	6
9	5	9	5	9	5	9	5
10	4	10	4	10	4	10	4
11	3	11	3	11	3	11	3
12	2	12	2	12	2	12	2
13	1	13	1	13	1	13	1
1	13	2	12	1	13	2	12
2	12	3	11	2	12	3	11
3	11	4	10	3	11	4	10
4	10	5	9	4	10	5	9
5	9	6	8	5	9	6	8
6	8	7	7	6	8	7	7
7	7	8	6	7	7	8	6
8	6	9	5	8	6	9	5
9	5	10	4	9	5	10	4
10	4	11	3	10	4	11	3
11	3	12	2	11	3	12	2
12	2	13	1	12	2	13	1
13	1	1	13	13	1	1	13
1	13	3	11	1	13	3	11
2	12	4	10	2	12	4	10
3	11	5	9	3	11	5	9
4	10	6	8	4	10	6	8

5	9	7	7	5	9	7	7
6	8	8	6	6	8	8	6
7	7	9	5	7	7	9	5
8	6	10	4	8	6	10	4
9	5	11	3	9	5	11	3
10	4	12	2	10	4	12	2
11	3	13	1	11	3	13	1
12	2	1	13	12	2	1	13
13	1	2	12	13	1	2	14

ТАБЛИЦА 8

							
m	n	p		m	n	p	
1	12	18		12	1	18	
2	11	18		11	2	18	
3	10	18		10	3	18	
4	9	18		9	4	18	
5	8	18		8	5	18	
6	7	18		7	6	18	
7	6	18		6	7	18	
8	5	18		5	8	18	
9	4	18		4	9	18	
10	3	18		3	10	18	
11	2	18		2	11	18	
12	1	18		1	12	18	
1	12	17		12	1	17	
2	11	17		11	2	17	
3	10	17		10	3	17	
4	9	17		9	4	17	
5	8	17		8	5	17	
6	7	17		7	6	17	
7	6	17		6	7	17	
8	5	17		5	8	17	
9	4	17		4	9	17	

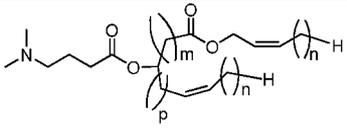
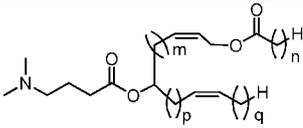
10	3	17		3	10	17	
11	2	17		2	11	17	
12	1	17		1	12	17	
1	12	16		12	1	16	
2	11	16		11	2	16	
3	10	16		10	3	16	
4	9	16		9	4	16	
5	8	16		8	5	16	
6	7	16		7	6	16	
7	6	16		6	7	16	
8	5	16		5	8	16	
9	4	16		4	9	16	
10	3	16		3	10	16	
11	2	16		2	11	16	
12	1	16		1	12	16	
1	12	15		12	1	15	
2	11	15		11	2	15	
3	10	15		10	3	15	
4	9	15		9	4	15	
5	8	15		8	5	15	
6	7	15		7	6	15	
7	6	15		6	7	15	
8	5	15		5	8	15	
9	4	15		4	9	15	
10	3	15		3	10	15	
11	2	15		2	11	15	
12	1	15		1	12	15	
1	12	14		12	1	14	
2	11	14		11	2	14	
3	10	14		10	3	14	
4	9	14		9	4	14	
5	8	14		8	5	14	
6	7	14		7	6	14	
7	6	14		6	7	14	
8	5	14		5	8	14	
9	4	14		4	9	14	

10	3	14		3	10	14	
11	2	14		2	11	14	
12	1	14		1	12	14	
1	12	13		12	1	13	
2	11	13		11	2	13	
3	10	13		10	3	13	
4	9	13		9	4	13	
5	8	13		8	5	13	
6	7	13		7	6	13	
7	6	13		6	7	13	
8	5	13		5	8	13	
9	4	13		4	9	13	
10	3	13		3	10	13	
11	2	13		2	11	13	
12	1	13		1	12	13	
1	12	12		12	1	12	
2	11	12		11	2	12	
3	10	12		10	3	12	
4	9	12		9	4	12	
5	8	12		8	5	12	
6	7	12		7	6	12	
7	6	12		6	7	12	
8	5	12		5	8	12	
9	4	12		4	9	12	
10	3	12		3	10	12	
11	2	12		2	11	12	
12	1	12		1	12	12	
1	12	11		12	1	11	
2	11	11		11	2	11	
3	10	11		10	3	11	
4	9	11		9	4	11	
5	8	11		8	5	11	
6	7	11		7	6	11	
7	6	11		6	7	11	
8	5	11		5	8	11	
9	4	11		4	9	11	

10	3	11		3	10	11	
11	2	11		2	11	11	
12	1	11		1	12	11	
12	1	10		12	1	10	
1	12	10		11	2	10	
2	11	10		10	3	10	
3	10	10		9	4	10	
4	9	10		8	5	10	
5	8	10		7	6	10	
6	7	10		6	7	10	
7	6	10		5	8	10	
8	5	10		4	9	10	
9	4	10		3	10	10	
10	3	10		2	11	10	
11	2	10		1	12	10	
12	1	10		12	1	10	
1	12	9		11	2	9	
2	11	9		10	3	9	
3	10	9		9	4	9	
4	9	9		8	5	9	
5	8	9		7	6	9	
6	7	9		6	7	9	
7	6	9		5	8	9	
8	5	9		4	9	9	
9	4	9		3	10	9	
10	3	9		2	11	9	
11	2	9		1	12	9	
12	1	9		12	1	9	
1	12	8		11	2	8	
2	11	8		10	3	8	
3	10	8		9	4	8	
4	9	8		8	5	8	
5	8	8		7	6	8	
6	7	8		6	7	8	
7	6	8		5	8	8	
8	5	8		4	9	8	

9	4	8		3	10	8	
10	3	8		2	11	8	
11	2	8		1	12	8	
12	1	8		12	1	8	

ТАБЛИЦА 9

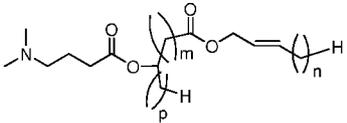
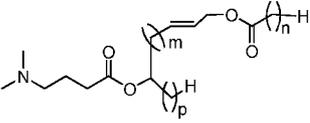
							
m	n	p	q	m	n	p	q
1	12	8	8	12	1	8	8
2	11	8	8	11	2	8	8
3	10	8	8	10	3	8	8
4	9	8	8	9	4	8	8
5	8	8	8	8	5	8	8
6	7	8	8	7	6	8	8
7	6	8	8	6	7	8	8
8	5	8	8	5	8	8	8
9	4	8	8	4	9	8	8
10	3	8	8	3	10	8	8
11	2	8	8	2	11	8	8
12	1	8	8	1	12	8	8
1	12	9	7	12	1	9	7
2	11	9	7	11	2	9	7
3	10	9	7	10	3	9	7
4	9	9	7	9	4	9	7
5	8	9	7	8	5	9	7
6	7	9	7	7	6	9	7
7	6	9	7	6	7	9	7
8	5	9	7	5	8	9	7
9	4	9	7	4	9	9	7
10	3	9	7	3	10	9	7
11	2	9	7	2	11	9	7
12	1	9	7	1	12	9	7
1	12	10	6	12	1	10	6
2	11	10	6	11	2	10	6

3	10	10	6	10	3	10	6
4	9	10	6	9	4	10	6
5	8	10	6	8	5	10	6
6	7	10	6	7	6	10	6
7	6	10	6	6	7	10	6
8	5	10	6	5	8	10	6
9	4	10	6	4	9	10	6
10	3	10	6	3	10	10	6
11	2	10	6	2	11	10	6
12	1	10	6	1	12	10	6
1	12	11	5	12	1	11	5
2	11	11	5	11	2	11	5
3	10	11	5	10	3	11	5
4	9	11	5	9	4	11	5
5	8	11	5	8	5	11	5
6	7	11	5	7	6	11	5
7	6	11	5	6	7	11	5
8	5	11	5	5	8	11	5
9	4	11	5	4	9	11	5
10	3	11	5	3	10	11	5
11	2	11	5	2	11	11	5
12	1	11	5	1	12	11	5
1	12	12	4	12	1	12	4
2	11	12	4	11	2	12	4
3	10	12	4	10	3	12	4
4	9	12	4	9	4	12	4
5	8	12	4	8	5	12	4
6	7	12	4	7	6	12	4
7	6	12	4	6	7	12	4
8	5	12	4	5	8	12	4
9	4	12	4	4	9	12	4
10	3	12	4	3	10	12	4
11	2	12	4	2	11	12	4
12	1	12	4	1	12	12	4
1	12	13	3	12	1	13	3
2	11	13	3	11	2	13	3

3	10	13	3	10	3	13	3
4	9	13	3	9	4	13	3
5	8	13	3	8	5	13	3
6	7	13	3	7	6	13	3
7	6	13	3	6	7	13	3
8	5	13	3	5	8	13	3
9	4	13	3	4	9	13	3
10	3	13	3	3	10	13	3
11	2	13	3	2	11	13	3
12	1	13	3	1	12	13	3
1	12	14	2	12	1	14	2
2	11	14	2	11	2	14	2
3	10	14	2	10	3	14	2
4	9	14	2	9	4	14	2
5	8	14	2	8	5	14	2
6	7	14	2	7	6	14	2
7	6	14	2	6	7	14	2
8	5	14	2	5	8	14	2
9	4	14	2	4	9	14	2
10	3	14	2	3	10	14	2
11	2	14	2	2	11	14	2
12	1	14	2	1	12	14	2
1	12	7	9	12	1	7	9
2	11	7	9	11	2	7	9
3	10	7	9	10	3	7	9
4	9	7	9	9	4	7	9
5	8	7	9	8	5	7	9
6	7	7	9	7	6	7	9
7	6	7	9	6	7	7	9
8	5	7	9	5	8	7	9
9	4	7	9	4	9	7	9
10	3	7	9	3	10	7	9
11	2	7	9	2	11	7	9
12	1	7	9	1	12	7	9
12	1	6	10	12	1	6	10
1	12	6	10	11	2	6	10

2	11	6	10	10	3	6	10
3	10	6	10	9	4	6	10
4	9	6	10	8	5	6	10
5	8	6	10	7	6	6	10
6	7	6	10	6	7	6	10
7	6	6	10	5	8	6	10
8	5	6	10	4	9	6	10
9	4	6	10	3	10	6	10
10	3	6	10	2	11	6	10
11	2	6	10	1	12	6	10
12	1	6	10	12	1	6	10
1	12	5	11	11	2	5	11
2	11	5	11	10	3	5	11
3	10	5	11	9	4	5	11
4	9	5	11	8	5	5	11
5	8	5	11	7	6	5	11
6	7	5	11	6	7	5	11
7	6	5	11	5	8	5	11
8	5	5	11	4	9	5	11
9	4	5	11	3	10	5	11
10	3	5	11	2	11	5	11
11	2	5	11	1	12	5	11
12	1	5	11	12	1	5	11
1	12	4	12	11	2	4	12
2	11	4	12	10	3	4	12
3	10	4	12	9	4	4	12
4	9	4	12	8	5	4	12
5	8	4	12	7	6	4	12
6	7	4	12	6	7	4	12
7	6	4	12	5	8	4	12
8	5	4	12	4	9	4	12
9	4	4	12	3	10	4	12
10	3	4	12	2	11	4	12
11	2	4	12	1	12	4	12
12	1	4	12	12	1	4	12

ТАБЛИЦА 10

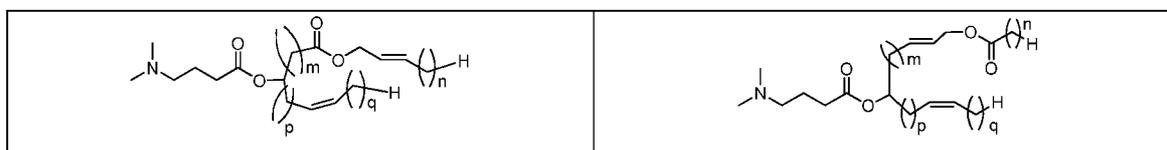
							
m	n	p		m	n	p	
1	12	18		12	1	18	
2	11	18		11	2	18	
3	10	18		10	3	18	
4	9	18		9	4	18	
5	8	18		8	5	18	
6	7	18		7	6	18	
7	6	18		6	7	18	
8	5	18		5	8	18	
9	4	18		4	9	18	
10	3	18		3	10	18	
11	2	18		2	11	18	
12	1	18		1	12	18	
1	12	17		12	1	17	
2	11	17		11	2	17	
3	10	17		10	3	17	
4	9	17		9	4	17	
5	8	17		8	5	17	
6	7	17		7	6	17	
7	6	17		6	7	17	
8	5	17		5	8	17	
9	4	17		4	9	17	
10	3	17		3	10	17	
11	2	17		2	11	17	
12	1	17		1	12	17	
1	12	16		12	1	16	
2	11	16		11	2	16	
3	10	16		10	3	16	
4	9	16		9	4	16	
5	8	16		8	5	16	
6	7	16		7	6	16	

7	6	16		6	7	16	
8	5	16		5	8	16	
9	4	16		4	9	16	
10	3	16		3	10	16	
11	2	16		2	11	16	
12	1	16		1	12	16	
1	12	15		12	1	15	
2	11	15		11	2	15	
3	10	15		10	3	15	
4	9	15		9	4	15	
5	8	15		8	5	15	
6	7	15		7	6	15	
7	6	15		6	7	15	
8	5	15		5	8	15	
9	4	15		4	9	15	
10	3	15		3	10	15	
11	2	15		2	11	15	
12	1	15		1	12	15	
1	12	14		12	1	14	
2	11	14		11	2	14	
3	10	14		10	3	14	
4	9	14		9	4	14	
5	8	14		8	5	14	
6	7	14		7	6	14	
7	6	14		6	7	14	
8	5	14		5	8	14	
9	4	14		4	9	14	
10	3	14		3	10	14	
11	2	14		2	11	14	
12	1	14		1	12	14	
1	12	13		12	1	13	
2	11	13		11	2	13	
3	10	13		10	3	13	
4	9	13		9	4	13	
5	8	13		8	5	13	
6	7	13		7	6	13	

7	6	13		6	7	13	
8	5	13		5	8	13	
9	4	13		4	9	13	
10	3	13		3	10	13	
11	2	13		2	11	13	
12	1	13		1	12	13	
1	12	12		12	1	12	
2	11	12		11	2	12	
3	10	12		10	3	12	
4	9	12		9	4	12	
5	8	12		8	5	12	
6	7	12		7	6	12	
7	6	12		6	7	12	
8	5	12		5	8	12	
9	4	12		4	9	12	
10	3	12		3	10	12	
11	2	12		2	11	12	
12	1	12		1	12	12	
1	12	11		12	1	11	
2	11	11		11	2	11	
3	10	11		10	3	11	
4	9	11		9	4	11	
5	8	11		8	5	11	
6	7	11		7	6	11	
7	6	11		6	7	11	
8	5	11		5	8	11	
9	4	11		4	9	11	
10	3	11		3	10	11	
11	2	11		2	11	11	
12	1	11		1	12	11	
12	1	10		12	1	10	
1	12	10		11	2	10	
2	11	10		10	3	10	
3	10	10		9	4	10	
4	9	10		8	5	10	
5	8	10		7	6	10	

6	7	10		6	7	10	
7	6	10		5	8	10	
8	5	10		4	9	10	
9	4	10		3	10	10	
10	3	10		2	11	10	
11	2	10		1	12	10	
12	1	10		12	1	10	
1	12	9		11	2	9	
2	11	9		10	3	9	
3	10	9		9	4	9	
4	9	9		8	5	9	
5	8	9		7	6	9	
6	7	9		6	7	9	
7	6	9		5	8	9	
8	5	9		4	9	9	
9	4	9		3	10	9	
10	3	9		2	11	9	
11	2	9		1	12	9	
12	1	9		12	1	9	
1	12	8		11	2	8	
2	11	8		10	3	8	
3	10	8		9	4	8	
4	9	8		8	5	8	
5	8	8		7	6	8	
6	7	8		6	7	8	
7	6	8		5	8	8	
8	5	8		4	9	8	
9	4	8		3	10	8	
10	3	8		2	11	8	
11	2	8		1	12	8	
12	1	8		12	1	8	

ТАБЛИЦА 11



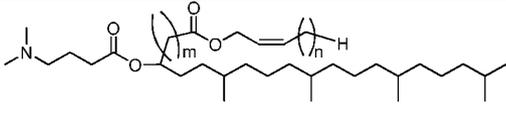
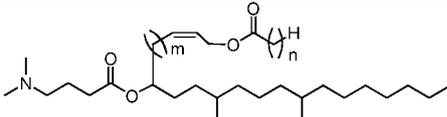
m	n	p	q	m	n	p	q
1	12	8	8	12	1	8	8
2	11	8	8	11	2	8	8
3	10	8	8	10	3	8	8
4	9	8	8	9	4	8	8
5	8	8	8	8	5	8	8
6	7	8	8	7	6	8	8
7	6	8	8	6	7	8	8
8	5	8	8	5	8	8	8
9	4	8	8	4	9	8	8
10	3	8	8	3	10	8	8
11	2	8	8	2	11	8	8
12	1	8	8	1	12	8	8
1	12	9	7	12	1	9	7
2	11	9	7	11	2	9	7
3	10	9	7	10	3	9	7
4	9	9	7	9	4	9	7
5	8	9	7	8	5	9	7
6	7	9	7	7	6	9	7
7	6	9	7	6	7	9	7
8	5	9	7	5	8	9	7
9	4	9	7	4	9	9	7
10	3	9	7	3	10	9	7
11	2	9	7	2	11	9	7
12	1	9	7	1	12	9	7
1	12	10	6	12	1	10	6
2	11	10	6	11	2	10	6
3	10	10	6	10	3	10	6
4	9	10	6	9	4	10	6
5	8	10	6	8	5	10	6
6	7	10	6	7	6	10	6
7	6	10	6	6	7	10	6
8	5	10	6	5	8	10	6
9	4	10	6	4	9	10	6
10	3	10	6	3	10	10	6
11	2	10	6	2	11	10	6

12	1	10	6	1	12	10	6
1	12	11	5	12	1	11	5
2	11	11	5	11	2	11	5
3	10	11	5	10	3	11	5
4	9	11	5	9	4	11	5
5	8	11	5	8	5	11	5
6	7	11	5	7	6	11	5
7	6	11	5	6	7	11	5
8	5	11	5	5	8	11	5
9	4	11	5	4	9	11	5
10	3	11	5	3	10	11	5
11	2	11	5	2	11	11	5
12	1	11	5	1	12	11	5
1	12	12	4	12	1	12	4
2	11	12	4	11	2	12	4
3	10	12	4	10	3	12	4
4	9	12	4	9	4	12	4
5	8	12	4	8	5	12	4
6	7	12	4	7	6	12	4
7	6	12	4	6	7	12	4
8	5	12	4	5	8	12	4
9	4	12	4	4	9	12	4
10	3	12	4	3	10	12	4
11	2	12	4	2	11	12	4
12	1	12	4	1	12	12	4
1	12	13	3	12	1	13	3
2	11	13	3	11	2	13	3
3	10	13	3	10	3	13	3
4	9	13	3	9	4	13	3
5	8	13	3	8	5	13	3
6	7	13	3	7	6	13	3
7	6	13	3	6	7	13	3
8	5	13	3	5	8	13	3
9	4	13	3	4	9	13	3
10	3	13	3	3	10	13	3
11	2	13	3	2	11	13	3

12	1	13	3	1	12	13	3
1	12	14	2	12	1	14	2
2	11	14	2	11	2	14	2
3	10	14	2	10	3	14	2
4	9	14	2	9	4	14	2
5	8	14	2	8	5	14	2
6	7	14	2	7	6	14	2
7	6	14	2	6	7	14	2
8	5	14	2	5	8	14	2
9	4	14	2	4	9	14	2
10	3	14	2	3	10	14	2
11	2	14	2	2	11	14	2
12	1	14	2	1	12	14	2
1	12	7	9	12	1	7	9
2	11	7	9	11	2	7	9
3	10	7	9	10	3	7	9
4	9	7	9	9	4	7	9
5	8	7	9	8	5	7	9
6	7	7	9	7	6	7	9
7	6	7	9	6	7	7	9
8	5	7	9	5	8	7	9
9	4	7	9	4	9	7	9
10	3	7	9	3	10	7	9
11	2	7	9	2	11	7	9
12	1	7	9	1	12	7	9
12	1	6	10	12	1	6	10
1	12	6	10	11	2	6	10
2	11	6	10	10	3	6	10
3	10	6	10	9	4	6	10
4	9	6	10	8	5	6	10
5	8	6	10	7	6	6	10
6	7	6	10	6	7	6	10
7	6	6	10	5	8	6	10
8	5	6	10	4	9	6	10
9	4	6	10	3	10	6	10
10	3	6	10	2	11	6	10

11	2	6	10	1	12	6	10
12	1	6	10	12	1	6	10
1	12	5	11	11	2	5	11
2	11	5	11	10	3	5	11
3	10	5	11	9	4	5	11
4	9	5	11	8	5	5	11
5	8	5	11	7	6	5	11
6	7	5	11	6	7	5	11
7	6	5	11	5	8	5	11
8	5	5	11	4	9	5	11
9	4	5	11	3	10	5	11
10	3	5	11	2	11	5	11
11	2	5	11	1	12	5	11
12	1	5	11	12	1	5	11
1	12	4	12	11	2	4	12
2	11	4	12	10	3	4	12
3	10	4	12	9	4	4	12
4	9	4	12	8	5	4	12
5	8	4	12	7	6	4	12
6	7	4	12	6	7	4	12
7	6	4	12	5	8	4	12
8	5	4	12	4	9	4	12
9	4	4	12	3	10	4	12
10	3	4	12	2	11	4	12
11	2	4	12	1	12	4	12
12	1	4	12	12	1	4	12

ТАБЛИЦА 12

			
m	n	m	n
1	12	12	1
2	11	11	2
3	10	10	3
4	9	9	4

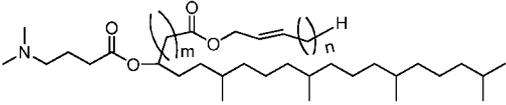
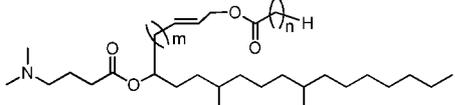
5	8	8	5
6	7	7	6
7	6	6	7
8	5	5	8
9	4	4	9
10	3	3	10
11	2	2	11
12	1	1	12
			
1	12	12	1
2	11	11	2
3	10	10	3
4	9	9	4
5	8	8	5
6	7	7	6
7	6	6	7
8	5	5	8
9	4	4	9
10	3	3	10
11	2	2	11
12	1	1	12

ТАБЛИЦА 13

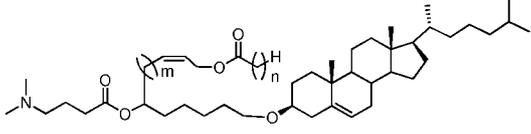
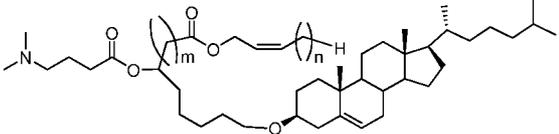
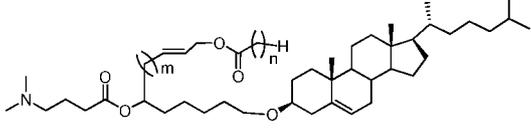
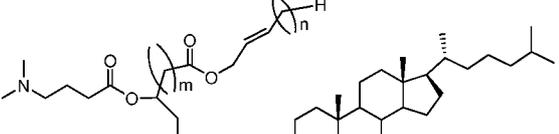
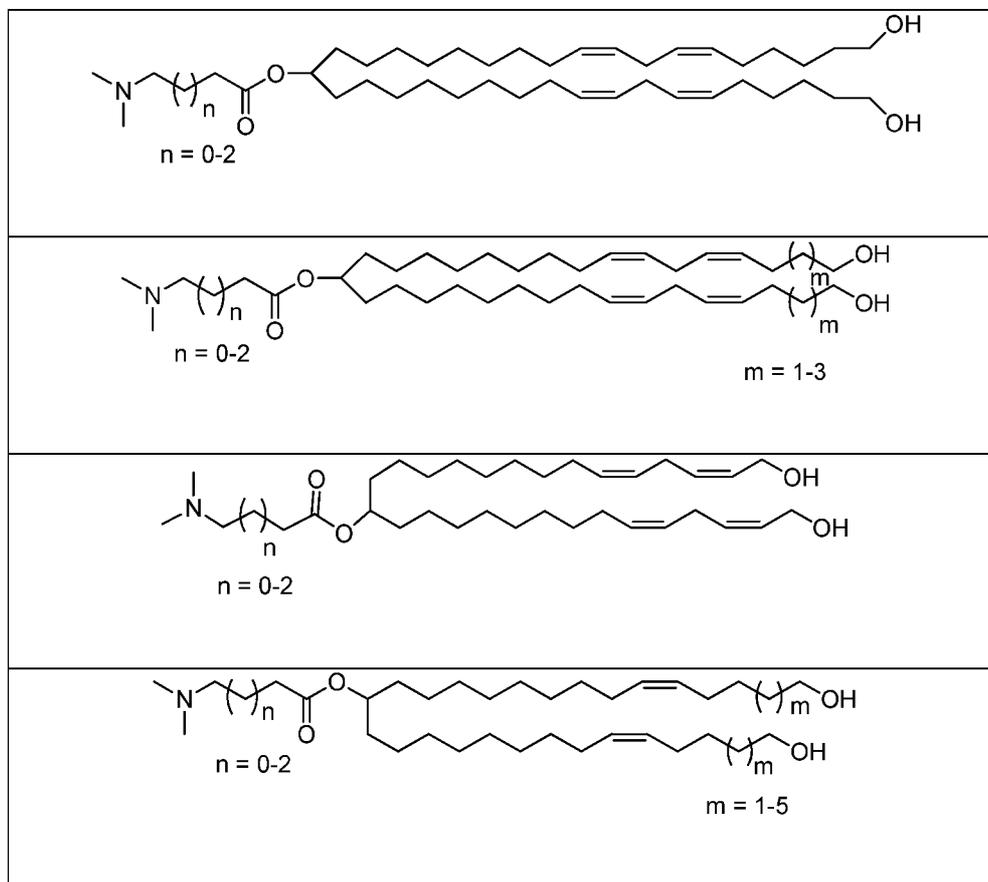
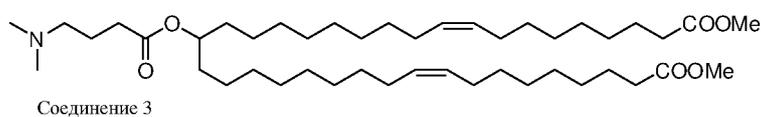
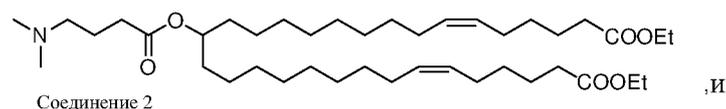
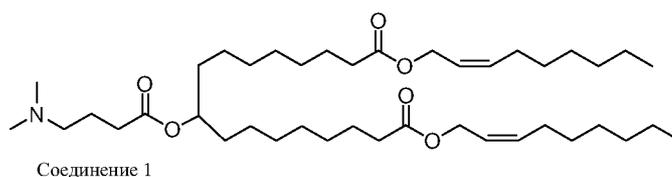
			
m	n	m	n
1	12	12	1
2	11	11	2
3	10	10	3
4	9	9	4
5	8	8	5
6	7	7	6
7	6	6	7
8	5	5	8
9	4	4	9
10	3	3	10
11	2	2	11
12	1	1	12
			
1	12	12	1
2	11	11	2
3	10	10	3
4	9	9	4
5	8	8	5
6	7	7	6
7	6	6	7
8	5	5	8
9	4	4	9
10	3	3	10
11	2	2	11
12	1	1	12

ТАБЛИЦА 14

Следующие соединения могут быть использованы в качестве промежуточных продуктов в синтезе катионных липидов в соответствии с настоящим изобретением.



В одном варианте воплощения катионный липид настоящего изобретения выбран из следующих соединений и их солей (в том числе фармацевтически приемлемых солей):



Катионные липиды включают те, которые имеют альтернативные группы жирных кислот и другие диалкиламино группы, в том числе те, в которых алкильные заместители различны (например, N-этил-N-метиламино-, N -пропил -N -этиламино- и т.п.). Для тех вариантов воплощения, в которых  $R^1$  и  $R^2$  являются длинными цепями алкил, алкенил, алкинил или циклоалкилалкил групп, они могут быть одинаковыми или разными. В общем, липиды (например, катионный липид), имеющие менее насыщенные ацильные цепи меньшего размера, особенно когда комплексы размером меньше примерно 0,3 мкм, для целей фильтровой стерилизации. Катионные липиды, содержащие ненасыщенные жирные кислоты с длиной углеродной цепи в диапазоне от  $C_{10}$  до  $C_{20}$  являются типичными. Другие структурные компоненты также могут быть использованы для разделения аминокислотной группы (например, аминогруппы катионных липидов) и жирные кислоты или жирные алкильные части катионных липидов. Подходящие структуры известны специалистам в данной области.

В некоторых вариантах воплощения катионные липиды имеют по меньшей мере одну протонированную или депротонированную группу, такие, что липид положительно заряжен при рН на уровне или ниже физиологического рН (например, рН 7,4), и нейтральный при втором рН, предпочтительно на уровне или выше физиологических значения рН. Такие липиды также называют катионными липидами. Конечно, следует понимать, что добавление или удаление протонов в зависимости от рН равновесного процесса, и что ссылка на заряженные или нейтральные липиды относится к характеру преобладающего вида и не требует, чтобы все липиды находились в заряженной или нейтральной форме. Липид может иметь более одной протонированной или депротонированной группы, или может быть цвиттерионом.

В некоторых вариантах воплощения протонированные липиды (например, катионные липиды) имеют  $pK_a$  протонированной группы в диапазоне от 4 до 11. Как правило, липиды будут иметь  $pK_a$  примерно от 4 до 7, например, между 5 и 7, например, между примерно 5,5 и 6,8, при введении в липидные частицы. Такие липиды будут катионными при более низких значениях рН, в то время как частицы будут в значительной степени (хотя и не полностью) поверхностно нейтрализованы при физиологическом рН около рН 7,4. Одним из преимуществ  $pK_a$  в диапазоне между 4 и 7 является то, что по меньшей мере некоторые нуклеиновые кислоты, связанные с внешней поверхностью частиц, будут терять свое электростатическое взаимодействие при физиологическом рН и будут удалены простым диализом, таким образом значительно уменьшая восприимчивость частиц к выведению. Измерение  $pK_a$  липидов в липидных

частицах может быть выполнено, например, с помощью флуоресцентного зонда 2-(*p*-толуидино)-6-нафталин сульфокислоты (TNS), с использованием способов, описанных в Cullis et al., (1986) *Chem Phys Lipids* 40, 127-144, который включен в качестве ссылки в полном объеме.

В конкретных вариантах воплощения липиды являются заряженными липидами. Как здесь используется, термин "заряженный липид" означает включение этих липидов, имеющих одну или две жирные ацильные или жирные алкильные цепи и четвертичные аминогруппы. Четвертичные амины обеспечивают постоянный положительный заряд. Головная группа может по желанию включать ионизируемые группы, такие как первичный, вторичный или третичный амин, которые могут быть протонированы при физиологическом значении pH. Наличие четвертичных аминов может изменить  $pK_a$  ионизируемые группы по отношению к  $pK_a$  группы в структурно подобных соединениях, где не хватает четвертичных аминов (например, четвертичный амин заменен на третичный амин). В некоторых вариантах воплощения заряженный липид называют "амино липидом". См., например, предварительную заявку на патент США 61/267 419, поданную 7 декабря 2009 года, которая включена в качестве ссылки в полном объеме.

Один или несколько дополнительных катионных липидов, которые несут в себе положительный заряд примерно в физиологическом значении pH, в дополнение к тем, которые описаны выше, могут быть также включены в липидные частицы и композиции, описанные здесь. Такие катионные липиды включают, но не ограничиваются этим, N, N-диолеил- N, N- диметиламмоний хлорид ("DODAC"); N-(2,3- диолеилокси) пропил-N, N- триэтиламмония хлорид ("DOTMA"), N, N- дистеарил- N,N- диметиламмоний бромид ("DDAB"), N-(2,3- диолеилокси) пропил- N,N,N- триметиламмония хлорид ("DOTAP"); 1,2- диолеилокси -3- триметиламинопропан хлорида соль ("DOTAP.Cl"); 3 $\beta$ -(N-(N,N'- диметиламиноэтан) карбамоил) холестерин ("DC-Chol"), N-(1-(2,3- диолеилокси) пропил)- N- 2- (сперминекарбоксамидо) этил)-N,N-диметиламмоний трифторацетат ("DOSPA"), диоктадециламидоглицил карбоксиспермин ("DOGS"), 1,2-диолеоил- sn-3 фосфоэтанолламин ("DOPE"), 1,2-диолеоил -3-диметиламмоний пропан ("DODAP"), N,N- диметил- 2,3- диолеилокси) пропиламин ("DODMA") и N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксиэтил бромид ("DMRIE"). Кроме того, ряд коммерческих препаратов катионных липидов могут быть использованы, такие как, например, LIPOFECTIN (в том числе DOTMA и DOPE, доступные от GIBCO / BRL) и LIPOFECTAMINE (включая DOSPA и DOPE, доступный от GIBCO / BRL). В конкретных вариантах воплощений катионный липид является аминолипидом.

### **Нейтральный липид**

Липидные частицы и композиции, описанные здесь, могут также включать один или больше нейтральных липидов. Нейтральные липиды, когда они присутствуют, могут быть любыми из ряда видов липидов, которые существуют либо в незаряженной или нейтральной цвиттерионной формах при физиологическом значении pH. Такие липиды включают, например, диацилфосфатидилхолин, диацилфосфатидилэтаноламин, керамиды, сфингомиелин, дигидросфингомиелин, цефалин и цереброзиды. При выборе нейтральных липидов для использования в частицах, описанных здесь, как правило, руководствуются путем рассмотрения, например, размера липосомы и стабильности липосом в кровотоке. Предпочтительно, нейтральный липидный компонент представляет собой липид с двумя ацильными группами (т. е. диацилфосфатидилхолин и диацилфосфатидилэтаноламин). Липиды, имеющие различные ацильные группы с цепями разной длины и степени насыщенности имеются или могут быть выделены или синтезированы известными методами. В одной группе вариантов воплощения липиды, содержащие насыщенные жирные кислоты с длиной углеродной цепи в диапазоне от C<sub>10</sub> до C<sub>20</sub> являются предпочтительными. В другой группе вариантов воплощения, липиды с моно или диненасыщенными жирными кислотами с длиной углеродной цепи в диапазоне от C<sub>10</sub> до C<sub>20</sub> используются. Кроме того, липиды, имеющих смесь цепей насыщенных и ненасыщенных жирных кислот могут быть использованы. Предпочтительно, нейтральными липидами, которые используются, являются DOPE, DSPC, POPC, DPPC или любые связанные с фосфатидилхолином. Нейтральные липиды также могут состоять из сфингомиелина, дигидросфингомиелина или фосфолипиды с другими головными группами, такими как серин и инозит.

### **Липиды, способные уменьшить агрегацию**

Липидные частицы и композиции, описанные здесь, могут также включать один или больше липидов, способных уменьшить агрегацию. Примеры липидов, которые снижают агрегацию частиц при формировании включают полиэтиленгликоль (PEG)-модифицированные жиры, моносиалоганглиозид Gm1 и олигомеры полиамида ("PAO"), такие как (описано в патенте США № 6320017, который включен в качестве ссылки в полном объеме). Другие соединения с незаряженными, гидрофильными, стерическими

фрагментами барьеров, которые препятствуют агрегации во время подбора состава, как PEG, Gm1 или АТТА, также могут быть связаны с липидами. АТТА липиды описаны, например, в патенте США № 6320017, и конъюгаты PEG липидов, описаны, например, в патентах США № 5820873, № 5534499 и № 5885613, каждый из которых включен в качестве ссылки в полном объеме. Как правило, концентрация липидного компонента, выбранного для уменьшения агрегации, составляет от около 1 до 15% (по мольным процентам липидов).

Конкретные примеры PEG модифицированных липидов (или липидных конъюгатов полиоксиэтилена), которые могут иметь различные "якорные" липидные части, чтобы обеспечить PEG части на поверхности липидных везикул, включают PEG модифицированный фосфатидилэтаноламин и фосфатидную кислоту, керамиды PEG конъюгатов (например, PEG-CerC14 или PEG-CerC20), которые описаны в патенте США № 5820873, который включен сюда в качестве ссылки, PEG модифицированные диалкиламины и PEG модифицированные 1,2 -диацилоксипропан-3-амины. Особенно предпочтительными являются PEG модификации диацилглицеринов и диалкилглицеринов.

В вариантах воплощения, где пространственно большой фрагмент, такой как PEG или АТТА сопряжены с липидным якорем, выбор липидного якоря зависит от того, какой тип ассоциации конъюгат должен иметь с липидной частицей. Хорошо известно, что mPEG (mw2000) -диастироилфосфатидилэтаноламин (PEG-DSPE) останется связанным с липосомами, пока частицы экскретируются, возможно, несколько дней. Другие конъюгаты, такие как PEG-CerC20 имеют аналогичное время устойчивости. PEG CerC14, однако, быстро обменивается из созданного состава при воздействии сыворотки, с  $T_{1/2}$  менее чем 60 мин в некоторых анализах. Как показано в патенте США № 5820873, по меньшей мере, три характеристики влияют на скорость обмена: длина ацильной цепи, насыщенность ацильной цепи и размер стерически-барьерной головной группы. Соединения, имеющие подходящие варианты этих функций могут быть полезными. Для некоторых терапевтических применений могут быть предпочтительными PEG модифицированные липиды, которые быстро выводятся из частицы липидов с нуклеиновыми кислотами *in vivo* и, следовательно, модифицированные липиды будут обладать относительно коротким липидным якорем. В других терапевтических применениях может быть предпочтительным для частиц липидов с нуклеиновыми кислотами проявление более длительного срока службы в плазменном кровообращении и, следовательно, PEG модифицированные липиды будут обладать относительно более

длинными липидными якорями.

Следует отметить, что предотвращение агрегации соединений не требует от липидов конъюгации функционировать должным образом. Свободный PEG или свободный АТТА в растворе может быть достаточным условием для предотвращения агрегации. Если частицы стабильны после введения в состав, PEG или АТТА может быть подвергнут диализу до введения субъекту.

### **Липидные частицы**

В другом аспекте настоящее изобретение относится к липидным частицам, которые включают в себя один или более катионных липидов, описанных здесь. В одном варианте воплощения липидная частица включает в себя одно или более соединения формулы I-XXIII. В другом варианте воплощения липидная частица включает в себя одно или более соединения формулы II-XXIII. В другом варианте воплощения липидная частица включает в себя одну или несколько соединений формулы I. В другом варианте воплощения липидная частица включает в себя соединение формулы IA-1, IA-2, IB, IC, ID или IE.

Липидные частицы, включают, но не ограничиваются этим, липосомы. Как здесь используется, липосома является структурой, имеющей липиды-содержащие мембраны, вмещающие водное содержимое. Липосомы могут иметь одну или несколько липидных мембран. Липосомы могут иметь один слой, называемые однослойными, или много слоев, называемые многослойными. Когда в комплексе есть нуклеиновые кислоты, липидные частицы также могут быть липоплексными, которые состоят из бислоев катионных липидов, зажатых между слоями ДНК.

Липидные частицы могут дополнительно содержать один или более дополнительный липид и / или другие компоненты, такие как холестерин. Другие липиды могут быть включены в липосомные композиции для различных целей, например, для предотвращения окисления липидов или прикрепления лигандов на поверхности липосомы. Любой из числа липидов может присутствовать в липосомах, в том числе амфипатический, нейтральный, катионный и анионный липид. Такие липиды могут быть использованы отдельно или в комбинации.

Дополнительные компоненты, которые могут присутствовать в липидном бислое частицы включают стабилизирующие компоненты, такие как полиамид олигомеров (см., например, патент США № 6320017, который включен в качестве ссылки в полном

объеме), пептиды, белки, детергенты, липидные производные, такие как PEG, связанный с фосфатидилэтаноламином, и PEG, конъюгированный с керамидами (см., патент США № 5885613, который включен в качестве ссылки в полном объеме).

В одном варианте воплощения липидные частицы включают в себя один или несколько вторичных аминолипидов или катионных липидов, нейтральных липидов, стеролов и липидов, выбранных для уменьшения агрегации липидных частиц в процессе формирования, которая может возникнуть в результате пространственной стабилизации частиц, которая предотвращает заряд-индуцированную агрегацию в процессе формирования.

Липидные частицы могут включать в себя два или более катионных липида. Липиды могут быть выбраны по вносимому вкладу в различные полезные свойства. Например, катионные липиды, которые отличаются по свойствам, таким как аминная  $pK_a$ , химическая стабильность, период полураспада в обращении, период полураспада в тканях, чистое накопление в тканях, или токсичности могут быть использованы в липидных частицах. В частности, катионные липиды могут быть выбраны так, что свойства смешанных липидных частиц будут более желательными, чем свойства однолипидных частиц индивидуальных липидов.

Чистое накопление в ткани и долгосрочная токсичность (если таковые имеются) катионных липидов могут быть модулированными выгодным способом путем выбора смесей катионных липидов вместо выбора одного катионного липида в данном составе. Такие смеси могут также обеспечить лучшую инкапсуляцию и / или высвобождение препарата. Сочетание катионных липидов также может повлиять на системную стабильность по сравнению с единым целым в составе.

В одном примере серии структурно подобных соединений могут иметь различные величины  $pK_a$ , которые охватывают диапазон, например, менее чем 1  $pK_a$  единицы, от 1 до 2  $pK_a$  единиц, или диапазон более чем 2 единицы  $pK_a$ . В рамках серии может быть обнаружено, что  $pK_a$  в середине диапазона связано с усилением полезных свойств (повышение эффективности) или уменьшением невыгодных свойств (например, пониженной токсичностью), по сравнению с соединениями, имеющими  $pK_a$  значения ближе к концу диапазона. В таком случае, два (или более) различных соединения, имеющих  $pK_a$  на противоположных концах спектра, могут быть выбраны для совместного использования в липидных частицах. Таким образом, чистые свойства липидной частицы (например, заряд в зависимости от местных pH) может быть ближе к частице в том числе одного липида из середины диапазона. Катионные липиды, которые структурно

разнородны (например, не входят в ряд структурно подобных соединений, упомянутых выше) также могут быть использованы в смешанных липидных частицах.

В некоторых случаях два или более различных катионных липида могут иметь весьма различные величины  $pK_a$ , например, различающиеся на 3 или более единиц  $pK_a$ . В этом случае свойства смешанной липидной частицы не обязательно имитируют свойства однолипидной частицы, имеющей промежуточные значения  $pK_a$ . Скорее, чистые свойства могут быть такими же, как и у частицы с двумя различными протонированными (или депротонированными, в случае необходимости) сайтами с различными значениями  $pK_a$ . В случае одного липида, доля протонированных сайтов, которые на самом деле являются протонированными, резко меняется, когда pH движется от нижнего  $pK_a$  к высшему  $pK_a$  (когда pH равен значению  $pK_a$ , 50% сайтов протонированы). Когда два или более различных катионных липида, возможно, имеют весьма различные величины  $pK_a$  (например, различающихся на 3 или более единиц  $pK_a$ ) объединены в липидные частицы, липидные частицы могут показать более постепенный переход от непротонированного к протонированному состоянию, когда значения pH разнообразны.

В других примерах два или более липида могут быть выбраны на основе других соображений. Например, если один липид сам по себе является весьма эффективным, но умеренно токсичным, он может быть объединен с липидом, который является менее эффективным, но не токсичным. В некоторых случаях, комбинация может оставаться весьма эффективной, но иметь значительно сниженную токсичность, даже там, где она может быть предсказана, так что комбинация была бы лишь умеренно эффективной и лишь немного менее токсичной.

При выборе можно руководствоваться измеренными значениями экспериментально определяемых характеристик, например, характерными могут быть назначены числовые значения из результатов эксперимента. Экспериментально определяемые характеристики могут включать в себя меры безопасности, меры эффективности, меры взаимодействия с заданной биомолекулой или  $pK_a$ .

Меры безопасности могут включать в себя выживаемость,  $LD_{50}$  или уровень биомаркеров (например, сывороточных биомаркеров), связанных с повреждением тканей (например, печеночных ферментов печени; СРК для мышц; ионный баланс для почек). Мерой эффективности может быть любое измерение, которое указывает, производит ли терапевтический агент эффект, в частности, того и / или до какой степени он производит желаемый эффект, например, лечения, профилактики, улучшения или иным образом улучшающий заболевания, расстройства или другие клинические состояния. Мерой

эффективности может быть косвенный показатель, например, если терапевтическое средство предназначено для получения определенного эффекта на клеточном уровне, измерение этого эффекта на клеточных культурах может быть мерой эффективности. Меры взаимодействия с заданными биомолекулами могут включать в себя  $K_d$  для связывания конкретного белка или меру характера, степени или степень взаимодействия с другими липидами, в том числе клеточной подструктуры, такой как клеточные мембраны, мембраны эндосом, ядерной мембраны и т.п.

Катионные липиды могут быть выбраны на основе механизма действия, например, следует ли, при каких условиях и в какой степени липиды взаимодействуют с заданными биомолекулами. Например, первый катионный липид может быть выбран, в частности, потому, что он связан с АроЕ-зависимым механизмом, второй катионный липид может быть выбран, в частности, потому, что он связан с АроЕ-независимым механизмом.

Например, липидная частица также может включать в себя смесь катионных липидов, как описано, например, в WO 2009/086558, и предварительной заявке на патент США № 61/104 219, поданной 9 октября 2008 года (каждый из которых включен в качестве ссылки полностью), и их эфирные аналоги. В другом примере, липидная частица может включать в себя смесь липидов, например, липидов А, описанных в PCT/US10/22614, поданной 29 января 2010 года и липидов, например, липидной формулы V или формулы VI, описанных в предварительной заявке США 61/175 770, поданной 5 мая 2009 года.

В некоторых вариантах воплощения он является желательно нацеленным на липидные частицы с помощью таргетинга фрагментов, относящихся к типу клеток или тканей. Таргетинг липидных частиц, используя различные ориентации фрагментов, таких как лиганды, рецепторы клеточной поверхности, гликопротеины, витамины (например, рибофлавин) и моноклональные антитела, был описан ранее (см., например, патенты США № № 4957773 и 4603044, каждый из которых включен в качестве ссылки в полном объеме). Целевые остатки могут содержать весь белок или его фрагменты. Таргетинг механизмы обычно требуют, чтобы агенты таргетинга были расположены на поверхности липидных частиц таким образом, что целевой фрагмент доступен для взаимодействия с мишенью, например, рецептором клеточной поверхности. Различные агенты таргетинга и способы известны и доступны в данной области, в том числе описаны, например, в Sapa, P. and Allen, TM, *Prog. Lipid Res.* 42(5):439-62 (2003); и Abra, RM *et al.*, *J. Liposome Res.* 12:1-3, (2002).

Использование липидных частиц, т. е. липосом, с поверхностью покрытой гидрофильными полимерными цепями, такими как полиэтиленгликоля (PEG) цепи, для таргетинга было предложено (Allen, *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1237: 99-108 (1995); DeFrees, *et al.*, *Journal of the American Chemistry Society* 118: 6101-6104 (1996); Blume, *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1149: 180-184 (1993); Klibanov, *et al.*, *Journal of Liposome Research* 2: 321-334 (1992); U.S. Patent No. 5,013556; Zalipsky, *Bioconjugate Chemistry* 4: 296-299 (1993); Zalipsky, *FEBS Letters* 353: 71-74 (1994); Zalipsky, in *Stealth Liposomes* Chapter 9 (Lasic and Martin, Eds) CRC Press, Boca Raton FL (1995). В одном подходе лиганды, такие как антитела, для таргетинга липидных частиц связаны с полярными направляющими группами липидов для формирования липидных частиц. При другом подходе таргетинг лиганд присоединен к дистальным концам PEG цепочек, образующим гидрофильные полимерные покрытия (Klibanov, *et al.*, *Journal of Liposome Research* 2: 321-334 (1992); Kirpotin *et al.*, *FEBS Letters* 388: 115-118 (1996)).

Стандартные способы для связывания агентов таргетинга могут быть использованы. Например, фосфатидилэтаноламин, который может быть активирован для присоединения агентов таргетинга, или производные липофильных соединений, таких как липидные производные блеомицина, могут быть использованы. Антитела целевых липосом могут быть построены с использованием, например, липосом, которые включают белок (см. Renneisen, *et al.*, *J. Bio. Chem.*, 265:16337-16342 (1990) и Leonetti, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 87:2448-2451 (1990). Другие примеры антител сопряжения раскрыты в патенте США № 6027726, учения которых включены здесь в качестве ссылки. Примеры таргетинг фрагментов могут также включать другие белки, характерные для клеточных компонентов, в том числе антигены, связанные с новообразованиями или опухолями. Белки, используемые в качестве таргетинг фрагментов, могут быть присоединены к липосоме с помощью ковалентных связей (см. Heath, *Covalent Attachment of Proteins to Liposomes*, 149 *Methods in Enzymology* 111-119 (Academic Press, Inc. 1987)). Другие методы таргетинга включают в себя биотин-авидин системы.

В некоторых вариантах воплощения липидная частица включает в себя смесь катионного липида и липида, способствующего слиянию. Липидная частица может дополнительно включать в себя нейтральный липид, стерол, PEG -модифицированный липид или комбинацию из них. Например, липидная частица может включать в себя катионный липид, способствующий слиянию липид (например, DPPC) и нейтральный липид, но не стерол или PEG -модифицированный липид. Липидная частица может

включать в себя катионный липид, способствующий слиянию липид и нейтральный липид, но не стерол или PEG-модифицированный липид. Липидная частица может включать в себя катионный липид, способствующий слиянию липид и PEG-модифицированный липид, но не стерол или нейтральный липид. Липидная частица может включать в себя катионный липид, способствующий слиянию липид, стерол и нейтральный липид, но не PEG-модифицированный липид. Липидная частица может включать в себя катионный липид, способствующий слиянию липид, стерол и PEG-модифицированный липид, но не нейтральный липид. Липидная частица может включать в себя катионный липид, способствующий слиянию липид, нейтральный липид и PEG-модифицированный липид, но не стерол. Липидная частица может включать в себя катионный липид, способствующий слиянию липид, стерол, нейтральный липид и PEG-модифицированный липид.

В одном примере варианта воплощения, липидная частица представляет собой смесь катионных липидов, способствующих слиянию липидов, нейтральных липидов (кроме катионных липидов), стероидов (например, холестерина) и PEG-модифицированных липидов (например, PEG DMG или PEG DMA). В некоторых вариантах воплощения смесь липидов состоит или состоит по существу из катионных липидов, способствующих слиянию липидов, нейтральных липидов, холестерина и PEG-модифицированных липидов. В других предпочтительных вариантах воплощения, липидные частицы включают в себя вышеописанные смеси липидов в молярном соотношении примерно 20 -70% катионный липид : 0,1-50% способствующих слиянию липидов : 5- 45% нейтральных липидов : 20 -55% холестерина : 0,5- 15% PEG-модифицированных липидов. В некоторых вариантах воплощения способствующие слиянию липиды могут присутствовать в молярном соотношении 0,1-50%, 0,5-50%, 1-50%, 5% -45%, 10% -40% или 15% -35% . В некоторых вариантах воплощения способствующие липиды могут присутствовать в молярном соотношении 0,1-50%, 0,5-50%, 1-50%, 5% -45%, 10% -40% или 15% -35% . В некоторых вариантах воплощения способствующие слиянию липиды могут присутствовать в молярном соотношении 0,1-50%, 10-50%, 20-50% или 30-50%. В некоторых вариантах воплощения способствующие слиянию липиды могут присутствовать в молярном соотношении 0,1-50%, 0,5-45%, 1-40%, 1% -35%, 1% -30% или 1% -20% .

В других предпочтительных вариантах воплощения, липидная частица состоит или состоит по существу из указанной выше смеси липидов в молярном соотношении примерно 20 -70% катионный липид : 0,1-50% способствующий слиянию липид : 5- 45%

нейтральный липид : 20- 55% холестерин : 0,5 - 15 % PEG-модифицированный липид.

В конкретных вариантах воплощения, молярное соотношение липидов, в соотношении моль % катионных липидов / DSPC/Chol/PEG-DMG или PEG-DMA составляет примерно 40/10/40/10, 35/15/40/10 или 52/13/30 /5; эту смесь дополнительно комбинируют со способствующим слиянию липидом в молярном соотношении 0,1-50%, 0,1-50%, 0,5-50%, 1-50%, 5% -45%, 10% -40% или 15% -35%, другими словами, когда 40/10/40/10 смесь липидов / DSPC/Chol/PEG-DMG или PEG-DMA в сочетании со способствующим слиянию липидом в молярном соотношении 50%, полученные частицы липидов могут иметь общее молярное отношение (мол.% катионных липидов / DSPC/Chol/PEG-DMG или PEG-DMA / способствующий слиянию липид) 20/5/20/5/50. В другой группе вариантов воплощения нейтральные липиды, DSPC в этих композициях заменяются POPC, DPPC, DOPE или SM.

Липидные частицы, описанные здесь, могут дополнительно включать в себя один или несколько терапевтических агентов. Таким образом, композиции, которые включают частицы липидов и активный агент, где активный агент связан с липидной частицей, обеспечены. В конкретных вариантах воплощения активный агент является терапевтическим агентом. В конкретных вариантах воплощения активный агент инкапсулирован в водном интерьере липидной частицы. В других вариантах воплощения активный агент присутствует в одном или нескольких липидных слоях липидных частиц. В других вариантах воплощения активный агент связан с внешней или внутренней липидной поверхностью липидных частиц.

"Полностью инкапсулированный", используемый здесь, означает, что нуклеиновые кислоты в частицах не сильно деградировали после воздействия сывороткой или анализа нуклеазы, которые существенно разрушают свободные нуклеиновые кислоты. В полностью инкапсулированной системе, предпочтительно менее 25% частиц нуклеиновой кислоты разлагается в лечении, которые обычно ухудшают 100% свободной нуклеиновой кислоты, более предпочтительно менее чем 10% и наиболее предпочтительно менее чем 5% от нуклеиновой кислоты частиц деградировали. Кроме того, полная инкапсуляция может быть определена анализом Oligreen<sup>®</sup>. Oligreen<sup>®</sup> является ультрачувствительным флуоресцентным окрашиванием нуклеиновой кислоты для количественного определения олигонуклеотидов и одноцепочечной ДНК в растворе (доступен Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Полностью инкапсулированный также предполагает, что частицы сыворотки стабильны, то есть, что они не разлагаются быстро на составные части при введении *in vivo*.

В одном варианте воплощения липидные частицы содержат катионный липид настоящего изобретения, нейтральный липид, стерол и PEG-модифицированный липид. В одном варианте воплощения липидные частицы включают от примерно 25% до примерно 75% на молярной основе катионных липидов, например, от около 35 до около 65%, от около 45 до около 65%, около 60%, около 57,5%, около 57,1%, около 50% или около 40% на молярной основе. В одном варианте воплощения липидные частицы включают от около 0% до около 15% на молярной основе нейтральных липидов, например, от примерно 3 до примерно 12%, от примерно от 5 до примерно 10%, около 15%, около 10% , около 7,5%, около 7,1%, или около 0% на молярной основе. В одном из вариантов воплощения нейтральный липид является DPPC. В одном из вариантов воплощения нейтральный липид является DSPC. В одном варианте воплощения состав включает в себя от примерно 5% до примерно 50% на молярной основе стерола, например, около 15 до около 45%, около 20 до около 40%, около 48%, около 40%, около 38,5% , около 35%, около 34,4%, около 31,5%, или около 31% на молярной основе. В одном варианте воплощения стеролом является холестерин.

В одном варианте воплощения липидные частицы включают от примерно 0,1% до примерно 20% на молярной основе PEG -модифицированных липидов, например, от примерно 0,5 до примерно 10%, от примерно 0,5 до примерно 5%, около 10%, около 5% , около 3,5%, 1,5%, 0,5% или около 0,3% на молярной основе. В одном варианте воплощения PEG -модифицированный липид является PEG-DMG. В одном варианте воплощения PEG модифицированный липид является PEG-c-DMA. В одном варианте воплощения липидные частицы включают 25-75% катионных липидов, 0,5-15% нейтральных липидов, 5-50% стероидов и 0,5-20% PEG -модифицированных липидов на молярной основе.

В одном варианте воплощения липидные частицы включают 35-65% катионных липидов, 3-12% нейтральных липидов, 15-45% стеролов, и 0,5-10% PEG -модифицированных липидов на молярной основе. В одном варианте воплощения липидные частицы включают 45-65% катионных липидов, 5-10% нейтральных липидов, 25-40% стерола и 0,5-5% PEG -модифицированных липидов на молярной основе. В одном варианте воплощения PEG -модифицированные липиды содержат PEG молекулы со средней молекулярной массой 2000 Да. В одном варианте воплощения PEG -модифицированные липиды являются PEG-дистирил глицерином (PEG-DSG).

В одном варианте воплощения соотношение липидов : миРНК составляет по меньшей мере, примерно 0,5:1, по меньшей мере, примерно 1:1, по меньшей мере,

примерно 2:1, по меньшей мере, примерно 3:1, по меньшей мере, примерно 4:1, по меньшей мере около 5 : 1, по меньшей мере, примерно 6:1, по меньшей мере, примерно 7:1, по меньшей мере, примерно 11:1 или, по меньшей мере, примерно 33:1. В одном варианте воплощения соотношение липидов: миРНК соотношение составляет примерно от 1:1 до примерно 35:1, от примерно 3:1 до примерно 15:1, от примерно 4:1 до примерно 15:1 или от примерно 5:1 до примерно 13:1. В одном варианте воплощения соотношение липидов: миРНК соотношение составляет между от примерно 0,5:1 до примерно 12:1.

В одном варианте воплощения липидные частицы являются наночастицами. В дополнительных вариантах воплощения липидные частицы имеют средний размер диаметром от примерно 50 нм до примерно 300 нм, например, от примерно 50 нм до примерно 250 нм, например, от примерно 50 нм до примерно 200 нм.

В одном варианте воплощения липидная частица, содержащая катионный липид по любому из описанных здесь вариантов воплощения имеет *in vivo* период полураспада ( $t_{1/2}$ ) (например, в печени, селезенке или плазме) менее чем около 3 часов, такой как меньше чем около 2,5 часа, менее чем около 2 часов, менее чем около 1,5 часов, менее чем около 1 часа, менее чем примерно 0,5 часа или менее 0,25 часа.

В другом варианте воплощения липидная частица, содержащая катионный липид по любому из описанных здесь вариантов воплощения имеет *in vivo* период полураспада ( $t_{1/2}$ ) (например, в печени, селезенке или плазме) менее чем около 10% (например, менее чем около 7,5%, меньше, чем около 5%, менее чем около 2,5%), что тот же катионный липид без биоразрушаемой группы или групп.

### **Дополнительные компоненты**

Липидные частицы и композиции, описанные здесь, могут дополнительно включать в себя аполипопротеин. Как здесь используется, термин "аполипопротеин" или "липопротеин" относится к аполипопротеинам, известным специалистам в данной области и вариантам и их фрагментам, и аполипопротеина агонистам, аналогам или их фрагментам, описанным ниже.

Подходящие аполипопротеины включают, но не ограничиваются этим, ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoA-V и ApoE, и активные полиморфные формы, изоформы, варианты и мутанты, а также фрагменты или усеченные формы. В некоторых вариантах воплощения аполипопротеин является тиолсодержащим аполипопротеином. "Тиолсодержащий аполипопротеин" относится к аполипопротеину, варианту, фрагменту

или изоформе, которая содержит по меньшей мере один остаток цистеина. Наиболее распространенными тиолсодержащими аполипопротеинами являются ApoA-I Milano (ApoA-I<sub>M</sub>) и ApoA-I Paris (ApoA-I<sub>P</sub>) которые содержат один остаток цистеина (Jia et al., 2002, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 297: 206-13; Bielicki and Oda, 2002, *Biochemistry* 41: 2089-96). ApoA-II, ApoE2 и ApoE3 также являются тиолсодержащими аполипопротеинами. Изолированные ApoE и / или активные фрагменты полипептида и их аналоги, в том числе их рекомбинантные формы, описаны в патентах США №№ 5672685, 5525472, 5473039, 5182364, 5177189, 5168045, 5116739, описания которых включены здесь в качестве ссылки. ApoE3 раскрыта в Weisgraber, et al., "Human E apoprotein heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms," *J. Biol. Chem.* (1981) 256: 9077-9083; и Rall, et al., "Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects," *Proc. Nat. Acad. Sci.* (1982) 79: 4696-4700. См. также инвентарный номер GenBank K00396.

В некоторых вариантах воплощения, аполипопротеин может быть в своей зрелой форме, в своей препроаполипопротеиновой форме или в форме проаполипопротеина. Гомо- и гетеродимеры (где это возможно) про- и зрелые ApoA -I (Duverger et al., 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16(12):1424-29), ApoA-I Milano (Klon et al., 2000, *Biophys. J.* 79:(3)1679-87; Franceschini et al., 1985, *J. Biol. Chem.* 260: 1632-35), ApoA-I Paris (Daum et al., 1999, *J. Mol. Med.* 77:614-22), ApoA-II (Shelness et al., 1985, *J. Biol. Chem.* 260(14):8637-46; Shelness et al., 1984, *J. Biol. Chem.* 259(15):9929-35), ApoA-IV (Duverger et al., 1991, *Euro. J. Biochem.* 201(2):373-83) и ApoE (McLean et al., 1983, *J. Biol. Chem.* 258(14):8993-9000) также могут быть использованы.

В некоторых вариантах воплощения аполипопротеином может быть фрагмент, вариант или изоформа аполипопротеина. Термин "фрагмент" относится к любому аполипопротеину, имеющему аминокислотную последовательность короче, чем у природного аполипопротеина и у которого фрагмент сохраняет активность природного аполипопротеина, в том числе липид-связывающие свойства. Под "вариантом" подразумевается замена или изменения в аминокислотной последовательности гена аполипопротеина, которая путем замены или изменений, например, добавления и удаления аминокислотных остатков, не отменяют активности природного аполипопротеина, в том числе липид-связывающих свойств. Таким образом, вариант может содержать белок или пептид, имеющий по существу идентичную аминокислотную последовательность природному аполипопротеину здесь предоставленному, в которых один или более аминокислотных остатков, были консервативно замещены химически

подобными аминокислотами. Примеры консервативных замен включают замену по меньшей мере одного гидрофобного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин, метионин или другого. Точно так же, например, возможна замена по меньшей мере одного гидрофильного остатка, такого как, например, между аргинином и лизином, между глутамином и аспарагином, а также между глицином и серином (см. патенты США №№ 6004925, 6037323 и 6046166), которые являются консервативными заменами. Термин "изоформы" относится к белку, имеющему те же, большие или частичные функции и аналогичную, идентичную или частичную последовательность, и может или не может быть продуктом одного и того же гена и, как правило тканеспецифический (см. Weisgraber 1990, *J. Lipid Res.* 31(8):1503-11; Hixson and Powers 1991, *J. Lipid Res.* 32(9):1529-35; Lackner et al., 1985, *J. Biol. Chem.* 260(2):703-6; Hoeg et al., 1986, *J. Biol. Chem.* 261(9):3911-4; Gordon et al., 1984, *J. Biol. Chem.* 259(1):468-74; Powell et al., 1987, *Cell* 50(6):831-40; Aviram et al., 1998, *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 18(10):1617-24; Aviram et al., 1998, *J. Clin. Invest.* 101(8):1581-90; Billecke et al., 2000, *Drug Metab. Dispos.* 28(11):1335-42; Draganov et al., 2000, *J. Biol. Chem.* 275(43):33435-42; Steinmetz and Utermann 1985, *J. Biol. Chem.* 260(4):2258-64; Widler et al., 1980, *J. Biol. Chem.* 255(21):10464-71; Dyer et al., 1995, *J. Lipid Res.* 36(1):80-8; Sacre et al., 2003, *FEBS Lett.* 540(1-3):181-7; Weers, et al., 2003, *Biophys. Chem.* 100(1-3):481-92; Gong et al., 2002, *J. Biol. Chem.* 277(33):29919-26; Ohta et al., 1984, *J. Biol. Chem.* 259(23):14888-93 и патент США № 6372886).

В некоторых вариантах воплощения липидные частицы и композиции, описанные здесь, включают химерные конструкции аполипопротеина. Например, химерные конструкции аполипопротеина могут содержать домен аполипопротеина с высокой связывающей способностью липидов, связанных с доменом аполипопротеина, содержащего защитные свойства по отношению к реперфузионной ишемии. Химерной конструкцией аполипопротеина может быть конструкция, которая включает в себя отдельные регионы внутри аполипопротеина (т.е. гомологичные конструкции) или химерной конструкцией может быть конструкция, которая включает в себя отдельные регионы между разными аполипопротеинами (т. е. гетерологичные конструкции). Композиции, содержащие химерные конструкции могут также включать сегменты, в которых аполипопротеина варианты или сегменты имеют специфический характер (например, липидное связывание, связывание с рецепторами, ферментативные, ферментактивирующие, антиоксидантные свойства или уменьшение окисления) (см. Weisgraber 1990, *J. Lipid Res.* 31(8):1503-11; Hixson and Powers 1991, *J. Lipid Res.*

32(9):1529-35; Lackner et al., 1985, J. Biol. Chem. 260(2):703-6; Hoeg et al, 1986, J. Biol. Chem. 261(9):3911-4; Gordon et al., 1984, J. Biol. Chem. 259(1):468-74; Powell et al., 1987, Cell 50(6):831-40; Aviram et al., 1998, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 18(10):1617-24; Aviram et al., 1998, J. Clin. Invest. 101(8):1581-90; Billecke et al., 2000, Drug Metab. Dispos. 28(11):1335-42; Draganov et al., 2000, J. Biol. Chem. 275(43):33435-42; Steinmetz and Utermann 1985, J. Biol. Chem. 260(4):2258-64; Widler et al., 1980, J. Biol. Chem. 255(21):10464-71; Dyer et al., 1995, J. Lipid Res. 36(1):80-8; Sorenson et al., 1999, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19(9):2214-25; Palgunachari 1996, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 16(2):328-38; Thurberg et al., J. Biol. Chem. 271(11):6062-70; Dyer 1991, J. Biol. Chem. 266(23):15009-15; Hill 1998, J. Biol. Chem. 273(47):30979-84).

В качестве аполипопротеинов использованы также рекомбинантные, синтетические, полусинтетические или очищенные аполипопротеины. Способы получения аполипопротеинов или их эквивалентов хорошо известны в данной области. Например, аполипопротеин может быть отделен от плазмы или натуральных продуктов, например, центрифугированием в градиенте плотности или иммуноаффинной хроматографией, или производятся синтетически, полусинтетически или с помощью технологий рекомбинантных ДНК, известных специалистам в данной области (см., например, Mulugeta et al., 1998, J. Chromatogr. 798(1-2): 83-90; Chung et al., 1980, J. Lipid Res. 21(3):284-91; Cheung et al., 1987, J. Lipid Res. 28(8):913-29; Persson, et al., 1998, J. Chromatogr. 711:97-109; патенты США №№ 5059528, 5834596, 5876968 и 5721114; и PCT публикации WO 86/04920 и WO 87/02062).

Аполипопротеины могут дополнительно включать в себя аполипопротеина агонисты, такие как пептиды и пептидные аналоги, которые имитируют активность ApoA-I, ApoA-I Milano (ApoA-I<sub>M</sub>), ApoA-I Paris (ApoA-I<sub>P</sub>), ApoA-II, ApoA-IV и ApoE. Например, аполипопротеином может быть любой из тех, которые описаны в патентах США №№ 6004925, 6037323, 6046166 и 5840688, содержание которых включено здесь в качестве ссылки во всей их полноте.

Аполипопротеина агониста пептиды или пептидные аналоги могут быть синтезированы или изготовлены с использованием любой технологии для синтеза пептидов, известной в данной области, включая, например, методы, описанные в патентах США №№ 6004925, 6037323 и 6046166. Например, пептиды могут быть получены с использованием твердофазного синтеза, методика изначально описывается Merrifield (1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154). Другие методы синтеза пептида могут быть найдены в Bodanszky et al., Peptide Synthesis, John Wiley & Sons, 2d Ed., (1976) и другие

ссылки доступны специалистам в данной области. Обзоры методов синтеза полипептида можно найти в Stuart and Young, *Solid Phase Peptide. Synthesis*, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill., (1984). Пептиды также могут быть синтезированы способами в растворе, как описано *The Proteins*, Vol. II, 3d Ed., Neurath et. al., Eds., p. 105-237, Academic Press, New York, N.Y. (1976). Соответствующие защитные группы для использования в различных синтезах пептидов описаны в вышеупомянутых текстах, а также в McOmie, *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, New York, N.Y. (1973). Пептиды могут быть также получены путем химического или ферментативного расщепления из крупных частей, например, аполипопротеина А-I.

В некоторых вариантах воплощения аполипопротеин может быть смесью аполипопротеинов. В одном из вариантов воплощения аполипопротеин может быть гомогенной смесью, то есть одним типом аполипопротеина. В другом варианте воплощения аполипопротеин может быть гетерогенной смесью аполипопротеинов, то есть смесью двух или более различных аполипопротеинов. Варианты воплощения гетерогенной смеси аполипопротеинов могут содержать, например, смесь аполипопротеина из животных источников и аполипопротеина из полусинтетических источников. В некоторых вариантах воплощения гетерогенная смесь может содержать, например, смесь ApoA-I и ApoA-I Milano. В некоторых вариантах воплощения гетерогенная смесь может содержать, например, смесь ApoA-I Milano и ApoA-I Paris. Подходящие смеси для использования в способах и композициях описаны здесь и будут очевидны для специалиста в данной области.

Если аполипопротеин получают из природных источников, он может быть получен из растительного или животного источников. Если аполипопротеин получается из животного источника, аполипопротеин может быть из любого вида. В некоторых вариантах воплощения аполипопротеины могут быть получены из животных источников. В некоторых вариантах воплощения аполипопротеины могут быть получены из человеческого источника. В предпочтительных вариантах воплощения аполипопротеин происходит от того же вида, в который аполипопротеин вводят.

Липидные частицы и композиции, описанные здесь, могут дополнительно содержать стериновые компоненты смеси липидов. Если они присутствуют, стеринны могут быть любыми из тех стеринов, которые обычно используются в области липосом, липидных везикул или подготовки липидных частиц. В одном варианте воплощения стерин является холестерином.

Липидные частицы и композиции, описанные здесь, могут дополнительно

включать в себя анионный липид. Анионные липиды, пригодные для использования в липидных частицах, включают, но не ограничиваются этим, фосфатидилглицерин, кардиолипин, диацилфосфатидилстерин, диацилфосфатидиловую кислоту, N-додеканоил фосфатидилэтанолламин, N- сукцинил фосфатидилэтанолламин, N- глутарил фосфатидилэтанолламин, лизилфосфатидилглицерин и другие анионные модифицированные группы, присоединенные к нейтральным липидам.

В дополнительных вариантах воплощения амфипатические липиды также включены в липидные частицы и композиции, описанные здесь. К "амфипатическим липидам" относится любой подходящий материал, в котором гидрофобная часть липидного материала ориентируется к гидрофобной фазе, в то время как гидрофильные части ориентируется в сторону водной фазы. Такие соединения включают, но не ограничиваются этим, фосфолипиды, аминолипиды и сфинголипиды. Представленные фосфолипиды включают сфингомиелин, фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидную кислоту, пальмитоилолеил фосфатидилхолин, лизофосфатидилхолин, лизофосфатидилэтанолламин, дипальмитоилфосфатидилхолин, диолеилфосфатидилхолин, дистеароилфосфатидилхолин или дилинолеоилфосфатидилхолин. Другие фосфороподобные соединения, такие как сфинголипиды, гликосфинголипидные семейства, диацилглицерины и  $\beta$ -ацилоксикислоты, также могут быть использованы. Кроме того, такие амфипатические липиды могут быть легко смешаны с другими липидами, такими как триглицериды и стеринны.

Также подходящими для включения в липидные частицы и композиции, описанные здесь, являются программируемые липиды слияния или слиянию способствующие липиды. Такие липидные частицы имеют небольшую тенденцию сливаться с клеточными мембранами и доставлять их содержимое до данного сигнального события. Это позволяет липидным частицам более равномерно распределяться после инъекции в организм или сайта болезни до их начала слияния с клетками. Сигнальным событием может быть, например, изменение pH, температуры, ионной окружающей среды или времени. Слиянию способствующие липиды могут быть, например, соединениями формулы (I), как описано выше. В некоторых случаях сигнальное событие может быть изменением pH, например, таким, как разница в pH между экстрацеллюлярной окружающей средой и внутриклеточной средой, или между внутриклеточной средой и эндосомной окружающей средой.

Когда время является сигнальным событием, задерживающие слияние или

компоненты "маскировки", такие как АТГА-липидные конъюгаты или РЕГ-липидные конъюгаты, могут просто обменяться с мембраной липидной частицы с течением времени. К тому времени, когда липидные частицы соответствующим образом распределяться в организме, они потеряют достаточную часть агента маскировки, чтобы быть способными к слиянию. С другими сигнальными событиями, может быть желательным выбрать сигнал, который связан с сайтом заболевания или клеткой-мишенью, такими как повышенная температура в месте воспаления.

#### **Активные (терапевтические) агенты**

Липидные частицы и композиции, описанные здесь, могут дополнительно включать в себя один или более активных агентов (например, терапевтических агентов). Активные агенты, используемые здесь, включают любые молекулы или соединения, способные оказывать желаемое воздействие на клетки, ткани, органы или субъект. Такие эффекты могут быть, например, биологические, физиологические или косметические. Липидные частицы и композиции могут быть использованы для доставки любого из множества активных агентов. Активный агент может быть нуклеиновой кислотой, пептидом, полипептидом (например, антителом), цитокином, фактором роста, фактором апоптоза, фактором, вызывающим дифференциацию, клеточной поверхности рецепторами и их лигандами, гормонами и малыми молекулами. Подходящие терапевтические агенты также включают противовоспалительные соединения, антидепрессанты, стимуляторы, анальгетики, антибиотики, лекарства контроля над рождаемостью, жаропонижающие средства, сосудорасширяющие средства, антиангиогенные, цитоваскулярные агенты, ингибиторы передачи сигнала, сердечно-сосудистые препараты, например, антиаритмические агенты, вазоконстрикторы, гормоны и стероиды. Липидные частицы по настоящему изобретению могут также доставлять аптамеры.

В некоторых вариантах воплощения терапевтический агент является онкологическим препаратом, который также может быть отнесен к противоопухолевым лекарствам, противораковым лекарствам, опухолевым лекарствам, противоопухолевым агентам и тому подобное. Примеры онкологических препаратов, которые могут быть использованы, включают, но не ограничиваются этим, адриамицин, алкеран, аллопуринол, альтретамин, амифостин, анастрозол, араС, триоксид мышьяка, азатиоприн, бексаротен, b1CNU, блеомицин, бусульфан внутривенный, пероральный бусульфан, капецитабин (Xeloda), карбоплатин, кармустин, CCNU, целекоксиб, хлорамбуцил, цисплатин, кладрибин, циклоспорин А, цитарабин, цитозинарабинозид, даунорубицин, цитоксан,

даунорубицин, дексаметазон, дексразоксан, додетаксел, доксорубицин, доксорубицин, DTIC, эпирубицин, эстрамустин, этопозид фосфат, этопозид и VP-16, экземестан, FK506, флударабин, фторурацил, 5-FU, гемцитабин (гемзар), гемтузумаб озогамин, гозерелина ацетат, гидреа, гидроксимочевину, идарубицин, ифосфамид, мезилат иматиниба, интерферон, иринотекан (Camptostar, CPT 111), летрозол, лейковорин, лейстатин, лейпролид, левамизол, литретиноин, мегэстрол, мелфалан, L-РАМ, месны, метотрексат, метоксален, митрамицин, митомицин, митоксантрон, азотистый иприт, паклитаксел, памидронат, Pegademase, пентостатин, порфимир натрия, преднизолон, ритуксан, стрептозоцин, STI-571, тамоксифен, таксотер, тимозоламид, тенипозид, VM-26, топотекан (Нусамтин), торемифен, третиноин, АТРА, валрубицин, велбан, винбластин, винкристин, VP16 и винорелбин. Другими примерами онкологических препаратов, которые могут быть использованы, являются эллиптицин и эллиптицина аналоги или производные, эпотилон, внутриклеточные ингибиторы киназы и камптотецинов.

В предпочтительном варианте воплощения активный агент представляет собой нуклеиновые кислоты, такие как мРНК. Например, активный агент может быть нуклеиновой кислотой кодирующей представляющий интерес продукт, включая, но не ограничиваясь этим, РНК, бессмысловый олигонуклеотид, антагомир, ДНК, плазмиды, рибосомальную РНК (рРНК), микро-РНК (микроРНК) (например, микроРНК которая является одноцепочечной и 17-25 нуклеотидов в длину), транспортные РНК (тРНК), малые интерферирующие РНК (миРНК), малые ядерные РНК (мяРНК), антигены, их фрагменты, белки, пептиды, вакцины и малые молекулы или их смеси. В еще одном предпочтительном варианте воплощения нуклеиновая кислота является олигонуклеотидом (например, 15-50 нуклеотидов в длину (или 15-30 или 20-30 нуклеотидов в длину)). МиРНК может иметь, например, дуплекс регион, который состоит из 16-30 нуклеотидов. В другом варианте воплощения нуклеиновая кислота является иммуностимулирующим олигонуклеотидом, олигонуклеотидной приманкой, супермиром, имитирующей микроРНК или ингибитором микроРНК. Супермир относится к одноцепочечному, двухцепочечному или частично двухцепочечному олигомеру или полимеру рибонуклеиновой кислоты (РНК) и дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или обеим или их модификации, которая имеет нуклеотидную последовательность, которая, по существу, идентична микроРНК, и которая является бессмысловой по отношению к своей цели. Имитирующие микроРНК представляют собой класс молекул, которые могут быть использованы для имитации способности генов из одного или нескольких микроРНК. Таким образом, термин "микроРНК имитирующие" относится к

синтетическим, не кодирующим РНК (т.е. микроРНК не получена путем очистки от источника эндогенного микроРНК), которые способны проникать путем РНК-интерференции и регуляции экспрессии генов.

Нуклеиновая кислота, которая присутствует в липид-нуклеиновая кислота частице может быть в любой форме. Нуклеиновая кислота может быть, например, одноцепочечной ДНК или РНК, или двухцепочечной ДНК или РНК, или ДНК-РНК гибридом. Не ограничивающие примеры двухцепочечной РНК включают миРНК. Одноцепочечные нуклеиновые кислоты включают, например, антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы, микроРНК, и триплексе формирующие олигонуклеотиды. Липидные частицы по настоящему изобретению могут также доставлять нуклеиновые кислоты, которые сопряжены с одним или несколькими лигандами.

### **Фармацевтические композиции**

Липидные частицы, особенно в сочетании с терапевтическим агентом, могут быть образованы в виде фармацевтической композиции, например, такой, которая дополнительно включает фармацевтически приемлемый разбавитель, наполнитель или носитель, такой как физиологический раствор или фосфатный буфер, выбранный в соответствии с маршрутом введения и стандартной фармацевтической практикой.

В некоторых вариантах воплощения композиции для доставки молекул миРНК описаны. Эти составы эффективны в понижающем регулировании уровня белка и / или мРНК белков-мишеней. На активность этих композиций может влиять присутствие катионных липидов и молярное соотношения катионного липида в составе.

В конкретных вариантах воплощения фармацевтические композиции, содержащие липидные частицы нуклеиновых кислот получают в соответствии со стандартными методами и дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель. Как правило, физиологический раствор будет использоваться в качестве фармацевтически приемлемого носителя. Другие подходящие носители включают в себя, например, воду, буферный раствор, 0,9% солевой раствор, 0,3% глицин и т.п., в том числе гликопротеины для повышенной стабильности, такие как альбумин, липопротеин, глобулин и т.д. В композициях, содержащих физиологический раствор или другие соли, содержащие носители, носитель предпочтительно добавляется после формирования липидных частиц. Таким образом, после того, как липидная композиция нуклеиновой кислоты образуется, композиции могут быть разведены в фармацевтически приемлемых носителях, таких как

физиологический раствор.

В результате фармацевтические препараты могут быть стерилизованы обычными, хорошо известными методами стерилизации. Водные растворы могут быть упакованы для использования или профильтрованы в асептических условиях и лиофилизированы, лиофилизированный препарат комбинируют со стерильным водным раствором перед введением. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как рН корректоры и буферные агенты, агенты тонусрегулирующие и т.п., например, ацетат натрия, лактат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция и т.д. Кроме того, липидная суспензия может включать в себя липидные защитные агенты, которые защищают липиды от свободных радикалов и повреждений перекисными липидами при хранении. Липофильные свободно-радикальные ловушки, такие как  $\alpha$ -токоферол и водорастворимые железоспецифические хелатирующие агенты, такие как ферриоксамин, являются подходящими.

Концентрация липидной частицы или липид- нуклеиновая кислота частицы в фармацевтических препаратах может широко варьироваться, т.е. от менее чем около 0,01%, как правило, или по меньшей мере около 0,05 - 5%, до целых 10 до 30% по весу и будет выбрана прежде всего от объема жидкости, вязкости и т.п., в соответствии с конкретным выбранным способом введения. Например, концентрация может быть увеличена, чтобы снизить нагрузку жидкостью, связанную с лечением. Это может быть особенно желательным у больных с атеросклерозом, связанным с застойной сердечной недостаточностью или тяжелой артериальной гипертензией. Кроме того, комплексы, состоящие из раздражающих липидов, могут быть разведены до низких концентраций, чтобы уменьшить воспаление в месте введения. В одной группе вариантов воплощения нуклеиновые кислоты будут иметь прилагаемые этикетки и будут использоваться для диагностики (с указанием наличия дополнительных нуклеиновых кислот). В этом случае, количество комплексов введения будет зависеть от конкретной используемой этикетки, болезненного состояния, диагностируемого по мнению врача, но обычно составляет от около 0,01 до около 50 мг на килограмм веса тела, предпочтительно от около 0,1 до около 5 мг / кг массы тела.

Как отмечалось выше, липид- терапевтический агент (например, нуклеиновые кислоты) частицы могут включать в себя полиэтиленгликоль (PEG), модифицированные фосфолипиды, PEG керамиды, или ганглиозид  $G_{M1}$ - модифицированный липид или другие липиды, эффективные для предотвращения или ограничения агрегации. Добавление таких

компонентов не только предотвращает сложные агрегации. Скорее, оно может также служить средством для увеличения времени циркуляции и повышения доставки липид-нуклеиновая кислота композиции в ткани-мишени.

Липид-терапевтический агент композиции также могут быть представлены в виде набора. Комплект, как правило, будет состоять из контейнера, который делится на ячейки для хранения различных элементов комплекта. Комплект будет содержать частицы или фармацевтические композиции, предпочтительно в обезвоженном или концентрированном виде, с инструкциями по их регидратации или разбавлению и введению. В некоторых вариантах воплощения частицы содержат активное вещество, в то время как в других вариантах воплощения они его не содержат.

### **Способы производства**

Способы изготовления катионных липидов, липидных частиц, содержащих их, и фармацевтических композиций, содержащих катионные липиды и / или липидные частицы описаны, например, в Международных публикациях №№ WO 2010/054406, WO 2010/054401, WO 2010/054405, и WO 2010/054384, WO 2010/042877, WO 2010/129709, WO 2009/086558 и WO 2008/042973, каждая из которых включена в качестве ссылки в полном объеме.

Способы получения липидных частиц и фармацевтических композиций, содержащих липидные частицы также описаны, например, в Публикациях США №№ 2004/0142025, 2006/0051405 и 2007/0042031, каждая из которых включена в качестве ссылки в полном объеме. В дополнение, способы получения липидных частиц, в том числе связанных с терапевтическим агентом, например, нуклеиновыми кислотами, описаны. В описанных здесь способах смесь липидов является сочетанием с буфером водного раствора нуклеиновой кислоты для получения промежуточной смеси, содержащей нуклеиновые кислоты, инкапсулированные в липидные частицы. В одном из вариантов воплощения инкапсулированные нуклеиновые кислоты, присутствуют в смеси нуклеиновая кислота / липид в соотношении от примерно 3 мас % до примерно 25 мас%, предпочтительно от 5 до 15% мас. Промежуточная смесь может быть опционального размера для получения частицы липидов с инкапсулированными нуклеиновыми кислотами, в которой липидные порции однослойной везикулы, предпочтительно с диаметром от 30 до 150 нм, более предпочтительно от около 40 до 90 нм. рН затем поднимают, чтобы нейтрализовать хотя бы часть поверхностных зарядов на липид-

нуклеиновые кислоты частицах, обеспечивая тем самым хотя бы частичную нейтрализацию поверхности липид- инкапсулированные нуклеиновые кислоты композиции.

Например, в одном из вариантов воплощения раствор одного или нескольких липидов (в том числе катионного липида любого из описанных здесь вариантов воплощения) в органическом растворе (например, этаноле) подготовлен. Кроме того, раствор одного или более активных (терапевтических) агентов (таких, как, например, молекулы миРНК или 1:1 молярная смесь двух молекул миРНК) в водном буферном (например, цитрат буфер) растворе приготовлен. Эти два раствора смешивают и разбавляют с образованием коллоидной суспензии частиц миРНК липидов. В одном варианте воплощения частицы миРНК липидов имеют средний размер частиц около 80-90 нм. В других вариантах воплощения дисперсию фильтруют через 0,45 / 2 микронные фильтры, концентрируют и диафильтруют посредством тангенциальной фильтрации. В еще одном варианте воплощения концентрацию полученного продукта доводят до примерно 2 мг / мл. В еще одном варианте воплощения продукт фильтруют, асептически фильтруют и упаковывают. Как описано выше, некоторые из этих катионных липидов являются аминокислотными липидами, которые имеют заряженные при pH ниже  $pK_a$  аминокислотные группы и, по существу нейтральны при pH выше  $pK_a$ . Эти катионные липиды называют титруемыми катионными липидами и они могут быть использованы в композициях с использованием двух этапов. Во-первых, липидные пузырьки могут быть сформированы при низком pH с титруемым катионным липидом и другими компонентами везикул в присутствии нуклеиновых кислот. Таким образом, пузырьки будут инкапсулированы и вовлекут нуклеиновые кислоты. Во-вторых, поверхностный заряд вновь образованных пузырьков может быть нейтрализован увеличением pH среды до уровня выше  $pK_a$  настоящего титруемого катионного липида, т. е. к физиологическому pH или выше. Особенно преимущественные аспекты этого процесса включают в себя поверхностное удаление с любой поверхности адсорбированных нуклеиновых кислот, в результате нуклеиновые кислоты доставляются средствами, которые имеют нейтральную поверхность. Липосомы, или липидные частицы, имеющие нейтральную поверхность, как ожидается, будут избегать быстрого выведения из обращения и избегать определенной токсичности, которая связана с катионными липосомными препаратами. Дополнительные подробности, касающиеся этих видов использования таких титруемых катионных липидов в получении нуклеиновых кислот- липиды частиц приведены в патенте США 6287591 и патенте США 6858225, которые включены сюда в качестве ссылки.

Надо также отметить, что пузырьки, которые образуются таким образом, обеспечивают образование одинакового размера пузырька с высоким содержанием нуклеиновых кислот. Кроме того, пузырьки могут иметь размер от примерно 30 до примерно 150 нм, более предпочтительно от около 30 до около 90 нм.

Не желая быть связанным с какой-либо конкретной теорией, считается, что самая высокая эффективность инкапсуляции нуклеиновых кислот является результатом электростатического взаимодействия при низких значениях pH. При pH кислом (например, pH 4,0) поверхность пузырьков заряжена и связывает части нуклеиновых кислот посредством электростатических взаимодействий. Когда внешний кислый буфер заменяют более нейтральным буфером (например, pH 7,5) на поверхности липидной частицы или липосомы нейтрализуются, что позволяет любой внешней нуклеиновой кислоте быть удаленной. Более подробная информация о процессе получения приводится в различных изданиях (например, патент США 6287591 и патент США 6858225).

В связи с вышеизложенным, способы получения липиды / нуклеиновые кислоты составов описаны. В описанных здесь способах, смесь липидов в сочетании с буфером водного раствора нуклеиновой кислоты для получения промежуточных смесей, содержащих нуклеиновые кислоты, инкапсулированные в липидные частицы, например, где инкапсулированные нуклеиновые кислоты, присутствующие в нуклеиновая кислота / липид отношении примерно от 10 мас% до примерно 20% мас. Промежуточная смесь может быть опционального размера для получения частицы липидов с инкапсулированными нуклеиновыми кислотами, в которой липидные порции представляют собой однослойные везикулы, предпочтительно с диаметром от 30 до 150 нм, более предпочтительно от 40 до 90 нм. pH затем поднимают, чтобы нейтрализовать хотя бы часть поверхностных зарядов на липид-нуклеиновые кислоты частицах, обеспечивая тем самым хотя бы частичную нейтрализацию поверхности липид-инкапсулированные нуклеиновые кислоты композиции.

В некоторых вариантах воплощения смесь липидов включает, по меньшей мере, два липидных компонента: первый компонент - липиды, которые выбирают из липидов, которые имеют  $pK_a$ , как катионные липиды при pH ниже  $pK_a$  и нейтральные при pH выше  $pK_a$ , и второй компонент - липиды, которые выбирают из липидов, которые препятствуют агрегации частиц во время формирования липид- нуклеиновая кислота частиц. В конкретных вариантах воплощения аминокислоты являются катионными липидами.

При приготовлении нуклеиновые кислоты-липид частиц, смесь липидов, как правило, является раствором липидов в органическом растворителе. Эта смесь липидов

может быть высушена с образованием тонкой пленки или лиофилизирована с получением порошка, прежде чем гидратирована с водным буфером для формирования липосом. Кроме того, в предпочтительном способе, смеси липидов могут быть растворены в воде, смешанной со спиртом, таким как этанол, и этот спиртовой раствор добавляют к водному буферу, в результате происходит спонтанное образование липосом. В большинстве вариантов воплощения спирт используется в том виде, в котором он имеется в продаже. Например, этанол может использоваться в качестве абсолютного этанола (100%), или 95% этанола, остальное - вода. Этот способ более подробно описан в патенте США № 5976567).

В одном варианте воплощения смесь липидов представляет собой смесь катионных липидов, нейтральных липидов (кроме катионных липидов), стерина (например, холестерин) и PEG-модифицированных липидов (например, PEG-DMG или PEG-DMA) в спиртовом растворителе. В предпочтительных вариантах воплощения смесь липидов состоит в основном из катионных липидов, нейтральных липидов, холестерина и PEG-модифицированных липидов в спирте, более предпочтительно этаноле. В других предпочтительных вариантах воплощения первый раствор состоит из указанной выше смеси липидов в молярном соотношении примерно 20 -70% катионного липида : 5 -45% нейтральных липидов : 20- 55% холестерина : 0,5- 15% PEG-модифицированных липидов. В еще более предпочтительном варианте воплощения, первый раствор состоит в основном из смеси катионных липидов, выбранных из липидов, описанных в Таблицах 1-5, DSPC, Chol и PEG-DMG или PEG-DMA, более предпочтительно в молярном соотношении примерно 20-60% катионного липида : 5- 25% DSPC: 25 -55% Chol : 0,5-15% PEG-DMG или PEG-DMA. В конкретных вариантах воплощения молярное липидное отношение составляет примерно 40/10/40/10 (мол.% катионных липидов / DSPC/Chol/PEG-DMG или PEG-DMA), 35/15/40/10 (мол.% катионных липидов / DSPC/Chol/PEG-DMG или PEG-DMA) или 52/13/30/5 (мол.% катионных липидов / DSPC/Chol/PEG-DMG или PEG-DMA). В другой группе предпочтительных вариантов воплощения нейтральные липиды в этих композициях заменяются POPC, DPPC, DOPE или SM.

Липидная смесь является сочетанием с буферным водным раствором, который может содержать нуклеиновые кислоты. Буферный водный раствор, как правило, раствор, в котором буфер имеет pH меньше, чем  $pK_a$  протонированных липидов в смеси липидов. Примеры подходящих буферов включают цитрат, фосфат, ацетат, и MES. Особенно предпочтительным буфером является цитратный буфер. Предпочтительные буферы будут находиться в диапазоне 1-1000 мМ по аниону, в зависимости от химии нуклеиновых

кислот инкапсуляции, и оптимизации концентрации буфера могут быть существенными для достижения высоких уровней загрузки (см., например, патент США 6287591 и патент США 6858225, каждый из которых включен в качестве ссылки в полном объеме). Кроме того, чистую воду подкисляют до pH 5-6 с хлоридом, сульфатом и т.п., которые могут быть полезны. В этом случае, он может быть подходящим, чтобы добавить 5% раствор глюкозы или другое неионное растворенное вещество, которое будет балансировать осмотический потенциал через мембраны частицы, когда частицы диализуются для удаления этанола, увеличения pH, или смешиваются с фармацевтически приемлемым носителем, таким как обычный физиологический раствор. Количество нуклеиновых кислот в буфере может варьироваться, но обычно составляет от около 0,01 мг / мл до около 200 мг / мл, более предпочтительно от около 0,5 мг / мл до около 50 мг / мл.

Смесь липидов и буферного водного раствора терапевтических нуклеиновых кислот объединяют, чтобы обеспечить промежуточные смеси. Промежуточные смеси, как правило, являются смесью липидных частиц, имеющих инкапсулированные нуклеиновые кислоты. Кроме того, промежуточная смесь может также содержать некоторую часть нуклеиновых кислот, которые крепятся к поверхности липидной частицы (липосомы или липидных пузырьков) за счет ионного притяжения отрицательно заряженных нуклеиновых кислот и положительно заряженных липидов на поверхности липидных частиц (аминолипидов или других липидов, составляющих протонированный первый компонент липидов, положительно заряженных в буфере с pH меньше, чем  $pK_a$  протонированной группы липидов). В одной группе предпочтительных вариантов воплощения смесь липидов является спиртовым раствором липидов и объемы каждого из растворов регулируется таким образом, что после комбинации, в результате содержание алкоголя составляет от примерно 20% по объему до около 45% по объему. Способ объединения смесей может включать в себя любые из множества процессов, часто в зависимости от масштабов производства смеси. Например, при общем объеме, который составляет около 10-20 мл или менее, растворы могут быть объединены в пробирке и перемешаны вместе с помощью вихревого смесителя. Крупномасштабные процессы могут быть осуществлены в соответствующей посуде серийного производства.

Опционально, липид-инкапсулированный терапевтический агент (например, нуклеиновые кислоты) комплексы, которые получают путем объединения смеси липидов и буферного водного раствора терапевтического агента (нуклеиновые кислоты) может быть рассчитан для достижения желаемого диапазона размеров с относительно узким распределением размеров липидных частиц. Предпочтительно, композиции

представленные здесь будут такого размера, чтобы средний диаметр составлял от около 70 до около 200 нм, более предпочтительно от около 90 до около 130 нм. Некоторые методы доступны для определения размера липосом нужного размера. Один способ калибровки описан в патенте США № 4737323, который включен сюда в качестве ссылки. Ультразвуковое облучение суспензии липосом либо с помощью ванны либо ультразвуковым зондом производит постепенное уменьшение размеров вплоть до мелких однослойных везикул (SUV) менее 0,05 мкм в размере. Гомогенизация является другим способом, который опирается на сдвиг энергии фрагментов больших липосом на более мелкие. В обычной процедуре гомогенизации, многослойные пузырьки циркулируют через стандартный эмульсионный гомогенизатор до выбранного размера липосомы, как правило, примерно от 0,1 до 0,5 мкм. В обоих способах распределение частиц по размерам можно контролировать с помощью обычного лазерного пучка определения размера частиц. Для некоторых способов здесь используется экструзия для получения одинакового размера пузырька.

Экструзия липосом композиции через поликарбонатную мембрану с небольшими порами или асимметричную керамическую мембрану дает в результате относительно четко определенное распределение по размерам. Как правило, суспензия пропускается циклически через мембрану один или несколько раз, пока не достигается желаемое сложное распределение размера липосом. Липосомы могут последовательно выдавливаться через мембраны с меньшими порами, чтобы достичь постепенного сокращения размера липосом. В некоторых случаях, липид-нуклеиновая кислота композиции, которые образуются, могут быть использованы без калибровки.

В конкретных вариантах воплощения способы дополнительно включают стадию нейтрализации, по меньшей мере, некоторых из поверхностных зарядов на липидной части липид-нуклеиновая кислота композиции. По меньшей мере, частично нейтрализуя поверхностные заряды, разинкапсулированная нуклеиновая кислота, освобождается с поверхности липидных частиц и может быть удалена из состава при использовании обычных методов. Предпочтительно, разинкапсулированные и поверхностно-адсорбированные нуклеиновые кислоты удаляют из полученной композиции путем обмена буферных растворов. Например, замена цитрат буфера (pH около 4,0, используемый для формирования составов) на HEPES буферный солевой (HBS pH около 7,5) раствор, приводит к нейтрализации поверхности липосомы и нуклеиновые кислоты высвобождаются с поверхности. Высвобожденные нуклеиновые кислоты могут быть удалены с помощью хроматографии с использованием стандартных способов, а затем

переведены в буфер с рН выше  $pK_a$  использованных липидов.

Опционально липидные пузырьки (т. е. липидные частицы) могут быть сформированы путем гидратации в водном буфере и формирования с использованием любого из способов, описанных выше, до введения в их состав нуклеиновых кислот. Как описано выше, водный буфер должен иметь рН ниже  $pK_a$  аминоклипидов. Раствор нуклеиновых кислот могут быть добавлен в эти предварительно сформированные пузырьки. Для обеспечения инкапсуляции нуклеиновых кислот в такие "предварительно сформированные" пузырьки смесь должна содержать алкоголь, такой как этанол. В случае этанола, он должен присутствовать в концентрации от около 20% (м/м) до около 45% (м/м). Кроме того, может быть необходимо нагреть смесь предварительно сформированных пузырьков и нуклеиновых кислот в водной смеси этанольного буфера до температуры от около 25 °С до около 50 °С в зависимости от состава липидных везикул и характера нуклеиновой кислоты. Это будет очевидно для специалиста в данной области, что оптимизация процесса инкапсуляции для достижения желаемого уровня нуклеиновых кислот в липидных везикулах потребует манипуляции переменными, такими как концентрация этанола и температура. Примеры подходящих условий для инкапсуляции нуклеиновых кислот приведены в Примерах. После того, как нуклеиновые кислоты заключены в предварительно сформированные пузырьки, внешний рН может быть увеличен для, по меньшей мере частичной, нейтрализации заряда поверхности. Разинкапсулированные и поверхностно адсорбированные нуклеиновые кислоты могут быть удалены как описано выше.

### **Способы лечения**

Липидные частицы и композиции, описанные здесь, могут быть использованы для различных целей, в том числе доставки связанных или инкапсулированных терапевтических агентов к клеткам, как *in vitro*, так и *in vivo*. Соответственно, способы лечения заболеваний или нарушений у субъекта, нуждающегося в этом, могут включать в себя контакт субъекта с липидной частицей, связанной с подходящим терапевтическим средством.

Как описано здесь, липидные частицы особенно полезны для доставки нуклеиновых кислот, в том числе, например, молекул мРНК и плазмид. Таким образом, липидные частицы и композиции могут быть использованы для модуляции экспрессии целевых генов и белков, как *in vitro*, так и *in vivo*, путем контакта с клетками липидных частиц, связанных с нуклеиновой кислотой, которая снижает экспрессию генов мишеней

(например, мРНК) или нуклеиновых кислот, которые могут быть использованы для увеличения экспрессии нужного белка (например, плазмиды, кодирующей нужный белок).

Липидные частицы могут быть использованы для доставки терапевтических агентов в клетку, *in vitro* или *in vivo*. В конкретных вариантах воплощения терапевтический агент представляет собой нуклеиновые кислоты, которые поступают в клетку с помощью нуклеиновых кислот-липидных частиц. В то время как следующее описание различных способов применения липидных частиц и связанных с ними фармацевтических композиций является примером описания связанных с нуклеиновой кислотой-липидных частиц, следует понимать, что эти способы и композиции могут быть легко приспособлены для доставки любого терапевтического средства для лечения любого заболевания или расстройства, которые выиграют от такого лечения.

В некоторых вариантах воплощения способы введения нуклеиновых кислот в клетку описаны. Предпочтительные нуклеиновые кислоты для введения в клетки - мРНК, иммуностимулирующие олигонуклеотиды, плазмиды, антисмысловые и рибозимы. Эти способы могут быть выполнены при контакте частиц или композиций с клетками в течение периода времени, достаточного для внутриклеточной доставки.

Композиции могут адсорбироваться практически в любой тип клеток. После адсорбирования, нуклеиновые кислоты-липидные частицы могут быть либо эндоцитированы частично клетками, путем обмена липидов с клеточными мембранами, или сливаются с клетками. Передача или включения в состав нуклеиновокислотной части комплекса может осуществляться с помощью любого из этих путей. Не желая быть ограниченными, можно считать, что в случае частиц, поступивших в клетку путем эндоцитоза, частицы затем взаимодействуют с эндосомной мембраной, что приводит к дестабилизации мембраны эндосом, возможно, с образованием небислойной фазы, в результате чего происходит введение инкапсулированных нуклеиновых кислот в цитоплазму клетки. Точно так же в случае прямого слияния частиц с клеточной плазматической мембраной, когда происходит слияние, липосомальная мембрана интегрирована в клеточные мембраны и содержимое липосомы комбинируется с внутриклеточной жидкостью. Контакты между клетками и липид-нуклеиновые кислоты композициями, когда проводятся *in vitro*, происходят в биологически совместимой среде. Концентрация композиции может варьироваться в зависимости от конкретного применения, но обычно составляет от около 1 мкмоль и до около 10 ммоль. В некоторых вариантах воплощения обработка клеток липидной композицией нуклеиновых кислот, как правило, будет осуществляться при физиологической температуре (около 37 °C) в течение

периода времени от 1 до 24 часов, предпочтительно от 2 до 8 часов. При применении *in vitro*, доставка нуклеиновых кислот может быть в любую клетку, выращенную в культуре, будь то растительного или животного происхождения, позвоночных и беспозвоночных, а также любые ткани или типы. В предпочтительных вариантах воплощения клетки будут клетками животных, более предпочтительно - клетками млекопитающих, и наиболее предпочтительно - клетками человека.

В одной группе вариантов воплощения липид-нуклеиновых кислот суспензия частиц добавляется к 60- 80% вырожденному покрытию клеток, имеющему плотность клеток от примерно  $10^3$  до примерно  $10^5$  клеток / мл, более предпочтительно около  $2 \times 10^4$  клеток / мл. Концентрация суспензии, добавляемой к клеткам, предпочтительно равна примерно от 0,01 до 20 мкг / мл, более предпочтительно примерно 1 мкг / мл.

В другом варианте воплощения липидные частицы могут быть использованы для доставки нуклеиновых кислот в клетки или клеточные линии (например, линии опухолевых клеток). Неограничивающие примеры таких клеточных линий включают в себя: HELA (ATCC Cat N: CCL-2), KB (ATCC Cat N: CCL-17), HEP3B (ATCC Cat N: HB-8064), SKOV-3 (ATCC Cat N: HTB-77), HCT-116 (ATCC Cat N: CCL-247), HT-29 (ATCC Cat N: HTB-38), PC-3 (ATCC Cat N: CRL-1435), A549 (ATCC Cat N: CCL-185), MDA-MB-231 (ATCC Cat N: HTB-26).

Типичные области применения включают использование хорошо известных процедур для обеспечения внутриклеточной доставки миРНК, чтобы подавить или отключить специфические клеточные мишени. Альтернативные применения включают в себя доставку ДНК или мРНК последовательности, кодирующие терапевтически полезные полипептиды. Таким образом, терапия предназначена для генетического заболевания путем подачи недостаточных или отсутствующих генных продуктов (т. е. при дистрофии Дюшенна, см. Kunkel, *et al.*, *Brit. Med. Bull.* 45(3):630-643 (1989), а также для муковисцидоза, см. Goodfellow, *Nature* 341:102-103 (1989)). Другие применения композиции включают введение антисмысловых олигонуклеотидов в клетки (см., Bennett, *et al.*, *Mol. Pharm.* 41:1023-1033 (1992)).

Кроме того, композиции могут быть также использованы для доставки нуклеиновых кислот в клетки *in vivo*, используя способы, которые известны специалистам в данной области. Что касается доставки ДНК или мРНК последовательности, Zhu, *et al.*, *Science* 261:209-211 (1993), включено здесь в качестве ссылки, описывает внутривенное введение цитомегаловируса (CMV) плазмиды для экспрессии хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT) с использованием комплексов DOTMA-DOPE.

Hyde, *et al.*, *Nature* 362:250-256 (1993), включено здесь в качестве ссылки, описывает доставку муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости (CFTR) генов в эпителии дыхательных путей и альвеол легких мышей, с использованием липосом. Brigham, *et al.*, *Am. J. Med. Sci.* 298:278-281 (1989), включено здесь в качестве ссылки, описывает *in vivo* трансфекцию легких мышей с функционированием прокариотических генов, кодирующих внутриклеточный фермент, хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT). Таким образом, композиции могут быть использованы в лечении инфекционных заболеваний.

Для введения *in vivo*, фармацевтические композиции предпочтительно вводят парентерально, т. е. интраартикулярно, внутривенно, внутрибрюшинно, подкожно или внутримышечно. В конкретных вариантах воплощения фармацевтические композиции вводят внутривенно или внутрибрюшинно при болюсной инъекции. Для примера, см. Stadler, *et al.*, патент США № 5286634, который включен здесь в качестве ссылки. Внутриклеточная доставка нуклеиновых кислот также обсуждалась в Straubinger, *et al.*, *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York. 101:512-527 (1983); Mannino, *et al.*, *Biotechniques* 6:682-690 (1988); Nicolau, *et al.*, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 6:239-271 (1989), и Behr, *Acc. Chem. Res.* 26:274-278 (1993). Тем не менее другие способы терапии и введения на липидной основе описаны, например, Ruhman *at al.*, патент США № 3993754; Sears, патент США № 4145410; Papahadjopoulos *et al.*, патент США № 4235871; Schneider, патент США № 4224179; Lenk *et al.*, патент США № 4522803, а также Fountain *et al.*, патент США № 4588578.

В других способах, фармацевтические препараты могут контактировать с тканью-мишенью путем прямого применения препарата в ткани. Применение может быть сделано топикально, "открытой" или "закрытой" процедурами. "Топикально" - это означает прямое применение фармацевтических препаратов в ткани, которая подвергается воздействию окружающей среды, таких как кожа, ротоглотка, наружный слуховой проход и тому подобное. "Открытые" процедуры - те процедуры, которые включают надрезание кожи пациента и непосредственно визуализацию основной ткани, к которой подаются фармацевтические препараты. Это обычно достигается путем хирургического вмешательства, такого как торакотомия для доступа к легким, брюшная лапаротомия для доступа к брюшной полости, или другого прямого хирургического подхода к ткани-мишени. "Закрытые" процедуры являются инвазивными процедурами, в которых внутренние ткани-мишени непосредственно не визуализируются, но доступны через вставку инструментов через небольшие раны на коже. Например, препараты могут быть

введены в брюшину хирургической иглой. Кроме того, фармацевтические препараты могут быть введены в мозговые оболочки и спинной мозг путем инфузии во время спинномозговой пункции вслед за соответствующим позиционированием пациента, как обычно практикуется для спинальной анестезии или метразамидной визуализации спинного мозга. Кроме того, препараты могут быть введены через эндоскопические устройства.

Липид-нуклеиновые кислоты композиции также могут быть введены в виде аэрозоля, который попадает в легкие (см., Brigham, *et al.*, *Am. J. Sci.* 298(4):278-281 (1989)) либо по прямому впрыскиванию в место заболевания (Culver, Human Gene Therapy, MaryAnn Liebert, Inc., Publishers, New York. pp.70-71 (1994)).

Дозы для липид- терапевтических агентов частиц будут зависеть от соотношения терапевтического агента к липиду и мнения лечащего врача в зависимости от возраста, веса и состояния пациента.

В одном из вариантов воплощения способ модуляции экспрессии целевого полинуклеотида или полипептида описаны. Эти способы обычно включают контактирование клетки с липидной частицей, связанной с нуклеиновой кислотой, способной модулировать экспрессию целевого полинуклеотида или полипептида. Как здесь используется, термин "модулирующей" относится к изменению экспрессии целевого полинуклеотида или полипептида. В разных вариантах воплощения модуляция может означать увеличение или расширение, или это может означать уменьшение или сокращение. Способы измерения уровня экспрессии целевого полинуклеотида или полипептида известны и доступны в области науки и включают, например, способы, использующие обратной транскрипции полимеразную цепную реакцию (ОТ-ПЦР) и иммуногистохимические методы. В конкретных вариантах воплощения уровень экспрессии целевого полинуклеотида или полипептида увеличивается или уменьшается по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, или более чем на 50% по сравнению с соответствующим контрольным значением.

Например, если повышенная экспрессия полипептида желательна, нуклеиновая кислота может быть вектором экспрессии, который включает в себя полинуклеотид, который кодирует желаемый полипептид. С другой стороны, если уменьшить экспрессию целевого полинуклеотида или полипептида, то нуклеиновыми кислотами могут быть, например, антисмысловые олигонуклеотиды, мРНК или микроРНК, которая содержит полинуклеотидную последовательность, которая специфически гибридизуется к полинуклеотиду, который кодирует целевой полипептид, тем самым нарушая экспрессию

целевого полинуклеотида или полипептида. Кроме того, нуклеиновые кислоты могут быть плазмидой, которая экспрессирует такой антисмысловой олигонуклеотид, миРНК или микроРНК.

В конкретных вариантах воплощения терапевтический агент выбран из миРНК, микроРНК, антисмыслового олигонуклеотида и плазмиды, способной экспрессировать миРНК, микроРНК или антисмыслового олигонуклеотида, и где миРНК, микроРНК, или антисмысловая РНК содержит полинуклеотид, который специфически связывается с полинуклеотидом, который кодирует полипептид или ему комплементарный, так что экспрессия полипептида уменьшается.

В других вариантах воплощения нуклеиновая кислота представляет собой плазмиду, которая кодирует полипептид или функциональный вариант или его фрагмент, такой, что экспрессия полипептида или функционального варианта или фрагмента увеличивается.

В соответствующих вариантах воплощения способ лечения заболевания или расстройства, характеризующегося избыточной экспрессией полипептида в субъекте, включает в себя предоставление субъекту фармацевтической композиции, в которой терапевтический агент выбран из миРНК, микроРНК, антисмыслового олигонуклеотида и плазмиды, способных экспрессировать миРНК, микроРНК, или антисмыслового олигонуклеотида, и где миРНК, микроРНК или антисмысловая РНК содержит полинуклеотид, который специфически связывается с полинуклеотидом, который кодирует полипептид или комплементарный ему.

В одном варианте воплощения фармацевтическая композиция содержит липидную частицу, которая состоит или состоит по существу из смеси катионных липидов, выбранных из липидов, описанных в Таблицах 1-5, DSPC, Chol и PEG-DMG или PEG-DMA, например, в молярном соотношении примерно 20- 60% катионного липида: 5 - 25% DSPC: 25- 55% Chol: 0,5- 15% PEG- DMG или PEG -DMA, в котором липидная частица ассоциирована с терапевтической нуклеиновой кислотой. В конкретных вариантах воплощения молярное липидное отношение составляет примерно 40/10/40/10 (мол.% катионных липидов / DSPC/Chol/PEG-DMG или PEG-DMA), 35/15/40/10 (мол.% катионных липидов / DSPC/Chol/PEG-DMG или PEG-DMA) или 52/13/30/5 (мол.% катионных липидов / DSPC/Chol/PEG-DMG или PEG-DMA). В другой группе вариантов воплощения нейтральный липид в этих композициях заменяют на POPC, DPPC, DOPE или SM.

В другом родственном варианте воплощения способ лечения заболевания или

расстройства, характеризующегося повышенной экспрессией полипептида в субъекте, включает в себя предоставление субъекту фармацевтической композиции, в которой терапевтический агент представляет собой плазмиду, которая кодирует полипептид или функциональный вариант или его фрагмент.

Способ индукции иммунного ответа у субъекта, может включать предоставление субъекту фармацевтической композиции, в которой терапевтическим средством является иммуностимулирующий олигонуклеотид. В некоторых вариантах воплощения иммунный ответ является гуморальным или мукозальным иммунным ответом.

В других вариантах воплощения фармацевтическая композиция предоставляется субъекту в сочетании с вакциной или антигеном. Таким образом, вакцины могут включать липидную частицу, которая включает в себя иммуностимулирующий олигонуклеотид, а также связанный антиген, с которым иммунный ответ является лучшим. В конкретных вариантах воплощения антиген является антигеном опухоли или связан с инфекционным агентом, таким как, например, вирусы, бактерии или паразиты.

Различные опухолевые антигены, антигены инфекционных агентов, и антигены, связанные с другими заболеваниями, хорошо известны в данной области и примеры из них описаны в цитируемых здесь источниках. Примеры подходящих антигенов включают, но не ограничиваются этим, полипептидные антигены и ДНК-антигены. Конкретными примерами антигена являются антигены гепатита А, гепатита В, оспы, полиомиелита, сибирской язвы, гриппа, сыпного тифа, столбняка, кори, ротавируса, дифтерии, коклюша, туберкулеза и краснухи. В предпочтительном варианте воплощения антиген гепатита В является рекомбинантным антигеном. В других аспектах антиген гепатита является рекомбинантным антигеном. В другом аспекте антиген является антигеном опухоли. Примерами таких антигенов опухолей являются MUC-1, EBV антигены и антигены, связанные с лимфомой Беркитта. В еще одном аспекте антиген является антигеном тирозиназ-связанного белка опухолевого рекомбинантного антигена. Специалистам в данной области известны другие антигены, пригодные для использования.

Опухолевые антигены, пригодные для использования, включают в себя как мутированные, так и немутированные молекулы, которые могут указывать на один тип опухоли, распределяются между несколькими типами опухолей, и / или исключительно экспрессируются или избыточно экспрессируются в опухолевых клетках по сравнению с нормальными клетками. В дополнение к белкам и гликопротеинам, опухолевые специфические формы экспрессируют углеводы, ганглиозиды, гликолипиды и муцин также были документированы. Примерами антигенов опухолей для использования в

субъекте являются вакцины рака, которые включают белковые продукты онкогенов, генов-супрессоров опухолей и других генов с мутациями или перестановками, уникальными для опухолевых клеток, активизируемых эмбриональных генных продуктов, онкофетальных антигенов, тканеспецифических (но не опухольспецифические) антигенов дифференциации, рецепторов факторов роста, клеточной поверхности углеводных остатков, иностранных вирусных белков и ряда других собственных белков.

Конкретные варианты воплощения опухолевых антигенов включают, например, мутировавшие антигены, такие как белковые продукты Ras p21 протоонкогенов, супрессоры опухолей p53 и BCR-abl онкогенов, а также CDK4, MUM1, каспазы 8 и beta-катенин; сверхэкспрессированные антигены, такие как галектин 4, галектин 9, карбоангидразы, альдолаза А, PRAME, Her2/neu, ErbB 2 и KCA, онкофетальные антигены, такие как альфа-фетопротеин (AFP), хорионического гонадотропина человека (hCG); собственные антигены, такие как раковоэмбриональный антиген (CEA) и антигены дифференциации меланоцитов, такие как Mart 1/Melan A, gp100, gp75, тирозиназы, TRP1 и TRP2; антигены простаты, таких как PSA, PAP, PSMA, PSM-P1 и PSM-P2; реактивированные эмбриональные генные продукты, таких как MAGE 1, MAGE 3, MAGE 4, GAGE 1, GAGE 2, BAGE, RAGE и другие антигены рака яичка, такие как NY-ESO1, SSX2 и SCP1; муцины, такие как Muc -1 и Muc -2; ганглиозиды, такие как GM2, GD2 и GD3, нейтральные гликолипиды и гликопротеины, такие как Lewis (y) и globo-H; и гликопротеины, такие как Tn, Томпсона-Фрейденрейха антиген (TF) и sTn. Также включают как опухольассоциированные антигены здесь – целые клетки и клеточные лизаты опухолей, а также иммуногенных их частей, а также иммуноглобулины идиотипов, экспрессированные на моноклональных пролиферирующих лимфоцитах В для использования против В клеточной лимфомы.

Патогены включают, но не ограничиваются ими, инфекционные агенты, например, вирусы, которые заражают млекопитающих и, в частности, людей. Примеры инфекционных вирусов включают, но не ограничиваются этим: Retroviridae (например, вирусы иммунодефицита человека, такие как ВИЧ 1 (также известный как HTLV-III, LAV или HTLV-III / LAV, или ВИЧ-III, а также другие штаммы, такие как ВИЧ LP; Picornaviridae (например, вирусы полиомиелита, вирус гепатита А, энтеровирусы, вирусы Коксаки человека, риновирусы, эховирусы); Calciviridae (например, штаммы, вызывающие гастроэнтерит); Togaviridae (например, лошадиного вирусного энцефалита, вирусы краснухи); Flaviridae (например, вирусы денге, вирусы энцефалита, вирусы желтой лихорадки); Coronaviridae (например, коронавируса); Rhabdoviridae (например, вирусы

везикулярного стоматита, вирусы бешенства); Coronaviridae (например, коронавирус); Rhabdoviridae (например, вирусы везикулярного стоматита, вирусы бешенства); Filoviridae (например, лихорадки Эбола вирус); Paramyxoviridae (например, вирусы парагриппа, вирус эпидемического паротита, вирус кори, респираторно-синцитиальный вирус); Orthomyxoviridae (например, вирусы гриппа); Bunyaviridae (например, Хантаан вирусы, вирусы Bunge, плебовирусы и Nairo вирусы); Arenaviridae (вирусы геморрагической лихорадки); Reoviridae (например, реовирусы, орбивирусы и ротавирусы); Birnaviridae; Herpesviridae (вирус гепатита В); Parvoviridae (парвовирусы); Papovaviridae (вирусы папилломы, вирусы полиомы); Adenoviridae (большинство аденовирусов); Herpesviridae простого герпеса вирус (HSV) 1 и 2, вирус ветряной оспы, цитомегаловирус (CMV), вирус герпеса; Poxviridae (натуральной оспы вирусы, вирусы коровьей оспы, вирусы оспы), и Iridoviridae (например, вирус африканской лихорадки свиней) и неклассифицированные вирусы (например, возбудители губчатой энцефалопатии, агент дельта-гепатита (считается дефектным спутником вируса гепатита В), агенты не-А, не-В гепатита (класс 1 = передается внутренне; класс 2 = передается парентерально (например, гепатит С); Norwalk и связанные вирусы и астровирусы).

Кроме того, грамотрицательные и грамположительные бактерии служат в качестве антигенов у позвоночных животных. Такие грамположительные бактерии, включают, но не ограничиваются этим, *Pasteurella species*, *Staphylococci species* и *Streptococcus species*. Грамотрицательные бактерии, включают, но не ограничиваются этим, *Escherichia coli*, *Pseudomonas species* и *Salmonella species*. Конкретные примеры инфекционных бактерий включают, но не ограничиваются этим: *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria sps* (например, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (Group A Streptococcus), *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococcus), *Streptococcus (viridans group)*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus (anaerobic sps.)*, *Streptococcus pneumoniae*, pathogenic *Campylobacter sp.*, *Enterococcus sp.*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium sp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenuis*, *Leptospira*, *Rickettsia* и *Actinomyces israelii*.

Дополнительные примеры патогенов включают, но не ограничиваются ими, инфекционные грибы, которые заражают млекопитающих и, в частности, людей.

Примеры инфекционных грибов включают, но не ограничиваются этим: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*. Примеры инфекционных паразитов включают такие как *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* и *Plasmodium vivax*. Другие инфекционные организмы (например, простейшие) включают *Toxoplasma gondii*.

В одном из вариантов воплощения композиции могут быть использованы, чтобы заставить утихнуть или модулировать гены-мишени, такие как, но не ограничиваясь этим, FVII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, PDGF beta ген, Erb-B ген, Src ген, CRK ген, GRB2 ген, RAS ген, MEKK ген, JNK ген, RAF ген, Erk1/2 ген, PCNA(p21) ген, MYB ген, JUN ген, FOS ген, BCL-2 ген, Cyclin D ген, VEGF ген, EGFR ген, Cyclin A ген, Cyclin E ген, WNT-1 ген, beta-катенин ген, c-MET ген, PKC ген, NFkB ген, STAT3 ген, сурвивин ген, Her2/Neu ген, SORT1 ген, XBP1 ген, топоизомеразы I ген, топоизомеразы II alpha ген, p73 ген, p21(WAF1/CIP1) ген, p27(KIP1) ген, PPM1D ген, RAS ген, кавеолин I ген, MIB I ген, MTA1 ген, M68 ген, гены опухолевых супрессоров, p53 опухолевого супрессора ген, p53 семейства член DN-p63, pRb опухолевого супрессора ген, APC1 опухолевого супрессора ген, BRCA1 опухолевого супрессора ген, PTEN опухолевого супрессора ген, mLL слияния ген, BCR/ABL слияния ген, TEL/AML1 слияния ген, EWS/FLI1 слияния ген, TLS/FUS1 слияния ген, PAX3/FKHR слияния ген, AML1/ETO слияния ген, alpha v-интегрин ген, Flt-1 рецептора ген, тубулина ген, вируса человеческой папилломы ген, ген, необходимый для репликации вируса человеческой папилломы, ген вируса иммунодефицита человека, ген, необходимый для репликации вируса иммунодефицита человека, ген вируса гепатита А, ген, необходимый для репликации вируса гепатита А, вируса гепатита В ген, ген, необходимый для репликации вируса гепатита В, вируса гепатита С ген, ген, необходимый для репликации вируса гепатита С, вируса гепатита D ген, ген, необходимый для репликации вируса гепатита D, вируса гепатита E ген, ген, необходимый для репликации вируса гепатита E, вируса гепатита F ген, ген, необходимый для репликации вируса гепатита F, вируса гепатита G ген, ген, необходимый для репликации вируса гепатита G, вируса гепатита H ген, ген, необходимый для репликации вируса гепатита H, респираторного синцитиального вируса ген, ген, необходимый для репликации респираторного синцитиального вируса, Herpes Simplex Virus ген, ген, необходимый для репликации Herpes Simplex Virus, герпес Cytomegalovirus ген, ген, необходимый для репликации герпес Cytomegalovirus, герпес

Epstein Barr Virus ген, ген, необходимый для репликации герпес Epstein Barr Virus, Kaposi's Sarcoma-ассоциированный Herpes Virus ген, ген, необходимый для репликации Kaposi's Sarcoma-ассоциированный Herpes Virus, JC Virus ген, человеческий ген, необходимый для репликации JC Virus, миксовируса гена, ген, необходимый для репликации миксовируса, риновируса ген, ген, необходимый для репликации риновируса, коронавируса ген, ген, необходимый для репликации коронавируса, West Nile Virus ген, ген, необходимый для репликации West Nile Virus, St. Louis Encephalitis ген, ген, необходимый для репликации St. Louis Encephalitis, Tick-borne encephalitis virus ген, ген, необходимый для репликации Tick-borne encephalitis virus, Murray Valley encephalitis virus ген, ген, необходимый для репликации Murray Valley encephalitis virus, dengue virus ген, ген, необходимый для репликации dengue virus , Simian Virus 40 ген, ген, необходимый для репликации Simian Virus 40, Human T Cell Lymphotropic Virus ген, ген, необходимый для репликации Human T Cell Lymphotropic Virus , Moloney-Murine Leukemia Virus ген, ген, необходимый для репликации Moloney-Murine Leukemia Virus, энцефаломиокардита вирус ген, ген, необходимый для репликации энцефаломиокардита вируса, measles virus ген, ген, необходимый для репликации measles virus, Vericella zoster virus ген, ген, необходимый для репликации Vericella zoster virus, аденовирус ген, ген, необходимый для репликации аденовируса, вирус желтой лихорадки ген, ген, необходимый для репликации вируса желтой лихорадки, полиовирус ген, ген, необходимый для репликации полиовируса, поксвирус ген, ген, необходимый для репликации поксвируса, плазмодий ген, ген, необходимый для репликации плазмодия, Mycobacterium ulcerans ген, ген, необходимый для репликации Mycobacterium ulcerans , Mycobacterium tuberculosis ген, ген, необходимый для репликации Mycobacterium tuberculosis , Mycobacterium leprae ген, ген, необходимый для репликации Mycobacterium leprae , Staphylococcus aureus ген, ген, необходимый для репликации Staphylococcus aureus , Streptococcus pneumoniae ген, ген, необходимый для репликации Streptococcus pneumoniae , Streptococcus pyogenes ген, ген, необходимый для репликации Streptococcus pyogenes , Chlamydia pneumoniae ген, ген, необходимый для репликации Chlamydia pneumoniae , Mycoplasma pneumoniae ген, ген, необходимый для репликации Mycoplasma pneumoniae , интегрин ген, селектин ген, комплесистемы комплемента ген, хемокина ген, хемокина рецептора ген, GCSF ген, Gro1 ген, Gro2 ген, Gro3 ген, PF4 ген, MIG ген, Pro-Platelet Basic Protein ген, MIP-1I ген, MIP-1J ген, RANTES ген, MCP-1 ген, MCP-2 ген, MCP-3 ген, SMBKR1 ген, SMBKR2 ген, SMBKR3 ген, SMBKR5v, AIF-1 ген, I-309 ген, ген компонента ионного канала, ген нейротрансмиттерного рецептора, а ген

нейротрансмиттерного лиганда, амилоидного семейства ген, пресенилин ген, HD ген, DRPLA ген, SCA1 ген, SCA2 ген, MJD1 ген, CACNL1A4 ген, SCA7 ген, SCA8 ген, аллельный ген находящийся в ЛОН клетках, или один аллельный ген полиморфного гена.

В другом варианте воплощения настоящее изобретение относится к способу доставки молекулы нуклеиновой кислоты, включающему введение нуклеиновых липидных частиц, содержащих молекулу нуклеиновой кислоты, и катионных липидов, катионных липидов, имеющих

(i) центральный атом углерода,  
(ii) головную группу, непосредственно связанную с центральным атомом, и  
(iii) два гидрофобных хвоста, непосредственно связанные с центральным атомом углерода, каждый гидрофобный хвост, содержащий C<sub>14</sub> или более алифатическую группу, присоединенную к центральному атому, где алифатическая группа (a) разрываема биоразлагаемая группа, такая, что имеет цепь по меньшей мере из четырех атомов углерода между биоразлагаемой группой и центральным атомом углерода, или (b) включает в себя биоразлагаемую группу на терминальном конце гидрофобного хвоста, такую, что катионный липид остается нетронутым до доставки молекулы нуклеиновой кислоты, после чего расщепление гидрофобного хвоста происходит *in vivo*.

### **Определения**

Как здесь используется, термин "катионный липид" включает все те липиды, имеющие одну или две жирные кислоты или жирные алифатические цепи и головную аминогруппу (в том числе алкиламино или диалкиламино группу), которая может быть протонирована с образованием катионных липидов при физиологическом значении pH. В некоторых вариантах воплощения катионный липид называют "амино липидом".

Субъект или пациент, у которого введение комплекса является эффективной схемой лечения болезни или расстройства – предпочтительно человек, но может быть любое животное, в том числе лабораторное животное в условиях клинических испытаний или скрининга или активного эксперимента. Таким образом, можно легко понять любому из специалистов в данной области техники, что способы, соединения и композиции настоящего изобретения особенно подходят для введения любым животным, особенно млекопитающим, и в том числе, но отнюдь не ограничиваясь ими, людям, домашним животным, таким как кошачий или собачий субъекты, сельскохозяйственным животным, таким как, но не ограничиваясь ими, коровы, лошади, козы, овцы, свиньи, диким животным (будь то в дикой природе или в зоологическом саду), исследовательским

животным, таких как мыши, крысы, кролики, козы, овцы, свиньи, собаки и кошки, птицы, такие как куры, индейки и певчие птицы, т. е. для ветеринарного использования.

Многие из химических групп перечисляются в дженерических формулах выше и написаны в определенном порядке (например,  $-\text{OC}(\text{O})-$ ). Предполагается, что химические группы должны быть включены в общую формулу в представленном порядке, если не указано иное. Например, общая формула вида  $-(\text{R})_i-(\text{M}^1)_k-(\text{R})_m-$  где  $\text{M}^1$  является  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$  и  $k=1$  относится к  $-(\text{R})_i-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{R})_m-$ , если не указано иное. Следует понимать, что если химическая группа написана в определенном порядке, обратный порядок также предполагается, если не указано иное. Например, в общей формуле  $-(\text{R})_i-(\text{M}^1)_k-(\text{R})_m-$  где  $\text{M}^1$  определяется как  $\text{C}(\text{O})\text{NH}-$  (т.е.,  $-(\text{R})_i-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{R})_m-$ ), соединение, где  $\text{M}^1$  является  $-\text{NHC}(\text{O})-$  (т.е.,  $-(\text{R})_i-\text{NHC}(\text{O})-(\text{R})_m-$ ) также предполагается, если не указано иное.

Как здесь используется, термин "биоразлагаемая группа" относится к группе, которая включает одну или несколько связей, которые могут подвергаться реакции разрыва связей в биологической среде, например, в организме, органе, ткани, клетке или органелле. Например, биоразлагаемая группа может быть метаболизирована в теле млекопитающих, таких как человек (например, путем гидролиза). Некоторые группы, которые содержат биоразлагаемые связи, включают, например, но не ограничиваясь этим, эфиры, дитиолы и оксимы. Неограничивающие примеры из биоразлагаемых групп:  $-\text{OC}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{SC}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{S}-$ ,  $-\text{OC}(\text{S})-$ ,  $-\text{C}(\text{S})\text{O}-$ ,  $-\text{S}-\text{S}-$ ,  $-\text{C}(\text{R}^5)=\text{N}-$ ,  $-\text{N}=\text{C}(\text{R}^5)-$ ,  $-\text{C}(\text{R}^5)=\text{N}-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{N}=\text{C}(\text{R}^5)-$ ,  $-\text{C}(\text{O})(\text{NR}^5)-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{S})(\text{NR}^5)-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^5)-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{OSi}(\text{R}^5)_2\text{O}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})(\text{CR}^3\text{R}^4)\text{C}(\text{O})\text{O}-$  или  $-\text{OC}(\text{O})(\text{CR}^3\text{R}^4)\text{C}(\text{O})-$ .

Как здесь используется, "алифатическая" группа является неароматической группой, в которой атомы углерода соединены в цепочки, и либо насыщенные либо ненасыщенные.

Термины "алкил" и "алкилен" относятся к прямой или разветвленной цепи, насыщенному углеводородному фрагменту. В одном варианте воплощения алкильной группой является прямая цепь насыщенных углеводородов. Если не указано иное, "алкил" или "алкилен" группа содержит от 1 до 24 атомов углерода. Представители насыщенных прямых групп алкильной цепи включают метил, этил, н-пропил, н-бутил, н-пентил и н-гексил. Представители насыщенных разветвленных алкильных групп включают изопропил, вторбутил, изобутил, третбутил и изопентил.

Термин "алкенил" относится к прямой или разветвленной части углеводородной цепи, имеющей одну или более двойных углерод-углеродных связей. В одном варианте воплощения алкенил содержит 1, 2 или 3 двойные связи и иные насыщенные. Если не указано иное, "алкенил" группа содержит от 2 до 24 атомов углерода. Алкенильные группы включают в себя как цис-, так и транс-изомеры. Представители прямых и разветвленных алкенильных групп включают этиленил, пропиленил, 1-бутенил, 2-бутенил, изобутиленил, 1-пентенил, 2-пентенил, 3-метил-1-бутенил, 2-метил-2-бутенил и 2,3-диметил-2-бутенил.

Термин "алкинил" относится к прямой или разветвленной цепи углеводородного фрагмента, имеющей один или несколько углерод-углеродных тройных связей. Если не указано иное, "алкинил" группа содержит от 2 до 24 атомов углерода. Представители прямых и разветвленных алкинильных групп включают ацетиленил, пропилил, 1-бутинил, 2-бутинил, 1-пентинил, 2-пентинил и 3-метил-1-бутинил.

Термин "ацил" относится к карбонильной группе, замещенной водородом, алкилом, частично насыщенный или полностью насыщенный циклоалкил, частично насыщенный или полностью насыщенный гетероцикл, арил или гетероарил. Например, ацильные группы включают группы, такие как (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>) алканоил (например, формил, ацетил, пропионил, бутирил, валерил, капроил и третбутилацетил), (C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub>) циклоалкилкарбонил (например, циклопропилкарбонил, циклобутилкарбонил, циклопентилкарбонил и циклогексилкарбонил), гетероциклический карбонил (например, пирролидинилкарбонил, пирролил-2-он-5-карбонил, пиперидинилкарбонил, пиперазинилкарбонил и тетрагидрофуранилкарбонил), ароил (например, бензоил) и гетероароил (например, тиофенил-2-карбонил, тиофенил-3-карбонил, фуранил-2-карбонил, фуранил-3-карбонил, 1Н-пирроил-2-карбонил, 1Н-пирроил-3-карбонил и

бензо [b] тиофенил -2- карбонил).

Термин "арил" относится к ароматическим моноциклическим, бициклическим или трициклическим кольцевым системам углеводородов. Если не указано иное, "арил" группа содержит от 6 до 14 атомов углерода. Примеры арильных остатков включают, но не ограничиваются ими, фенил, нафтил, антраценил и пиренил.

Термины "циклоалкил" и "циклоалкилен" относятся к насыщенному моноциклическому или бициклическому фрагменту углеводородов, таких как циклопропил, циклобутил, циклопентил и циклогексил. Если не указано иное, "циклоалкил" или "циклоалкиленовая" группа содержит от 3 до 10 атомов углерода.

Термин "циклоалкилалкил" относится к циклоалкильной группе, связанной с алкильной группой, где алкильные группы связаны с остальной частью молекулы.

Термин "гетероцикл" (или "гетероциклил") относится к неароматической от 5 до 8 членной моноциклической или от 7 до 12 членной бициклической или от 11 до 14членной трициклической кольцевой системе, которая либо насыщена либо ненасыщена, и которая содержит от 1 до 3 гетероатомов, если моноциклическая, 1-6 гетероатомов, если бициклическая, или 1-9 гетероатомов, если трициклическая, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и в которой гетероатомы азота и серы могут быть опционально окислены, а гетероатом азота может быть опционально кватернизован. Например, гетероцикл может быть циклоалкокси группой. Гетероцикл может быть присоединен к остальной части молекулы через любой гетероатом или атом углерода в гетероцикле. Гетероциклы включают, но не ограничиваются этим, морфолинил, пирролидинонил, пирролидинил, пиперидинил, пиперизинил, гидантоинил, валеролактамыл, оксиранил, оксетанил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, тетрагидропиридинил, тетрагидропримидинил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопиранил, тетрагидропиримидинил, тетрагидротиофенил и тетрагидротиопиранил.

Термин "гетероарил" относится к ароматической 5 -8 членной моноциклической, 7-12 членной бициклической или 11 -14 членной трициклической кольцевой системе, имеющей 1- 3 гетероатома, если моноциклическая, 1- 6 гетероатомов, если бициклическая, или 1- 9 гетероатомов, если трициклическая, где гетероатомы выбранных из O, N или S (например, атомы углерода и 1 -3, 1 -6 или 1 -9 гетероатомов N, O или S если моноциклическая, бициклическая или трициклическая, соответственно). Гетероарильные группы, описанные здесь, могут также содержать конденсированных кольца, которые разделяют общие связи углерод-углерод.

Термин "замещенный", если не указано иное, относится к замене одного или

нескольких радикалов водорода в данной структуре радикалом указанного заместителя, включая, но не ограничиваясь ими: галоген, алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероциклический тиол, алкилтио, оксо, тиокси, арилтио, алкилтиоалкил, арилтиоалкил, алкилсульфонил, алкилсульфонилалкил, арилсульфонилалкил, алкокси, арилокси, аралкокси, аминокарбонил, алкиламинокарбонил, ариламинокарбонил, алкоксикарбонил, арилоксикарбонил, галогеналкил, амино, трифторметил, циано, нитро, алкиламино, ариламино, алкиламиноалкил, ариламиноалкил, аминоалкиламино, гидроксильный, алкоксиалкил, карбоксиалкил, алкоксикарбонилалкил, аминокарбонилалкил, ацил, аралкоксикарбонил, карбоновые кислоты, сульфокислоты, сульфонил, фосфоновая кислота, арил, гетероарил, гетероциклические и алифатические группы. Понятно, что заместитель может быть замещен. Примеры заместителей включают амино, алкиламино, диалкиламино и циклические аминосоединения.

Термин "галоген" или "гало" относится к фтору, хлору, бром и йоду.

Термины "алкиламин" и "диалкиламин" относятся к  $-NH(\text{алкил})$  и  $-N(\text{алкил})_2$  радикалам соответственно.

Термин "алкилфосфат" относится к  $-O-P(Q')(Q'')-O-R$ , где  $Q'$  и  $Q''$ , каждый независимо,  $O$ ,  $S$ ,  $N$  ( $R$ )<sub>2</sub>, опционально замещенный алкил или алкокси, и  $R$  представляет собой опционально замещенный алкил,  $\omega$ -аминоалкил или  $\omega$ -(замещенный)аминоалкил.

Термин "алкилфосфотиоат" относится к алкилфосфату, в котором по меньшей мере одна из  $Q'$  или  $Q''$  является  $S$ .

Термин "алкилфосфонат" относится к алкилфосфату, в котором по меньшей мере одна из  $Q'$  или  $Q''$  представляет собой алкил.

Термин "гидроксиалкил" относится к  $-O$ -алкильному радикалу.

Термин "алкилгетероцикл" относится к алкилу, где по меньшей мере один метилен был заменен гетероциклом

Термин " $\omega$ -аминоалкил" относится к  $-алкил-NH_2$ - радикалу. А термин " $\omega$ -(замещенный)аминоалкил" относится к  $\omega$ -аминоалкилу, где по меньшей мере, один из  $H$  на  $N$  был заменен на алкил.

Термин " $\omega$ -фосфоалкил" относится к  $-алкил-O-P(Q')(Q'')-O-R$ , где  $Q'$  и  $Q''$ , каждый независимо, является  $O$  или  $S$  и  $R$  опционально замещенный алкил.

Термин " $\omega$ -тиофосфоалкил" относится к  $\omega$ -фосфоалкилу, где по меньшей мере, один из  $Q'$  или  $Q''$  является  $S$ .

Следующие сокращения, которые используются в этом приложении:

DSPC: дистеароилфосфатидилхолин; DPPC: 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин;

POPC: 1 - пальмитоил-2-олеоил-sn-фосфатидилхолин; DOPE: 1,2-диолеоил-sn-3-фосфоэтанолламин; PEG-DMG как правило, относится к 1,2-димиристоил-sn-глицерин-метокси полиэтиленгликолю (например, PEG 2000); TBDPSCl: трет-бутилхлоридифенилсилан; DMAP: диметиламинопиридин; NMO: N-метилморфолин-N-оксид; LiHDMS: литий бис(триметилсилил)амид; HMPA: гексаметилфосфорамид; EDC: 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодимид; DIPEA: диизопропилэтиламин; DCM: дихлорметан; TEA: триэтиламин; TBAF: тетрабутиламмонийфторид.

В некоторых вариантах воплощения способ может потребовать использование защитных групп. Методологии защитных групп хорошо известны специалистам в данной области (см., например, Protective Groups in Organic Synthesis, Green, T.W. et. al., Wiley-Interscience, New York City, 1999). Короче говоря, защитной группой является любая группа, которая уменьшает или устраняет нежелательную реакционную способность функциональных групп. Защитная группа может быть добавлена к функциональной группе, чтобы замаскировать ее реактивность в определенной реакции и затем удаляется, чтобы показать оригинальную функциональную группу. В некоторых вариантах воплощения "спирт защитная группа" используется. "Спирт защитная группа" означает любую группу, которая уменьшает или устраняет нежелательную реакционную способность функциональных групп спирта. Защитные группы могут быть добавлены и удалены с помощью методов, хорошо известных в данной области.

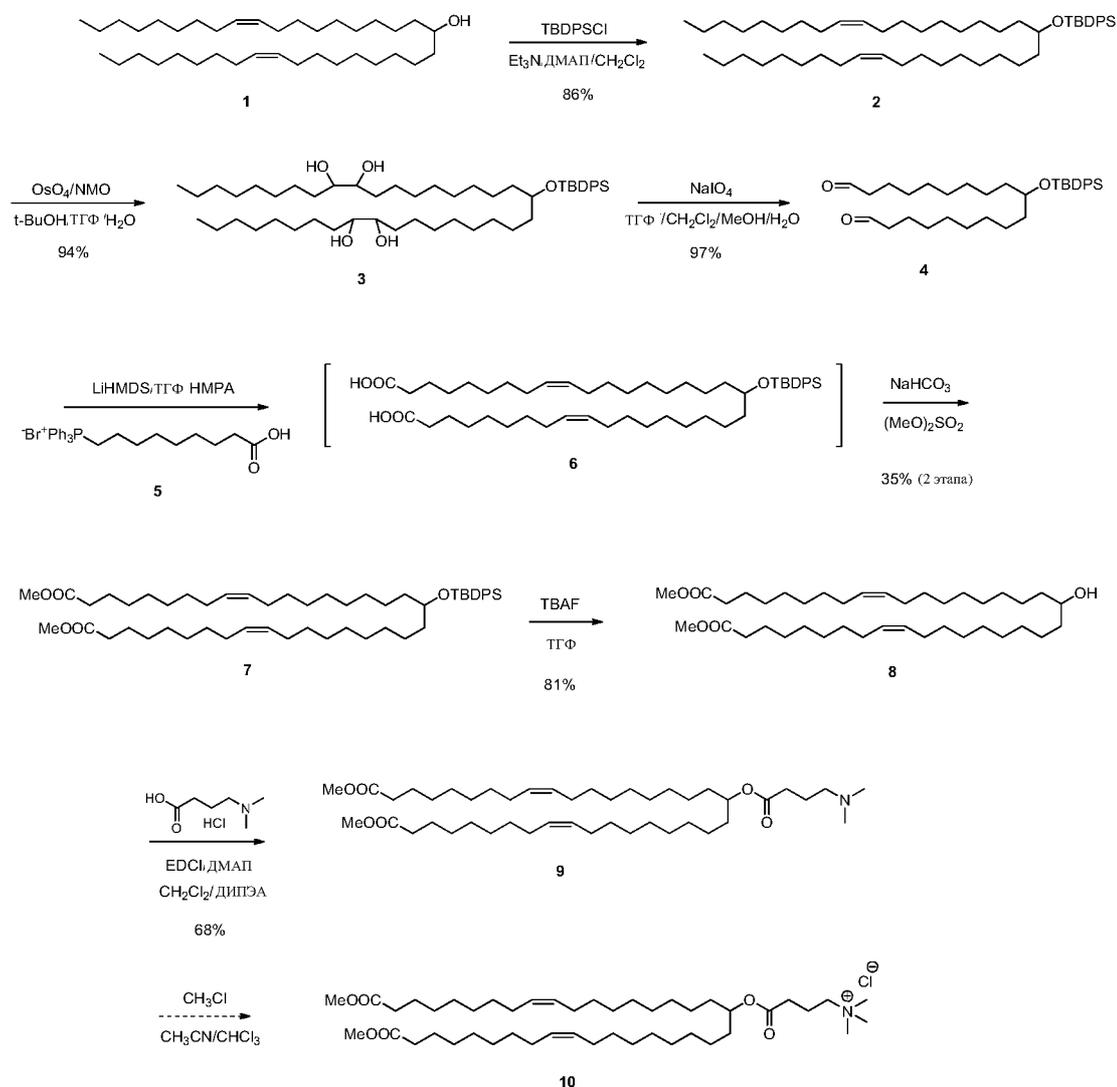
Соединения могут быть получены по меньшей мере, одним из методов, описанным здесь, или известным из органического синтеза.

### Примеры

#### **Пример 1**

#### **Схема 1**

## Схема 1



**Соединение 2:** К раствору соединения **1** (10,0 г, 18,8 ммоль, см. международную публикацию WO 2010/054406) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (80 мл) добавляли триэтиламин (7,86 мл, 56,4 ммоль), DMAP (459 мг, 3,76 ммоль) и трет-бутил(хлор)дифенилсилан (9,62 мл, 37,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 24 часов. Затем смесь разбавляли  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и промывали насыщенным водным раствором  $\text{NaHCO}_3$ . Органический слой отделяли и сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . После фильтрации и концентрации, сырой продукт очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (0-5%  $\text{EtOAc}$  в гексане), получая **2** (12,4 г, 16,1 ммоль, 86%,  $R_f = 0,24$  с гексаном).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.66-7.68 (m, 4 H), 7.33-7.42 (m, 6 H), 5.30-5.39 (m, 4 H), 3.67-3.72 (m, 1 H), 1.97-2.04 (m, 8 H), 1.07-1.42 (m, 52 H), 1.05 (s, 9 H), 0.88 (t,  $J = 6.8$  Hz, 6 H).

**Соединение 3:** К раствору **2** (12,4 г, 16,1 ммоль) в трет-бутаноле (100 мл), ТГФ (30 мл) и H<sub>2</sub>O (10 мл) добавляли 4-метилморфолин N-оксид (4,15 г, 35,4 ммоль) и осмия тетроксид (41 мг, 0,161 мг). Реакционную смесь перемешивали в течение 16 часов, затем гасили путем добавления бисульфита натрия. После удаления растворителя путем выпаривания, остаток экстрагировали Et<sub>2</sub>O (500 мл) и H<sub>2</sub>O (300 мл). Органический слой отделяли и сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. После фильтрации и концентрации, сырец очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (гексан: EtOAc = 1:1, R<sub>f</sub> = 0,49) с получением **3** (12,7 г, 15,1 ммоль, 94%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.66-7.68 (m, 4 H), 7.33-7.43 (m, 6 H), 3.67-3.73 (m, 1 H), 3.57-3.62 (m, 4 H), 1.82 (t, J = 5.0 Hz, 4 H), 1.10-1.51 (m, 60 H), 1.04 (s, 9 H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 6 H).

**Соединение 4:** К раствору **3** (12,6 г, 15,0 ммоль) в 1,4-диоксане (220 мл), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (70 мл), MeOH (55 мл) и H<sub>2</sub>O (55 мл) добавляли NaIO<sub>4</sub> (7,70 г, 36,0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре. Смесь экстрагировали Et<sub>2</sub>O (500 мл) и H<sub>2</sub>O (300 мл). Органический слой отделяли и сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. После фильтрации и концентрации, сырец очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (гексан: EtOAc = 9:1, R<sub>f</sub> = 0,30), получая **4** (7,98 г, 14,5 ммоль, 97%). Молекулярный вес для C<sub>35</sub>H<sub>54</sub>NaO<sub>3</sub>Si (M+Na)<sup>+</sup> Расч. 573,3740, Найденный 573,3.

**Соединение 7:** К раствору **5** (см., Tetrahedron, 63, 1140-1145, 2006; 1,09 г, 2,18 ммоль) в ТГФ (20 мл) и НМРА (4 мл), LiHMDS (1 М раствор в ТГФ, 4,36 мл, 4,36 ммоль) был добавлен при -20 °С. Полученную смесь перемешивали в течение 20 минут при той же температуре, затем охлаждали до -78 °С. Раствор **4** (500 мг, 0,908 ммоль) в ТГФ (4 мл) был добавлен. Смесь перемешали и дали нагреться до комнатной температуры в течение ночи. MS анализ показал формирование ди-кислоты (**6**; C<sub>53</sub>H<sub>85</sub>O<sub>5</sub>Si (M-H)<sup>-</sup> расч. 829,6166, наблюдаемая 829,5). К смеси, NaHCO<sub>3</sub> (1,10 г, 13,1 ммоль) и диметилсульфат (1,24 мл, 13,1 ммоль) были добавлены и перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением насыщенного водного раствора NH<sub>4</sub>Cl (50 мл), затем экстрагировали Et<sub>2</sub>O (2 x 100 мл). Органический слой отделяли и сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. После фильтрации и концентрации, сырой продукт очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (гексан: EtOAc = 9:1, R<sub>f</sub> = 0,35), получая **7** (270 мг, 0,314 ммоль, 35%). Молекулярный вес для C<sub>55</sub>H<sub>90</sub>NaO<sub>5</sub>Si (M+Na)<sup>+</sup> Расч. 881,6455, Найденный 881,6484.

**Соединение 8:** К раствору **7** (265 мг, 0,308 ммоль) в ТГФ (2,5 мл), n-TBAF (1 М раствор в ТГФ, 0,555 мл, 0,555 ммоль) был добавлен. Реакционную смесь перемешивали в течение

14 часов при 45 °С. После концентрации смесь очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (гексан: EtOAc = 3:1,  $R_f = 0,52$ ), получая **8** (155 мг, 0,250 ммоль, 81%). Молекулярный вес для  $C_{39}H_{72}NaO_5$  (M+Na)<sup>+</sup> Расч. 643,5277, Найденный 643,5273.

**Соединение 9:** К раствору соединения **8** (150 мг, 0,242 ммоль) и 4 - (диметиламино) масляной кислоты гидрохлорида (49 мг, 0,290 ммоль) в  $CH_2Cl_2$  (5 мл) добавляли диизопропилэтиламин (0,126 мл, 0,726 ммоль), N - (3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида гидрохлорид (56 мг, 0,290 ммоль) и DMAP (6 мг, 0,0484 ммоль).

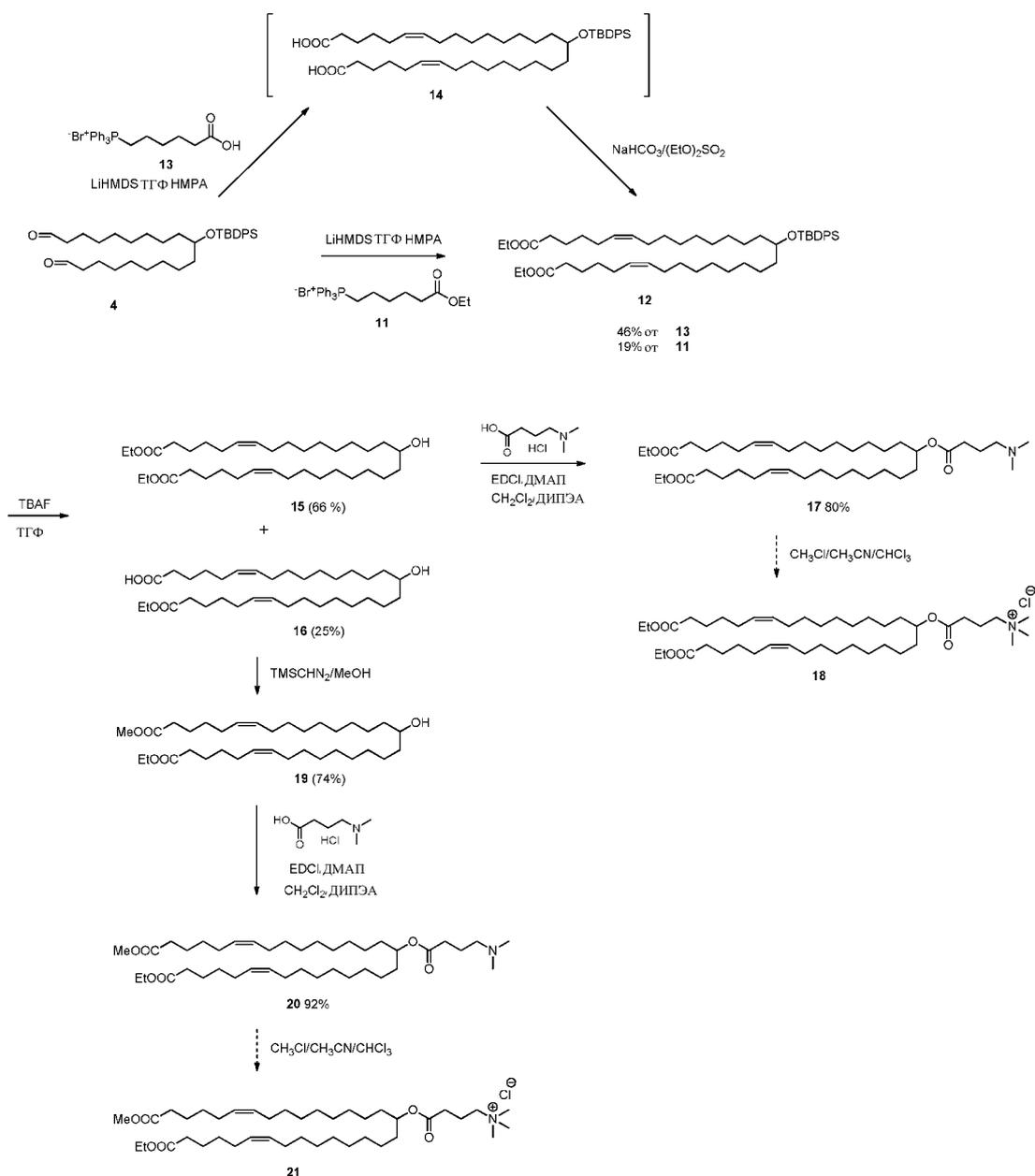
Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 14 часов. Затем реакционную смесь разбавляли  $CH_2Cl_2$  (100 мл) и промывали насыщенным водн.  $NaHCO_3$  (50 мл). Органический слой сушили над  $MgSO_4$ , фильтровали и концентрировали. Сырой продукт очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (0-5% MeOH в  $CH_2Cl_2$ ) с получением соединения **9** (121 мг, 0,165 ммоль, 68%,  $R_f = 0,25$  получен с 5% MeOH в  $CH_2Cl_2$ ). Молекулярный вес для  $C_{45}H_{84}NO_6$  (M+H)<sup>+</sup> Расч. 734,6299, Найденный 734,5.

**Соединение 10:** Получение соединения **9** с  $CH_3Cl$  в  $CH_3CN$  и  $CHCl_3$  может предоставить соединение **10**.

## Пример 2

### Схема 2

## Схема 2



**Соединение 12:** К раствору 11 (см., *J. Med. Chem.*, 38, 636-46, 1995; 1,25 г, 2,58 ммоль) в  $\text{TГФ}$  (20 мл) и  $\text{HMPA}$  (4 мл),  $\text{LiHMDS}$  (1 М  $\text{TГФ}$  раствор, 2,58 мл, 2,58 ммоль) был добавлен при  $-20^\circ\text{C}$ . Смесь перемешивали в течение 20 минут при той же температуре, затем охлаждали до  $-78^\circ\text{C}$ . Раствор 4 (500 мг, 0,908 ммоль) в  $\text{TГФ}$  (9 мл) и  $\text{HMPA}$  (0,9 мл) был добавлен. Смесь перемешивали и дали нагреться до комнатной температуры в течение ночи. Реакцию останавливали путем добавления  $\text{H}_2\text{O}$  (40 мл) и экстрагировали  $\text{Et}_2\text{O}$  (150 мл x 3). Органический слой отделяли и сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . После фильтрации и концентрации, сырой продукт очищали с помощью колоночной

хроматографии на силикагеле (гексан: EtOAc = 9:1,  $R_f = 0,35$ ), получая **12** (136 мг, 0,169 ммоль, 19%). Молекулярный вес для  $C_{51}H_{82}NaO_5Si$  (M+Na)<sup>+</sup> Расч. 825,5829, Найденный 825,5.

Использование **13** в место **5**, по методике, описанной для соединения **7**, последовало, с получением соединения **12** (135 мг, 0,168 ммоль, 46%).

**Соединение 15/ Соединение 16:** К раствору **12** (800 мг, 0,996 ммоль) в ТГФ (5 мл), н-ТВАФ (1 М раствор в ТГФ, 5 мл, 5,00 ммоль) был добавлен. Реакционную смесь перемешивали в течение 16 часов при 45 °С. После концентрации смесь очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле с получением **15** (гексан: EtOAc = 3:1,  $R_f = 0,46$ , 372 мг, 0,659 ммоль, 66%) и **16** ( $CH_2Cl_2$ : MeOH = 95:5,  $R_f = 0,36$ , 135 мг, 0,251 ммоль, 25%). Молекулярный вес **15**;  $C_{35}H_{64}NaO_5$  (M+Na)<sup>+</sup> Расч. 587,4651, Найденный 587,4652. Молекулярный вес **16**;  $C_{33}H_{61}O_5$  (M+H)<sup>+</sup> Расч. 537,4519, Найденный 537,5.

**Соединение 17:** К раствору соединения **15** (164 мг, 0,290 ммоль) и 4 - (диметиламино) масляной кислоты гидрохлорида (58 мг, 0,348 ммоль) в  $CH_2Cl_2$  (5 мл) добавляли диизопропилэтиламин (0,152 мл, 0,870 ммоль), N - (3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида хлорид (67 мг, 0,348 ммоль) и DMAP (7 мг, 0,058 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 14 часов. Реакционную смесь разбавляли  $CH_2Cl_2$  (100 мл) и промывали насыщенным водн.  $NaHCO_3$  (50 мл). Органический слой сушили над  $MgSO_4$ , фильтровали и концентрировали. Сырой продукт очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (0-5% MeOH в  $CH_2Cl_2$ ) с получением соединения **17** (158 мг, 0,233 ммоль, 80%,  $R_f = 0,24$  получен с 5% MeOH в  $CH_2Cl_2$ ). Молекулярный вес для  $C_{45}H_{84}NO_6$  (M + H) + Расч. 734,6299, Найденный 734,5.

**Соединение 18:** Обработка соединения **17** с  $CH_3Cl$  в  $CH_3CN$  и  $CHCl_3$  может привести к получению соединения **18**.

**Соединение 19:** К раствору **16** (130 мг, 0,242 ммоль) в ТГФ (2 мл) и MeOH (2 мл), триметилсилилдиазометан (2 М раствор в  $Et_2O$ , 0,158 мл, 0,315 ммоль) был добавлен. Реакционную смесь перемешивали в течение 14 часов. После выпаривания остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (гексан: EtOAc = 3:1,  $R_f = 0,50$ ), получая **19** (99 мг, 0,180 ммоль, 74%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц,  $CDCl_3$ ) δ 5.29-5.40 (m, 4

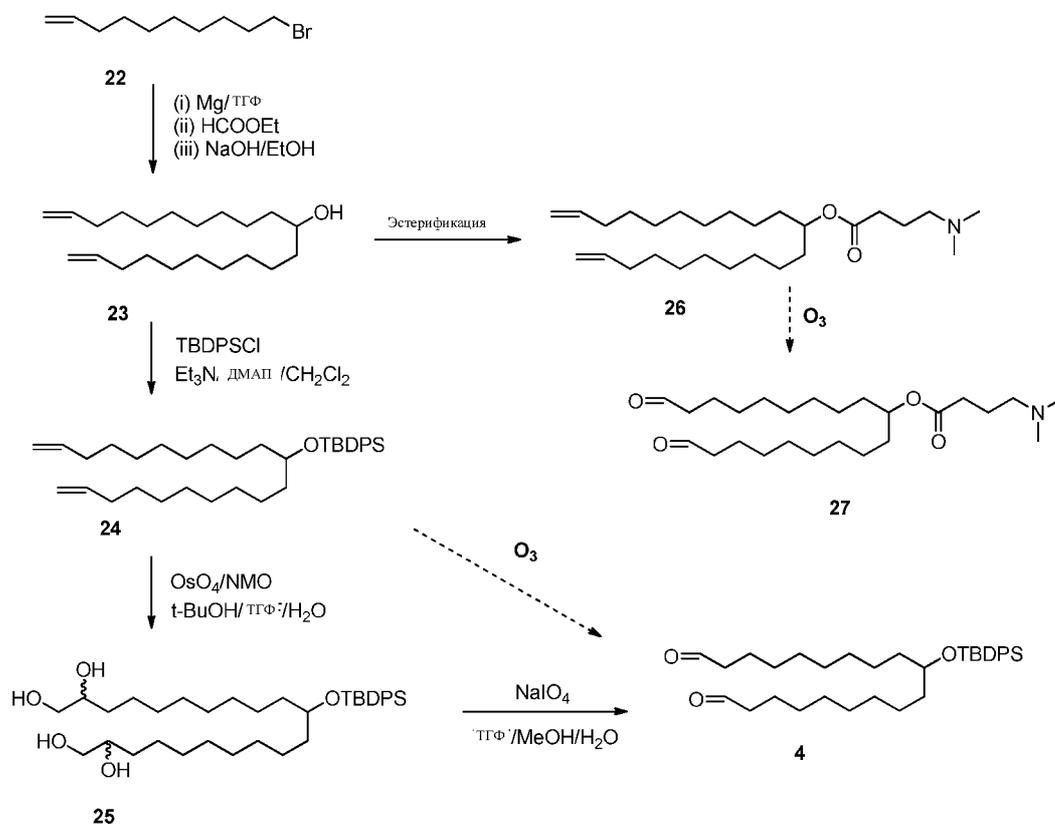
H), 4.12 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2 H), 3.66 (s, 3 H), 3.55-3.59 (m, 1 H), 2.30 (dd,  $J = 14.7, 7.2$  Hz, 4 H), 1.98-2.07 (m, 8 H), 1.60-1.68 (m, 4 H), 1.23-1.43 (m, 37 H).

**Соединение 20:** К раствору соединения **19** (95 мг, 0,168 ммоль) и 4 - (диметиламино) масляной кислоты гидрохлорида (42 мг, 0,252 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 мл) добавляли диизопропилэтиламин (0,088 мл, 0,504 ммоль), N - (3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида гидрохлорид (48 мг, 0,504 ммоль) и DMAP (4 мг, 0,034 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 14 часов. Реакционную смесь разбавляли  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 мл) и промывали насыщенным водн.  $\text{NaHCO}_3$  (50 мл). Органический слой сушили над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и концентрировали. Сырой продукт очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (0-5% MeOH в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) с получением соединения **20** (103 мг, 0,155 ммоль, 92%,  $R_f = 0,19$  получен с 5% MeOH в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.29-5.40 (m, 4 H), 4.83-4.89 (m, 1 H), 4.12 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2 H), 3.67 (s, 3 H), 2.28-2.34 (m, 8 H), 2.23 (s, 6 H), 1.98-2.07 (m, 8 H), 1.76-1.83 (m, 2 H), 1.60-1.68 (m, 4 H), 1.23-1.51 (m, 35 H).

**Соединение 21:** Обработка соединения **20** с  $\text{CH}_3\text{Cl}$  в  $\text{CH}_3\text{CN}$  и  $\text{CHCl}_3$  может привести к получению соединения **21**. **Пример 3:** Альтернативный синтез для ди-альдегида промежуточного соединения **4**

**Схема 3**

## Схема 3

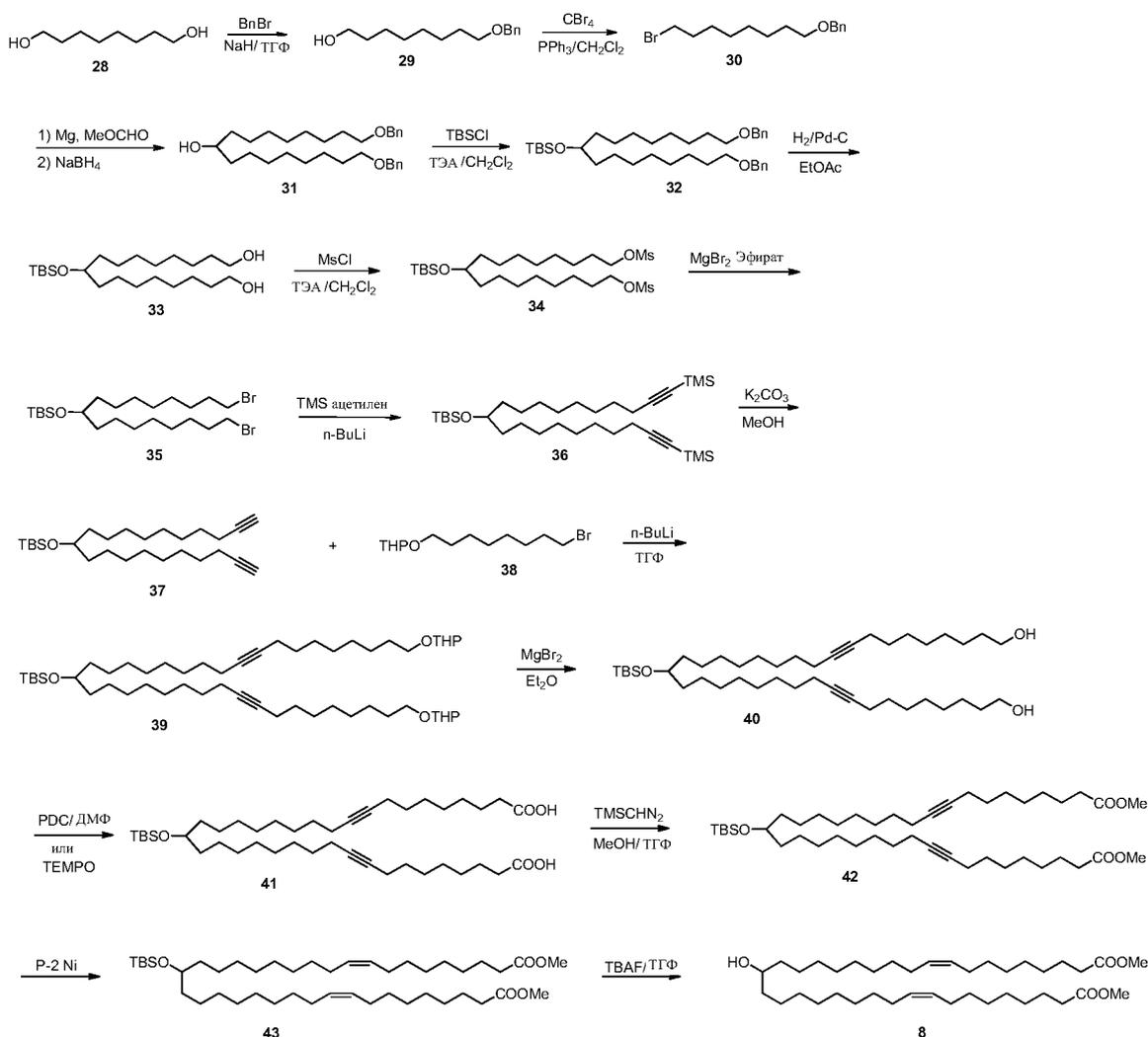


Ди-альдегид **4** может быть синтезирован как показано на Схеме 3, используя 1-бром-9-децен. Ди-альдегид содержащий головную группу **27** может быть полезным для синтеза терминальных эфир-замещенных липидов, используя, например, реакцию Виттига. Озонолиз может привести к получению ди-альдегида **4** и **27**.

Пример 4: Альтернативные синтезы для соединения **8**

## Схема 4

## Схема 4



Соединение **8** может быть синтезировано, как показано на Схеме 4.

**Соединение 29:** К перемешанной суспензии NaH (60% в масле, 82 г, 1,7096 моль) в 500 мл безводного ДМФ, раствор соединения **28** (250 г, 1,7096 моль) в 1,5 л ДМФ медленно, используя капельную воронку, был добавлен при 0 °С. Реакционную смесь перемешивали в течение 30 минут, затем бензилбромид (208,86 мл, 1,7096 моль) медленно добавляли в атмосфере азота. Затем реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 10 часов. Затем смесь охлаждали колотым льдом (~ 2 кг) и экстрагировали этилацетатом (2 x 1 л). Органический слой промывали водой (1л), чтобы удалить нежелательный ДМФ, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали досуха в вакууме. Неочищенное соединение очищали на 60-120 силикагеле, элюент 0-5% MeOH в DCM с получением соединения **29** (220 г, 54%) в виде бледно-желтой жидкости. <sup>1</sup>H ЯМР (400

MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.33-7.24 (m, 5 H), 4.49 (s, 2 H), 3.63-3.60 (m, 2 H), 3.47-3.43 (m, 2 H), 1.63-1.51 (m, 4 H), 1.39-1.23 (m, 8 H).

**Соединение 30:** Соединение **29** (133 г, 0,5635 моль) растворяли в 1,5 л DCM, CBr<sub>4</sub> (280,35 г, 0,8456 моль) добавляли при перемешивании раствора и реакционную смесь охлаждали до 0 °С в атмосфере инертного газа. PPh<sub>3</sub> (251,03 г, 0,9571 моль) затем добавляли порциями, поддерживая температуру ниже 20 °С. После завершения добавления реакционную смесь перемешивали в течение 3 часов при комнатной температуре. После завершения реакции твердый (PPh<sub>3</sub>O), который осаждали из реакционной смеси, удаляли фильтрацией и фильтрат разбавляли с колотым льдом (~ 1,5 кг) и экстрагировали DCM (3 x 750 мл). Органический слой отделяли, сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и перегоняли в вакууме. Полученное сырое соединение хроматографировали на 60-120 меш колонке с силикагелем с использованием 0-5% этилацетата в гексане в качестве элюента системы с получением соединения **30** (150 г, 89%) в виде бледно-желтой жидкости. <sup>1</sup>H ЯМР (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.33-7.25 (m, 5 H), 4.49 (s, 2 H), 3.47-3.41 (m, 2 H), 3.41-3.37 (m, 2 H), 1.86-1.80 (m, 4 H), 1.62-1.56 (m, 2 H), 1.42-1.29 (m, 8 H).

**Соединение 31:** К свежеактивированной Mg стружке (24,08 г, 1,003 моль) добавляют 200 мл безводного ТГФ, с последующим добавлением щепотки йода в смесь в инертной атмосфере. Раствор соединения **30** (150 г, 0,5016 моль) в 1 л сухого ТГФ медленно, контролируя экзотермическую реакцию, был добавлен. Затем реакционную смесь кипятили в течение 1 часа, затем охлаждали до комнатной температуры. Метилформиат (60,24 г, 1,0033 моль) затем медленно добавляли и реакция продолжалась в течение 2 часов. После завершения реакцию остановили медленным добавлением 10% HCl, а затем водой (1 л) и экстрагировали этилацетатом (3 x 1 л). Органический слой был делюирован в 5-литровый стакан, разбавлен 500 мл метанола и охлажден до 0 °С. К этому раствору избыток NaBH<sub>4</sub> (~ 5eq) был добавлен частями для обеспечения гидролиза эфиров муравьиной кислоты, которые не расщепляются при добавлении HCl. Полученный раствор перемешивали в течение часа, а затем летучий компонент удаляли под вакуумом. Остаток промывали в воде (1 л) и подкисляли 10% раствором HCl (pH 4). Затем продукт экстрагировали этилацетатом (3 x 1 л). Органическую фазу затем сушили и концентрировали на роторном испарителе с получением желаемого соединения **31** (57 г, 24%) в виде твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.35-7.32 (m, 8 H), 7.29-7.24 (m, 2 H), 4.49 (s, 4 H), 3.56 (m, 1 H), 3.46-3.43 (m, 4 H), 1.63-1.56 (m, 4 H), 1.44-1.34 (m, 28 H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 138.56, 128.21, 127.49, 127.34, 72.72, 71.76, 70.37, 37.37, 29.64, 29.56, 29.47, 29.33, 26.07, 25.54.

**Соединение 32:** Соединение **31** (56 г, 0,1196 моль) растворяли в 700 мл сухого ТГФ и охлаждали до 0 °С. TBSCl (36,06 г, 0,2396 моль) медленно добавляли, с последующим добавлением имидазола (32,55 г, 0,4786 моль) в инертной атмосфере. Затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. После завершения реакцию останавливали льдом (~ 1 кг) и экстрагировали этилацетатом (3 x 500 мл). Органический слой отделяли, промывали насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> для удаления кислотных примесей, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали при пониженном давлении с получением неочищенного соединения, которое очищали на силикагеле (60-120 меш) и элюировали 0 - 10% этилацетата в гексане, получая (60 г, 82%) соединения **32** в виде желтоватого масла. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.33-7.24 (m, 10 H), 4.49 (s, 4 H), 3.60-3.57 (m, 1 H), 3.46-3.43 (m, 4 H), 1.61-1.54 (m, 4 H), 1.41-1.26 (m, 28 H), 0.87 (s, 9 H), 0.02 (s, 6 H).

**Соединение 33:** Соединение **32** (60 г, 0,1030 моль) растворяли в 500 мл этилацетата и дегазировали с N<sub>2</sub> в течение 20 минут. Добавляли (10% по массе) Pd на угле (12 г) и реакционную смесь перемешивали в атмосфере водорода в течение 18 часов. После завершения смесь фильтровали через слой целита и промывали этилацетатом. Фильтрат упаривают в вакууме, получая соединение **33** (19 г, 46%), которое было достаточно чистым для использования в следующей синтетической последовательности. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 3.64-3.58 (m, 5 H), 1.59 (br, 2 H), 1.57-1.51 (m, 4 H), 1.38-1.22 (m, 28 H), 0.87 (s, 9 H), 0.02 (s, 6 H).

**Соединение 34:** Соединение **33** (8,2 г, 0,0199 моль) растворяли в 100 мл сухого DCM и охлаждали до 0 °С. TEA (22,14 мл, 0,1592 моль) добавляли в инертной атмосфере. После перемешивания смеси в течение 5 минут, мезилхлорид (4,6 мл, 0,059 моль) по каплям добавляли и реакционную смесь, перемешивали еще в течение 3 часов. После завершения реакции смесь останавливали льдом (~ 200 г) и экстрагировали DCM (3 x 75 мл). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и выпаривали, получая сырое соединение, которое очищали на 60-120 меш колонке с силикагелем с использованием 0-30% этилацетата в гексане в качестве элюента системы с получением соединения **34** (8,2 г, 73% ) в виде бледно-желтой жидкости. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 4.22-4.19 (m, 4 H), 3.60-3.58 (m, 1 H), 2.99 (s, 6 H), 1.75-1.69 (m, 4 H), 1.38-1.28 (m, 28 H), 0.86 (s, 9 H), 0.02 (s, 6 H).

**Соединение 35:** К раствору соединения **34** (8,2 г, 0,0146 моль) в 400 мл сухого эфира добавляли MgBr<sub>2</sub>·Et<sub>2</sub>O (22,74 г, 0,08817 моль) порциями при 0 °С в атмосфере азота. После завершения добавления реакционную смесь кипятили в течение 28 часов. После

завершения реакции, неорганический материал, образованный в реакции, удаляли путем фильтрации. Фильтрат выпаривали и полученное сырое соединение очищали на 60-120 меш колонке с силикагелем с использованием 0-3% этилацетата в гексане в качестве элюента системы с получением соединения **35** (6,6 г, 85%) в виде бесцветной жидкости.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 3.61\text{-}3.58$  (m, 1 H), 3.41-3.37 (t, 4 H,  $J = 6.8$  Hz), 1.87-1.80 (m, 4 H), 1.42-1.25 (m, 24 H), 0.87 (s, 9 H), 0.012 (s, 6 H).

**Соединение 36:** Раствор этинил триметил силана (5,3 мл, 0,0378 моль) в 60 мл сухого ТГФ охлаждали до  $-78$  °С и 1,4 М *n*-BuLi (23 мл, 0,03405 моль) в гексане медленно добавляли в инертной атмосфере. Реакционную смесь перемешивали в течение 10 минут, затем НМРА (2,3 г, 0,01324 моль) добавляли и полученную смесь перемешивали в течение 2 часов при  $0$  °С, затем охлаждали до  $-78$  °С. К этому раствору добавляли медленно соединение **35** (5 г, 0,0094 моль) в 60 мл сухого ТГФ и после полного добавления реакцию смесь нагревали до комнатной температуры и выдерживали в течение 18 часов. Реакционный прогресс контролировался  $^1\text{H}$  ЯМР. После завершения реакции смесь охлаждали до  $0$  °С и останавливали осторожным добавлением насыщенного раствора  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (50 мл), затем воды (200 мл). Водную фазу экстрагировали гексаном (3 x 250 мл). Органический слой сушили и растворитель удаляли в вакууме с получением соединения **36** (5 г, 94%), которое использовали без дальнейшей очистки.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 3.62\text{-}3.56$  (m, 1 H), 2.21-2.17 (m, 4 H), 1.49-1.47 (m, 4 H), 1.37-1.26 (m, 24 H), 0.87 (s, 9 H), 0.13 (s, 18 H), 0.021 (s, 6 H).

**Соединение 37:** К раствору соединения **36** (5 г, 0,0088 моль) в 50 мл метанола, добавляли  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (6,1 г, 0,044 моль) в одной порции и полученную смесь перемешивали в течение 18 часов при комнатной температуре. Летучую часть удаляли на роторном испарителе и неочищенную смесь разбавляли 100 мл воды и экстрагировали гексаном (3 x 100 мл). Органический слой сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали в вакууме с получением соединения **37** (3,5 г, 97%), которое использовали без дополнительной очистки.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 3.60\text{-}3.58$  (m, 1 H), 2.19-2.14 (m, 4 H), 1.93-1.92 (m, 2 H), 1.54-1.49 (m, 4 H), 1.37-1.27 (m, 24 H), 0.87 (s, 9 H), 0.02 (s, 6 H).

**Соединение 39:** Соединение **37** (2,5 г, 0,00598 моль) растворяли в 25 мл сухого ТГФ и охлаждали до  $-40$  °С. *n*-BuLi (1,4 М в гексане 12,9 мл, 0,01794 моль) медленно добавляли, затем, после 10-минутного интервала, путем медленного добавления НМРА (25 мл). Полученную смесь выдерживали в течение 30 минут при  $-40$  °С в атмосфере азота. Раствор соединения **38** (3,5 г, 1,01196 моль) в 25 мл сухого ТГФ добавляли по каплям к охлажденной реакционной смеси. Полученную смесь нагревали до комнатной

температуры в течение 2 часов, затем перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. Затем смесь останавливали добавлением насыщенного раствора  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (~ 50 мл) и продукт экстрагировали этилацетатом (3 × 50 мл). Растворитель удаляли на роторном испарителе и полученный сырой продукт очищали на колонке силикагеля (100-200 меш), используя 0-3% этилацетата в дихлорметане в качестве элюента системы с получением соединения **39** (0,9 г, 18%) в виде желтого масла.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 4.56-4.55 (m, 2 H), 3.87-3.83 (m, 2 H), 3.74-3.68 (m, 2 H), 3.59-3.57 (m, 1 H), 3.49-3.46 (m, 2 H), 3.39-3.33 (m, 2 H), 2.13-2.10 (m, 8 H), 1.87-1.75 (m, 2 H), 1.74-1.66 (m, 2 H), 1.57-1.42 (m, 20 H), 1.40-1.19 (m, 40 H), 0.87 (s, 9 H), 0.02 (s, 6 H).

**Соединение 40:** К раствору соединения **39** (504 мг, 0,598 ммоль) в 10 мл сухого эфира добавляли  $\text{MgBr}_2 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (926 мг, 3,59 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 14 часов, затем останавливали добавлением насыщенного водного раствора  $\text{NaHCO}_3$ . Продукт экстрагировали  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Органический слой сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали. Сырой продукт очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле с получением соединения **40** (307 мг, 0,455 ммоль, 76%,  $R_f = 0,36$  получен с гексаном:  $\text{EtOAc} = 2:1$ ).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.59-3.66 (m, 5 H), 2.14 (t,  $J = 6.6$  Hz, 8 H), 1.21-1.59 (m, 52 H), 0.88 (s, 9 H), 0.03 (s, 6 H).

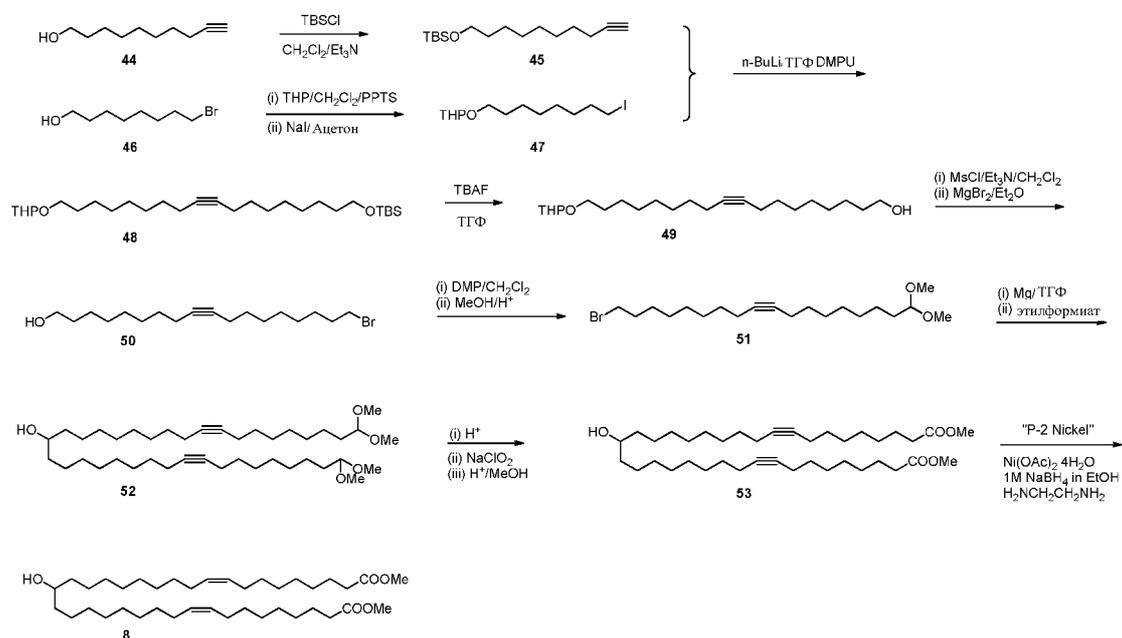
**Соединение 41:** К раствору **40** (180 мг, 0,267 ммоль) в безводном ДМФ (5 мл) добавляли пиридина дихромат (603 мг, 1,60 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 48 часов. После разбавления водой (20 мл), смесь экстрагировали  $\text{Et}_2\text{O}$  (3 × 40 мл). Органический слой сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали. Сырой продукт очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле с получением соединения **41** (53 мг, 0,075 ммоль, 28%,  $R_f = 0,25$  получен с  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :  $\text{MeOH}$ : уксусная кислота = 95:4,5:0,5). Молекулярный вес для  $\text{C}_{43}\text{H}_{77}\text{O}_5\text{Si}$  (M-H)<sup>-</sup> Расч. 701,5540, Найденный 701,5. Это соединение может быть синтезировано посредством TEMPO окисления.

**Соединение 42:** Процедура, аналогичная описанной для соединения **19**, дает соединение **42** (23 мг 0,032 ммоль, 21% из соединения **40**).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.67 (s, 6 H), 3.59-3.62 (m, 1 H), 2.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 4 H), 2.13 (t,  $J = 6.8$  Hz, 8 H), 1.27-1.64 (m, 48 H), 0.88 (s, 9 H), 0.03 (s, 6 H).

Ограниченное использование условий P-2 никеля может дать соединение **43** и последующее снятие защиты посредством TBAF может привести к получению соединения **8**.

### Пример 5: Альтернативные синтезы для соединения 8

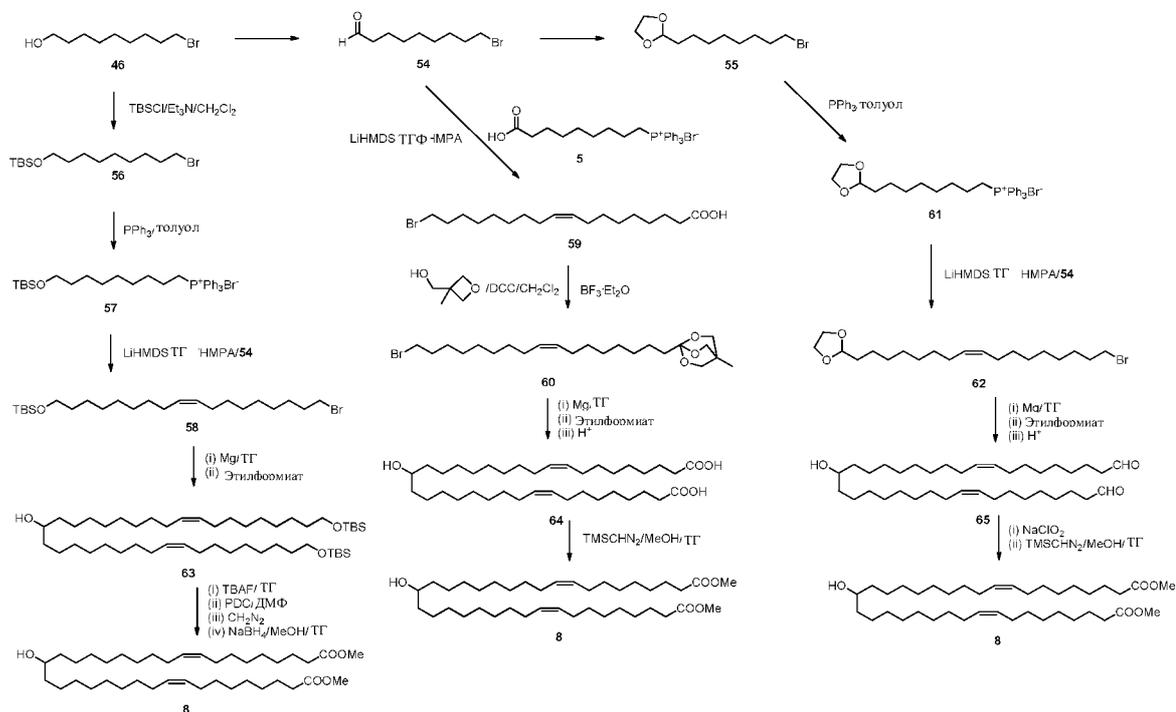
#### Схема 5



Соединение **8** может быть синтезировано, как показано на Схеме 5. Бромид **51** может быть преобразован в этот реактив Гриньяра и в сочетании с этилформиатом даст соединение **52**. Последующая обработка кислотой, окисление и восстановление может дать соединение **8**.

### Пример 6: Альтернативные синтезы для соединения 8

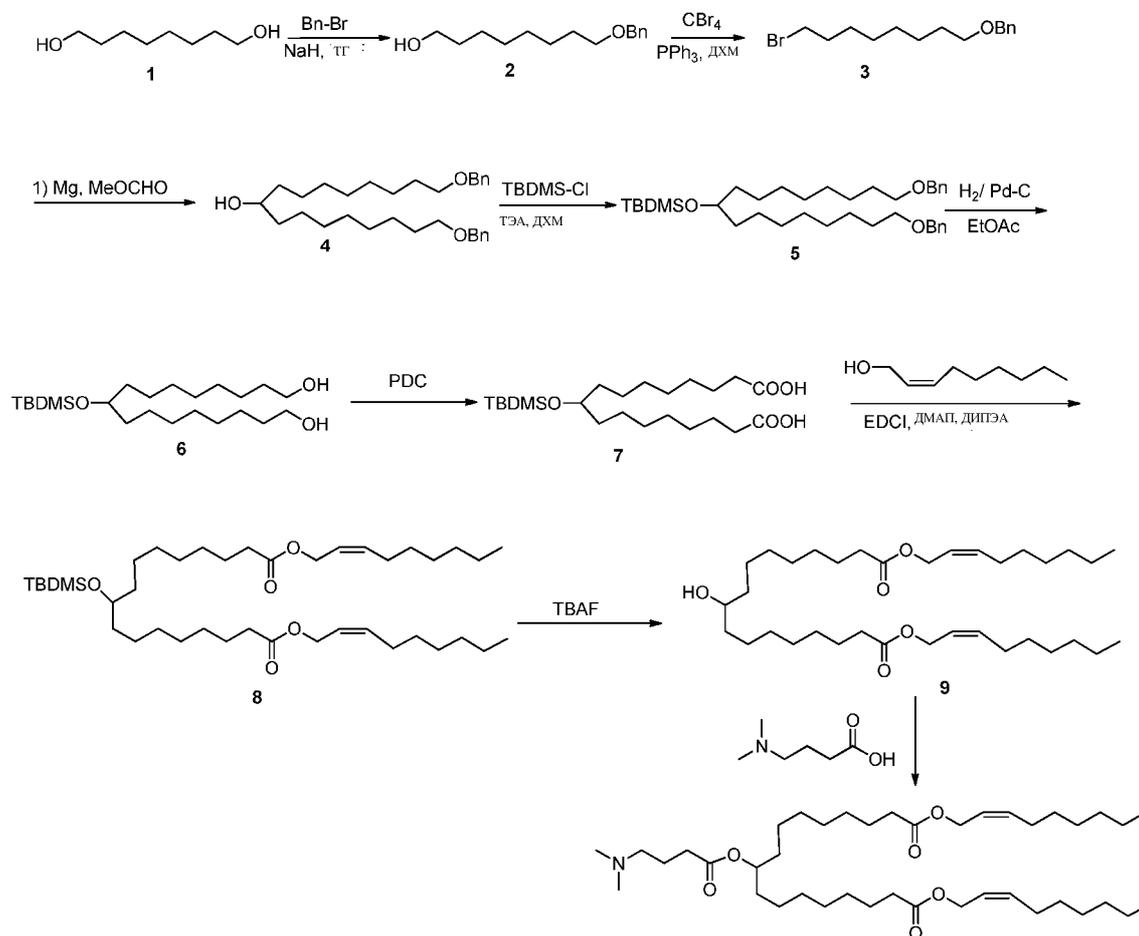
#### Схема 6



Соединение **8** может быть синтезировано, как показано на Схеме 6. Бромиды эфиров соединений **58**, **60** или **62** могут взаимодействовать с этилформиатом для создания терминально- функциональной ди-олефинной цепи. Соединение **8** может быть получено из ди-олефинной цепи соединений с использованием стандартных химических реакций.

## Пример 7

## Схема 7:

**Синтез 8-бензилокси-октан-1-ола (2):**

К перемешанной суспензии NaH (60% в масле, 82 г, 1,7096 моль) в 500 мл безводного ДМФ добавляли раствор соединения **1** (250 г, 1,7096 моль) в 1,5 л ДМФ медленно, используя капельную воронку при 0 °С. Реакционную смесь перемешивали в течение 30 минут, затем бензилбромид (208,86 мл, 1,7096 моль) медленно добавляли в атмосфере азота. Затем реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 10 часов. После завершения реакции смесь останавливали с колотым льдом (~ 2 кг) и экстрагировали этилацетатом (2 x 1 л). Органический слой промывают водой (1л), чтобы удалить нежелательный ДМФ, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали досуха в вакууме. Неочищенное соединение очищали на 60-120 силикагеле, элюент 0-5% MeOH в DCM с получением соединения **2** (220 г, 54%) в виде бледно-желтой жидкости. <sup>1</sup>H ЯМР (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.33-7.24 (m, 5H), 4.49 (s, 2H), 3.63-3.60 (m, 2H), 3.47-3.43 (m, 2H), 1.63-1.51 (m, 4H), 1.39-1.23 (m, 8H).

**Синтез (8-бром-октилоксиметил)-бензола (3):** Соединение **2** (133 г, 0,5635 моль) растворяли в 1,5 л DCM,  $\text{CBr}_4$  (280,35 г, 0,8456 моль) добавляли к нему при перемешивании раствора и реакционную смесь охлаждали до 0 °С в атмосфере инертного газа.  $\text{PPh}_3$  (251,03 г, 0,9571 моль) затем добавляли порциями, поддерживая температуру ниже 20 °С и после завершения добавления реакционную смесь перемешивали в течение 3 часов при комнатной температуре. После завершения реакции твердое вещество ( $\text{PPh}_3\text{O}$ ), выпавшее в осадок из реакционной смеси, было выделено фильтрацией, при этом фильтрат разбавляли с колотым льдом (~ 1,5 кг) и экстрагировали DCM (3 x 750 мл). Органический слой отделяли, сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и перегоняли в вакууме. Полученное сырое соединение хроматографировали на 60-120 меш на колонке с силикагелем с использованием 0-5% этилацетата в гексане в качестве системы элюента с получением соединения **3** (150 г, 89%) в виде бледно-желтой жидкости.  $^1\text{H}$  ЯМР (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.33\text{-}7.25$  (m, 5H), 4.49 (s, 2H), 3.47-3.41 (m, 2H), 3.41-3.37 (m, 2H), 1.86-1.80 (m, 4H), 1.62-1.56(m, 2H), 1.42-1.29 (m, 8H).

**Синтез 1, 17-бис-бензилокси-гептадекан-9-ола (4):**

К свежеективированной стружке Mg (24,08 г, 1,003 моль) добавляли 200 мл безводного ТГФ, с последующим добавлением щепотки йода к смеси в инертной атмосфере. После начала формирования реактива Гриньяра раствор соединения **3** (150 г, 0,5016 моль) в 1 л сухого ТГФ медленно добавляли для контроля экзотермической реакции. После завершения добавления реакционную смесь кипятили в течение 1 часа, затем охлаждали до комнатной температуры. Метилформиат (60,24 г, 1,0033 моль) затем добавляли медленно и реакция продолжалась в течение 2 часов. После завершения реакцию останавливали медленным добавлением 10% HCl, а затем воды (1 л) и экстрагировали этилацетатом (3 x 1 л). Органический слой был декантирован в 5-литровый стакан, его разбавляли 500 мл метанола и охлаждали до 0 °С. К этому раствору добавляли избыток  $\text{NaBH}_4$  (~ 5eq) для обеспечения гидролиза эфира муравьиной кислоты, который не расщепляется при добавлении HCl. Полученный раствор перемешивали в течение часа, а затем летучую часть удаляли под вакуумом. Остаток промывали в воде (1 л) и подкисляли 10% раствором HCl (pH 4). Затем продукт экстрагировали этилацетатом (3 x 1 л). Органическую фазу затем сушили и концентрировали на роторном испарителе с получением соединения **4** (57 г, 24%) в виде твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta = 7.35-7.32$  (m, 8H),  $7.29-7.24$  (m, 2H),  $4.49$  (s, 4H),  $3.56$  (m, 1H),  $3.46-3.43$  (m, 4H),  $1.63-1.56$  (m, 4H),  $1.44-1.34$  (m, 28H).  $C^{13}$  NMR (100MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 138.56, 128.21, 127.49, 127.34, 72.72, 71.76, 70.37, 37.37, 29.64, 29.56, 29.47, 29.33, 26.07, 25.54$ .

**Синтез [9-бензилокси-1-(8-бензилокси-октил)-нонилокси]-трет-бутил-диметил-силана (5):**

Соединение **4** (56 г, 0,1196 моль) растворяли в 700 мл безводного ТГФ и охлаждали до 0 °С. TBMS -Cl (36,06 г, 0,2396 моль) медленно добавляли с последующим добавлением имидазола (32,55 г, 0,4786 моль) в инертной атмосфере. Затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов, затем останавливали со льдом (~ 1 кг). Продукт экстрагировали этилацетатом (3 x 500 мл). Органический слой отделяли, промывали насыщенным раствором  $NaHCO_3$  для удаления кислых примесей, сушили над  $Na_2SO_4$  и упаривали при пониженном давлении с получением неочищенного соединения, которое очищали на силикагеле (60-120 меш) и элюировали 0 - 10% этилацетатом в гексане, получая (60 г, 82%) соединение **5** в виде желтоватого масла.  $H^1$  ЯМР (400MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 7.33-7.24$  (m, 10H),  $4.49$  (s, 4H),  $3.60-3.57$  (m, 1H),  $3.46-3.43$  (m, 4H),  $1.61-1.54$  (m, 4H),  $1.41-1.26$  (m, 28H),  $0.87$  (s, 9H),  $0.02$  (s, 6H).

**Синтез 9 - (трет-бутил-диметил-силанилокси)-гептадекан-1,17-диола (6):**

Соединение **5** (60 г, 0,1030 моль) растворяли в 500 мл этилацетата и дегазировали  $N_2$  в течение 20 мин. Добавляли (10% по массе) Pd на угле (12 г) и реакционную смесь перемешивали в атмосфере водорода в течение 18 часов. После завершения смесь фильтровали через слой целита и промывали этилацетатом. Фильтрат выпаривали в вакууме. Соединение **6** (19 г, 46%), полученное таким образом, было достаточно чистым для проведения последующей реакции.  $H^1$  ЯМР (400MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 3.64-3.58$  (m, 5H),  $1.59$  (br, 2H),  $1.57-1.51$  (m, 4H),  $1.38-1.22$  (m, 28H),  $0.87$  (s, 9H),  $0.02$  (s, 6H).

**Синтез 9 - (трет-бутил-диметил-силанилокси)-гептадекандиоивой кислоты (7):**

К раствору **6** (2 г, 0,0049 моль) в безводном ДМФ (40 мл) добавляли пиридин бихромат (2,7 г, 0,0074 моль) при 0 °С в атмосфере инертного газа. Затем реакционную смесь нагревали до комнатной температуры в течение 10-15 минут и продолжали реакцию в течение 24 часов. Затем реакционную смесь разбавляли водой (100 мл). Водную фазу экстрагировали DCM (3 x 40 мл). Органическую фазу промывали рассолом (1x 25 мл) и концентрировали в вакууме с получением неочищенной кислоты, которую затем

очищали (100-200 меш) на колонке с силикагелем, используя систему 0-30% этилацетата в гексане. Чистый продукт (**7**) был получен (0,7 г, 33%) в виде бледно-желтого масла.

$^1\text{H}$  ЯМР (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 3.61-3.56 (m, 1H), 2.35-2.32 (m, 4H), 1.64-1.59 (m, 4H), 1.40-1.19 (m, 24H), 0.86 (s, 9H), 0.017 (s, 6H); LC-MS [M+H] - 431.00; HPLC (ELSD) purity – 96.94%

### Синтез ди ((*Z*)-нон-2-ен-1-ил) **9** - ((трет-бутилдиметилсилил)окси)гептадекандиоата (**8**)

Дикислоту **7** (0,42 г, 0,97 ммоль) растворяли в 20 мл дихлорметана и к нему добавляли цис-2-нонен-1-ол (0,35 г, 2,44 ммоль) с последующим добавлением основания Хюнига (0,68 г, 4,9 ммоль) и DMAP (12 мг). К этой смеси добавляли EDCI (0,47 г, 2,44 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Затем реакционную смесь разбавляли  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (40 мл) и промывали насыщенным  $\text{NaHCO}_3$  (50 мл), водой (60 мл) и рассолом (60 мл). Объединенные органические слои сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и растворитель удаляли в вакууме. Сырой полученный таким образом продукт очищали с помощью Combiflash Rf системы очистки (40 г силикагеля, 0-10% MeOH в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) с получением чистого продукта **8** (0,35 г, 53%) в виде бесцветного масла.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$   $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.64 (dt,  $J$  = 10.9, 7.4 Hz, 2H), 5.58 – 5.43 (m, 2H), 4.61 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 4H), 3.71 – 3.48 (m, 1H), 2.30 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 4H), 2.20 – 1.98 (m, 4H), 1.71 – 1.53 (m, 4H), 1.31 (ddd,  $J$  = 8.3, 7.0, 3.7 Hz, 34H), 1.07 – 0.68 (m, 14H), 0.02 (s, 5H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  178.18, 139.81, 127.78, 81.73, 81.42, 81.10, 76.72, 64.59, 41.52, 41.32, 38.76, 36.09, 34.10, 33.93, 33.80, 33.70, 33.59, 33.55, 33.26, 31.95, 30.34, 29.69, 29.58, 29.39, 27.01, 22.56, 18.48, 0.01.

### Синтез ди ((*Z*)-нон-2-ен-1-ил) **9**-гидроксигептадекандиоата (**9**)

Силильный защищенный диэфир **8** (0,3 г, 0,44 ммоль) растворяли в 1 М растворе TBAF в ТГФ (6 мл) и раствор выдерживали при 40 °С в течение двух дней. Реакционную смесь разбавляли водой (60 мл) и экстрагировали эфиром (2 x 50 мл). Объединенные органические слои концентрировали и полученный таким образом сырой продукт очищали с помощью колоночной хроматографии, чтобы выделить чистый продукт (0,097 г, 39%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.64 (dt,  $J$  = 10.9, 7.4 Hz, 2H), 5.52 (dt,  $J$  = 11.0, 6.8 Hz, 2H), 4.61 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 4H), 3.57 (s, 1H), 2.30 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 4H), 2.09 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 4H), 1.75 – 1.53 (m, 4H), 1.53 – 1.06 (m, 36H), 0.88 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  173.98, 135.64, 123.57, 77.54, 77.22, 76.91, 72.14, 60.41, 37.69, 34.54, 31.89, 29.70, 29.60, 29.44, 29.29, 29.07, 27.76, 25.80, 25.15, 22.82, 14.29.

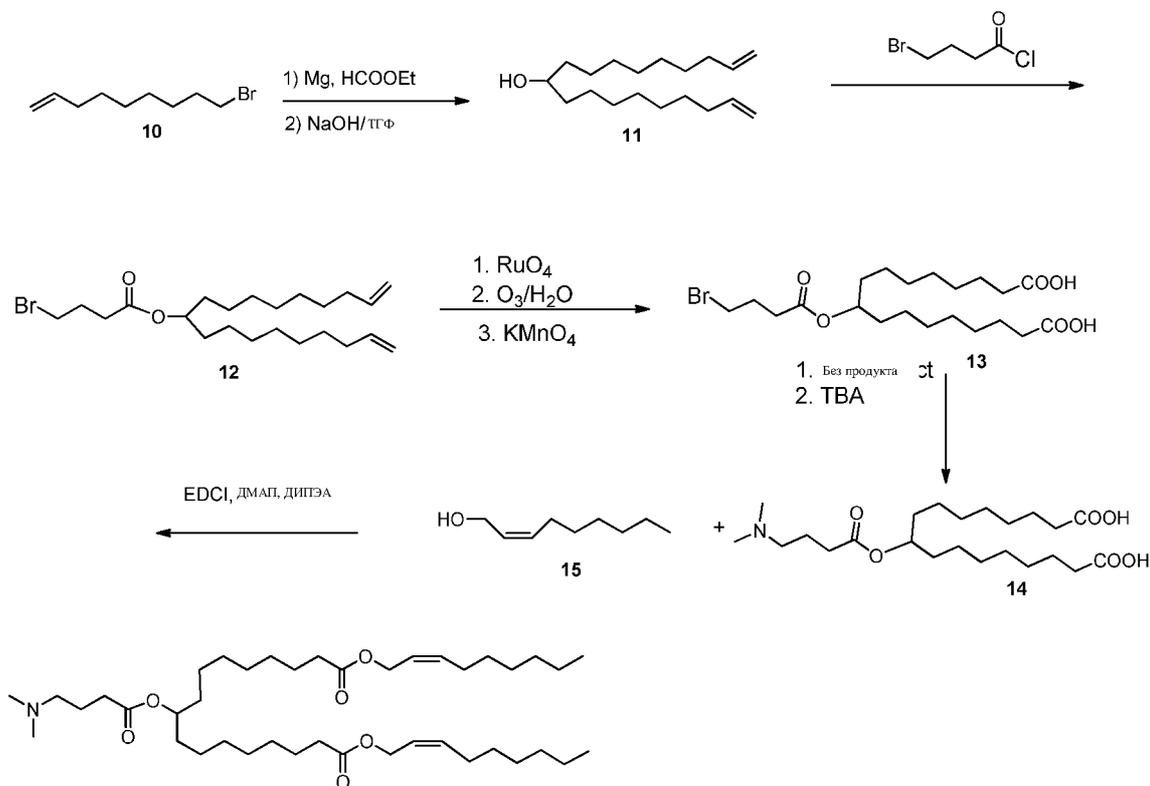
**Синтез ди ((Z)-нон-2-ен-1-ил) **9** - ((4 - (диметиламино)бутаноил)окси) гептадекандиоата**

Спирт **9** (0,083 г, 0,147 ммоль) растворяли в 20 мл дихлорметана и к нему добавляли диметиламиномасляной кислоты гидрохлорид (0,030 г, 0,176 ммоль) с последующим добавлением основания Хюнига (0,045 г, 0,44 ммоль) и DMAP (2 мг). К этой смеси добавляли EDCI (0,034 г, 0,176 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи и TLC (силикагель, 10% MeOH в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) показал полное исчезновение исходного спирта. Реакционную смесь разбавляли CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 мл) и промывали насыщенным NaHCO<sub>3</sub> (50 мл), водой (60 мл) и рассолом (60 мл). Объединенные органические слои сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и растворитель удаляли в вакууме. Сырой полученный таким образом продукт очищали с помощью Combiflash Rf системы очистки (40 г силикагеля, 0-10% MeOH в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), чтобы изолировать чистый продукт (0,062 г, 62%) в виде бесцветного масла. <sup>1</sup>H ЯМР (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5.74 – 5.58 (m, 2H), 5.51 (dt, *J* = 9.7, 6.8, 1.3 Hz, 2H), 4.95 – 4.75 (m, 1H), 4.61 (d, *J* = 6.8 Hz, 4H), 2.35 – 2.24 (m, 8H), 2.22 (d, *J* = 7.9 Hz, 6H), 2.09 (q, *J* = 6.9 Hz, 4H), 1.83 – 1.72 (m, 2H), 1.60 (dd, *J* = 14.4, 7.2 Hz, 4H), 1.49 (d, *J* = 5.7 Hz, 4H), 1.41 – 1.13 (m, 30H), 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  173.72, 173.36, 135.40, 123.35, 74.12, 60.18, 58.95, 45.46, 34.30, 34.11, 32.45, 31.67, 29.38, 29.35, 29.17, 29.07, 28.84, 27.53, 25.28, 24.93, 23.16, 22.59, 14.06. MW расч. для C<sub>41</sub>H<sub>75</sub>NO<sub>6</sub> (MН<sup>+</sup>): 678,04, найд: 678,5.

**Пример 8**

Следующий короткий маршрут может быть использован для синтеза Соединения 1 настоящего изобретения. Коммерческий 9-бромонон-1-ен **10**, обработанный с магнием с образованием соответствующего реагента Гриньяра, который взаимодействует с этилформиатом с получением соответствующего аддукта **11**, который при взаимодействии с бромобутирил хлоридом обеспечивает бромэфир **12**. Бромэфир **12** при взаимодействии с RuO<sub>4</sub> дает дикислоту **13**. Бромодикислота **13** при взаимодействии с диметиламином дает аминокислоту **14**. Аминокислота **14** при связывании со спиртом **15** дает продукт с хорошими выходами.

## Схема 8



## Синтез нонадека-1,18-диен-10-ола (11)

На открытом пламени сушат 500 мл RB колбу, свежеактивированную Mg стружку (9 г) помещают в колбу, снабженную магнитной мешалкой, капельной воронкой и обратным холодильником. Эта установка была дегазирована и промыта аргоном и 100 мл безводного эфира добавили в колбу с помощью шприца. Бромид **3** (51,3 г, 250 ммоль) растворили в безводном эфире (100 мл) и добавили в капельную воронку. Около 5 мл этого эфирного раствора добавили к Mg стружке при интенсивном перемешивании. Экзотермическая реакция была замечена (для подтверждения / ускорения формирования реагента Гриньяра, 5 мг йода было добавлено и немедленное обесцвечивание наблюдалось, подтверждающее формирование реактива Гриньяра) и эфир начали дефлегмировать. Остальной раствор бромиды добавляли по каплям при сохранении реакции при легком дефлегмировании при охлаждении колбы в воде. После завершения добавления реакцию смесь выдерживали при 35 °C в течение 1 часа, а затем охлаждали в ледяной бане. Этилформиат (9 г, 121 ммоль) растворяли в безводном эфире

(100 мл) и переносили в капельную воронку и добавляли по каплям к реакционной смеси при перемешивании. Экзотермическая реакция наблюдалась и реакционную смесь начали дефлегмировать. После начала реакции остальной эфирный раствор формиата быстро добавили в виде потока и реакционную смесь перемешивали в течение еще 1 ч при комнатной температуре. Реакцию останавливали путем добавления 10 мл ацетона по каплям следом за ледяной водой (60 мл). Реакционную смесь обрабатывали водной  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (10% по объему, 300 мл), пока раствор не стал однородным и слои разделили. Водную фазу экстрагировали эфиром (2x200 мл). Объединенные эфирные слои сушили ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) и концентрировали, получая сырой продукт, который очищали с помощью колоночной хроматографии (силикагель, 0-10% эфира в гексане). Полученные фракции выпаривали до получения чистого продукта **11** в виде белого твердого вещества (30,6 г, 90%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.26 (s, 1H), 5.81 (ddt,  $J = 16.9, 10.2, 6.7$  Hz, 8H), 5.04 – 4.88 (m, 16H), 3.57 (dd,  $J = 7.6, 3.3$  Hz, 4H), 2.04 (q,  $J = 6.9$  Hz, 16H), 1.59 (s, 1H), 1.45 (d,  $J = 7.5$  Hz, 8H), 1.43 – 1.12 (m, 94H), 0.88 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{cdCl}_3$ )  $\delta$  139.40, 114.33, 77.54, 77.22, 76.90, 72.21, 37.70, 34.00, 29.86, 29.67, 29.29, 29.12, 25.85.

#### **Синтез нонадека-1,18-диен-10-ил 4-бромбутаноата (12)**

К раствору спирта **11** (5,6 г, 20 ммоль) в безводном DCM (300 мл) медленно и осторожно добавляли бромобутирил хлорид (20 ммоль) при 0 °С в инертной атмосфере. Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры, перемешивали в течение 20 ч и контролировали с помощью TLC (силикагель, 10% этилацетат в гексане). После завершения реакции смесь разбавляли водой (400 мл) и органический слой отделяли. Органическую фазу промывали раствором  $\text{NaHCO}_3$  (1 x 400 мл), затем рассолом (1 x 100 мл) и концентрировали в вакууме. Сырой продукт очищали на силикагелевой (100-200 меш) колонке, элюировали 2-3% этилацетата в гексане, получая 6 г (90%) желаемого продукта **12** в виде бесцветной жидкости.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.80 (ddt,  $J = 16.9, 10.2, 6.7$  Hz, 2H), 5.05 – 4.81 (m, 5H), 3.46 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 2.48 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.17 (p,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 2.11 – 1.93 (m, 4H), 1.65 – 1.44 (m, 4H), 1.43 – 1.17 (m, 19H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{cdCl}_3$ )  $\delta$  172.51, 139.37, 114.35, 77.54, 77.23, 76.91, 74.86, 34.31, 33.99, 33.01, 32.96, 29.65, 29.56, 29.24, 29.09, 28.11, 25.52.

#### **Синтез 9 - ((4-бромобутаноил)окси)гептадекандиоевой кислоты (13)**

К раствору бромэфира **12** (12,1 г, 28,2 ммоль) в дихлорметане (300 мл) и ацетонитриле (300 мл), добавляли  $\text{RuCl}_3$  (1,16 г, 5 мол%), и смесь охлаждали до 10 °С и

метапериодат натрия (60 г) в воде (400 мл) добавляли по каплям. Эту смесь перемешивали при 10 °С в течение 20 часов. Реакционную смесь разбавляли водой, слои разделяли и органический слой был добавлен насыщенным соевым раствором при перемешивании, затем добавили по каплям 3% раствор сульфида натрия до обесцвечивания (от темно-зеленого до бледно-желтого цвета). Слои разделяли, органический слой сушили над сульфатом натрия и выпаривали при пониженном давлении с получением чистого продукта. МВ рассчитан для  $C_{20}H_{35}BrO_7$  467,39; найдено 465,4 (М-2Н).

#### **Синтез 9 - ((4 - (диметиламино) бутаноил) окси) гептадекандиоевой кислоты (14)**

Бромокислоту **13** (2 ммоль) растворяли в 2М раствора диметиламина в ТГФ (20 мл) и к нему добавляли 1 г безводного  $K_2CO_3$  и смесь нагревали в сосуде под давлением при 50 °С в течение ночи. TLC показала завершение реакции. Реакционную смесь подкисляли уксусной кислотой и разбавляли водой (100 мл) и экстрагировали дихлорметаном (2 x 60 мл). Объединенные органические слои концентрировали, сушили и использовали без дополнительной очистки в следующей реакции. МВ рассчитан для  $C_{23}H_{43}NO_6$  429,59; найден 430,6 (МН) +.

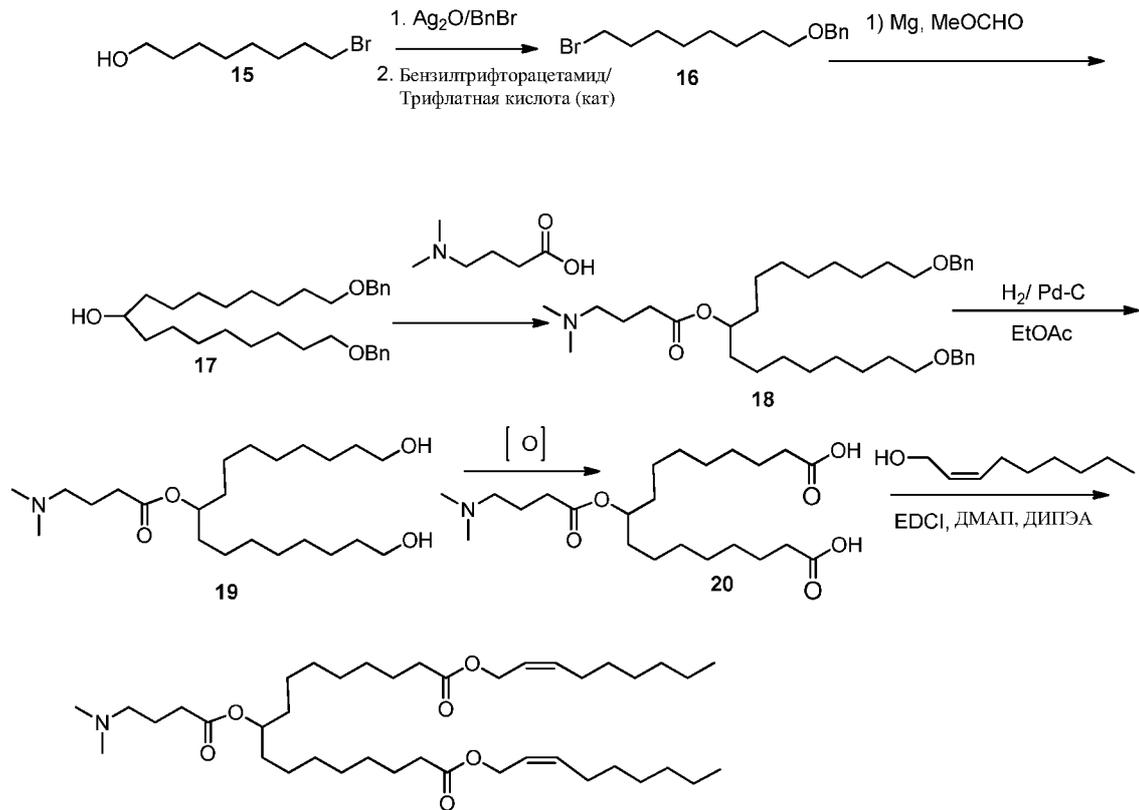
#### **Синтез ди ((Z)-нон-2-ен-1-ил) 9 - ((4 - (диметиламино) бутаноил) окси) гептадекандиоата**

Дикислота **14** преобразуется в соответствующий диэфир как описано для синтеза **8** и аналитические и спектральные данные согласуются с этим продуктом.

#### **Пример 9**

В другом подходе следующий синтетический подход используется для синтеза Соединения 1 настоящего изобретения.

#### **Схема 9**



**Пример 10: FVII в оценке *in vivo* использования катионных липидов полученных липосом**

C57BL/6 мыши (Charles River Labs, MA) получают либо с физиологическим раствором либо миРНК в желаемых составах через хвост инъекции в вену в объеме 0,01 мл / г. В разные точки времени после введения животные анестезировались изофлуорановой ингаляцией и кровь собиралась в сывроточные разделяющие пробирки при ретро-орбитальном кровотечении из забитого животного. Сывроточные уровни белка Фактора VII определяли в образцах с использованием хромогенного анализа (Coaset Factor VII, DiaPharma Group, OH or Biophen FVII, Aniara Corporation, OH) в зависимости от протоколов производителя. Стандартная кривая генерировалась с использованием сывротки, собранной из подопытных животных. В опытах, где уровни мРНК печени оценивались в различное время после введения, животных скарифицировали и печень собирали и замораживали в жидком азоте. Замороженные ткани печени измельчали в порошок. Лизаты ткани готовили и уровни мРНК Фактора VII и *apoB* в печени определяли с использованием разветвленного анализа ДНК (QuantiGene Assay, Panomics, CA).

**Пример 11: Определение эффективности липидных частиц препаратов, содержащих различные катионные липиды с использованием *In Vivo* сайлесинга фактора VII модели грызунов**

Фактор VII (FVII), известный белок в каскаде коагуляции, синтезируется в печени (гепатоцитах) и выделяется в плазму. FVII в плазме крови можно определить с помощью простого планшетного колориметрического анализа. Таким образом, FVII представляет собой удобную модель для определения миРНК опосредованного подавления продукции белков гепатоцитами, также как мониторинга концентрации в плазме и тканях распределения нуклеиновая кислота -липид частиц и миРНК, таких как миРНК, показано в Таблице 19.

ТАБЛИЦА 19

Дуплекс	Последовательность 5'-3'	SEQ ID NO:	Цель
AD-1661	GGAfUfCAfUfCfUfCAAGfUfCfUfUAfCdTsdT		FVII
	GfUAAGAfCfUfUGAGAfUGAfUfCfCdTsdT		

Нижний случай 2'ОМе модификации и Nf является 2'F модификацией нуклеоснований, dT является дезокситимидином, s является фосфотиоатом.

Катионные липиды, описанные здесь, используются для образования липосом, содержащих AD-1661 duplex при использовании в соответствии с методом смешивания "в линию", как описано в международной публикации WO 2010/088537, которая включена в качестве ссылки в полном объеме. Липидные частицы, сформированные с помощью следующего молярного соотношения: 50% катионных липидов / 10% дистеароилфосфатидилхолина (DSPC) / 38,5% холестерина / 1,5% PEG-DMG (1 (монометокси-полиэтиленгликоль) -2,3- димиристоилглицерин, со средней молекулярной массой PEG 2000) .

C57BL/6 мыши (Charles River Labs, MA) получают либо с физиологическим раствором либо миРНК в желаемых составах через при помощи инъекции в хвостовую вену. В разные точки времени после введения образцы сыворотки собирали путем ретроорбитального кровотечения. Сывороточные уровни белка Фактора VII определяли в образцах с использованием хромогенного анализа (Coaset Factor VII, DiaPharma Group, OH or Biophen FVII, Aniera Corporation, OH). Чтобы определить уровень Фактора VII мРНК печени, животных скарифицировали и печень собирали и замораживали в жидком азоте. Лизаты ткани готовили из замороженных тканей и уровень Фактора VII мРНК печени количественно определяли с использованием разветвленного ДНК-анализа (QuantiGene Assay, Panomics, CA).

FVII активность оценивалась в FVII миРНК подопытных животных в течение 48 часов после внутривенного (болюсного) введения в C57BL / 6 мышей. FVII измеряется с использованием коммерчески доступного набора для определения уровня белка в сыворотке или ткани, следуя инструкциям производителя микропланшет. FVII уменьшение определяется в отношении необработанных контрольных мышей, а результаты выражаются как % Остаточного FVII. Два уровня доз (0,05 и 0,005 мг / кг FVII миРНК) используются для скрининга каждой новой липосомальной композиции.

### **Пример 12: миРНК состав с использованием готовых везикул**

Катионный липид, содержащий частицы, производят с использованием способа предварительного пузырька. Катионный липид, DSPC, холестерин и PEG-липид растворяли в этаноле при молярном соотношении 40/10/40/10, соответственно. Липидную смесь добавляли в водный буфер (50 мМ цитрат, pH 4) при перемешивании до конечной концентрации этанола и липидов на 30% (объем / объем) и 6,1 мг / мл соответственно, и

оставляли для уравнивания при комнатной температуре в течение 2 мин. перед экструзией. Гидратированные липиды экструдировали через два стека с порами размером 80 нм фильтрами (Nuclepore) при 22°C, с использованием Lipex Extruder (Northern Lipids, Vancouver, BC), пока пузырек диаметром 70- 90 нм, как определено анализом Nicomp, получается. Как правило, это требует 1- 3 проходов. Для некоторых смесей катионных липидов, которые не образуют мелкие пузырьки, увлажнение липидной смеси буфером с более низким pH (50 мМ цитрат, pH 3) для протонирования фосфатной группы на DSPC головной группы помогает формировать стабильные пузырьки 70- 90 нм.

МиРНК FVII (растворяют в 50 мМ цитрате, pH 4 водным раствором, содержащим 30% этанола) добавляли в пузырьки, предварительно уравновешенные до 35°C, при скорости ~ 5 мл/мин при перемешивании. После того, как конечная цель отношения миРНК / липид 0,06 (вес / вес) достигается, смесь выдерживают в течение еще 30 минут при 35 °C, чтобы пузырек образовался повторно и произошла инкапсуляция миРНК FVII. Этанол затем удаляли и внешний буфер заменили на PBS (155 мМ NaCl, 3 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,5), либо диализом или диафильтрацией тангенциального потока. Окончательное отношение инкапсулированной миРНК в липиде определяется после удаления разинкапсулированной миРНК с использованием гель-эксклюзионной колоночной или ионообменной колоночной хроматографии.

### **Пример 13: *In Vivo* определение эффективности липидных составов**

Тест составов первоначально оценивается по их FVII нокдауну на самках возрастом 7- 9 недель, 15 -25 г, самках мышей C57Bl /6 при 0,1, 0,3, 1,0 и 5,0 мг / кг с 3 мышами в группе лечения. Все исследования включают в себя животных, получавших либо фосфатный буферный раствор (PBS, контрольная группа) или эталонный состав. Препараты разводят до соответствующей концентрации в PBS непосредственно перед тестированием. Мышей взвешивали и соответствующие объемы дозирования рассчитывали (10 мкл / г веса тела). Испытания и тесты составов, а также PBS (по контролю за животными) вводили внутривенно через латеральную хвостовую вену. Животных анестезировали через 24 часа после внутрибрюшинного введения кетамина / ксилазина и 500-700 мкл крови собирали путем сердечной пункции в сывороточные разделительные пробирки (BD Microtainer). Кровь центрифугировали при 2000 x g в течение 10 минут при 15 °C и сыворотку собирали и хранили при температуре -70 °C до анализа. Образцы сыворотки оттаивали при 37 °C в течение 30 минут, разбавляли в PBS и аликвоты вносили в 96-луночные планшеты для анализа. Уровень Фактора VII оценивали

с использованием хромогенного анализа (Biophen FVII kit, Hyphen BioMed) в соответствии с инструкцией завода-изготовителя, и поглощение измеряли в планшетном сканере, оснащенном фильтром с длиной волны 405 нм. Плазменные FVII уровни количественно определяли и ED<sub>50</sub>s (доза в результате которой наблюдается 50% снижение в плазме уровня FVII по сравнению с контрольными животными) рассчитывали по стандартной кривой, полученной от совокупной выборки из сыворотки от контрольных животных. Эти представляющие интерес составы показывают высокие уровни нокдауна FVII (ED<sub>50</sub> << 0,1 мг / кг) и проходят испытания в независимых исследованиях при более низких дозах, чтобы подтвердить эффективность и установить ED<sub>50</sub> уровень.

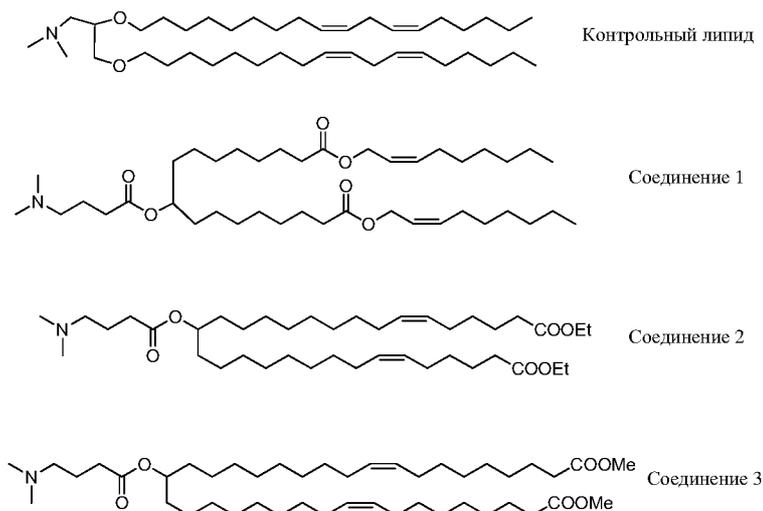
**Пример 14: Исследования для определения липидного профиля и клиренса в тканях у мышей**

Было проведено исследование для определения липидного профиля и тканевого клиренса у мышей для катионных липидов в соответствии с настоящим изобретением.

Самцы мышей (C57BL, 20-30 г) были разделены на четыре группы и им вводили (внутривенно) одно из соединений 1, 2 или 3 настоящего изобретения, или Референсный Липид, как показано ниже в Таблице 20.

ТАБЛИЦА 20

Группа	Липид	Доза липида (мг/кг)	Концентрация липиды (мг/мл)	№ самца мышь
I	Референсный Липид	0,3	0,03	12
II	Соединение 1	0,3	0,03	12
III	Соединение 2	0,3	0,03	12
IV	Соединение 3	0,3	0,03	12



Мышей не кормили. Кровь, печень и селезенка были взяты на образцы (два образца в момент времени в группе) на 0,17, 8, 24, 72, 168, 336 и 672 часа после введения дозы.

На Фигуре 1 показана концентрация липидов печени в течение долгого времени для мышей, в каждой из групп I-IV. Фармакокинетические данные печени представлены в Таблице 21 ниже.

ТАБЛИЦА 21

Липид	$C_{\max}$ (нг/мл)	AUC (ч.нг/мл)	$MRT_{0-t}$ (ч)
Референсный Липид	22,400	6,954,787	221
Соединение 1	1,136	4,594	NC
Соединение 2	118	436	NC
Соединение 3	208	NC	NC

MRT выступает за среднее время пребывания. NC означает не рассчитываемое.

Ожидаемый метаболический путь для соединений 1 и 3 показан на Фигуре 2. Концентрацию этих метаболитов измеряли в печени. Результаты представлены в Таблице 22 ниже. Все измерения, проводимые через 24 часа (в том числе полученные на 72, 168, 336 и 672 часа после введения), были ниже количественного уровня (BLQ).

ТАБЛИЦА 22

Время (ч)	Соединение 1		Соединение 2		Соединение 3	
	Моно-	Ди-	Моно -	Ди -	Моно -	Ди -



672	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

На Фигуре 4 показана концентрация липидов в плазме в течение долгого времени для мышей в каждой из групп I-IV. Плазменные фармакокинетические данные представлены в Таблице 25 ниже.

ТАБЛИЦА 25

Липид	C <sub>max</sub> (нг/мл)	AUC (ч.нг/мл)	MRT <sub>0-t</sub> (ч)
Референсный Липид	2,110	63,775	201
Соединение 1	38,750	155,012	0.0006
Соединение 2	28,800	115,612	0.0285
Соединение 3	30,600	122,412	0.0008

Концентрацию метаболита соединений 1-3 в плазме измерили, и результаты представлены в Таблице 26 ниже. Все измерения через 24 часа (в том числе полученные на 72, 168, 336 и 672 часа после введения) были ниже количественного уровня (BLQ).

ТАБЛИЦА 26

Время (ч)	Соединение 1		Соединение 2		Соединение 3	
	Моно-кислота	Ди-кислота	Моно-кислота	Ди-кислота	Моно-кислота	Ди-кислота
0.17	181.43	1186.40	1355.56	605.56	1037.63	871.64
8	BLQ	BLQ	2.66	3.53	BLQ	21.18
24	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	2.45

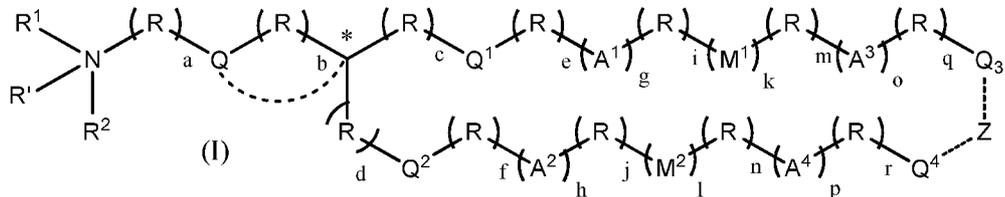
Как видно из Фигур 1, 3, 4 и Таблиц 22, 24 и 26, Соединения 1, 2 и 3 настоящей презентации изобретения демонстрируют значительное улучшение клиренса тканей и активности по сравнению с Референсным Липидом.

Эти и другие изменения могут быть внесены в варианты воплощения в свете вышеизложенного подробного описания. В общем, в следующей формуле изобретения, используемые термины не должны рассматриваться как ограничивающие формулу изобретения конкретными вариантами воплощения, раскрытыми в описании и формуле

изобретения, но должны быть истолкованы так, чтобы включить все возможные варианты воплощения вместе с полным объемом эквивалентов, в которых такая формула изобретения имеет право. Соответственно, формула изобретения не ограничивается данным раскрытием.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**

## 1. Соединение формулы (I):



или его соли,

где

R' отсутствует, водород или алкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил);

по отношению к R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup>,

(i) R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> каждый независимо, опционально замещенный алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, циклоалкилалкил или гетероцикл;

(ii) R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют опционально замещенное гетероциклическое кольцо; или

(iii) один из R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> представляет собой опционально замещенный алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, циклоалкилалкил или гетероцикл, и другие формы 4-10 членного гетероциклического кольца или гетероарил с (a) атомом азота и (b) (R)<sub>a</sub> группа сопряженная с атомом азота;

в каждом случае R является, независимо, - (CR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>) -; в каждом случае R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> независимо друг от друга H, OH, алкил, алкокси, -NH<sub>2</sub>, алкиламино или диалкиламино;

или R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> вместе с атомом углерода, к которому они непосредственно присоединены, образуют циклоалкильную группу, причем не более трех групп R в каждой цепи прикреплено к углероду C\* и являются циклоалкилом (например, циклопропил);

пунктирная линия к Q отсутствует или связь;

когда пунктирная линия к Q отсутствует, то Q отсутствует или представляет собой -O-, -S-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(R<sup>4</sup>)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)-, -S-S-, -OC(O)O-, -O-N=C(R<sup>5</sup>)-, -C(R<sup>5</sup>)=N-O-, -OC(O)N(R<sup>5</sup>)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)N(R<sup>5</sup>)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)O-, -C(O)S-, -C(S)O- или -C(R<sup>5</sup>)=N-O-C(O)-; или

когда пунктирная линия к Q представляет собой связь, то b=0 и Q и третичный углерод, прилегающий к нему (C\*), образуют замещенную или незамещенную, моно- или бициклическую гетероциклическую группу, имеющую от 5 до 10 атомов в кольце;

Q<sup>1</sup> и Q<sup>2</sup>, каждый независимо, отсутствует, -O-, -S-, -OC(O)-, -C(O)O-, -SC(O)-, -

$C(O)S-$ ,  $-OC(S)-$ ,  $-C(S)O-$ ,  $-S-S-$ ,  $-C(O)(NR^5)-$ ,  $-N(R^5)C(O)-$ ,  $-C(S)(NR^5)-$ ,  $-N(R^5)C(O)-$ ,  $-N(R^5)C(O)N(R^5)-$  или  $-OC(O)O-$ ;

$Q^3$  и  $Q^4$ , каждый независимо, H,  $-(CR^3R^4)-$ , арил или фрагмент холестерина;  
в каждом случае  $A^1$ ,  $A^2$ ,  $A^3$  и  $A^4$  представляет собой, независимо,  $-(CR^5R^5-CR^5=CR^5)-$ ;

в каждом случае  $R^5$  представляет собой, независимо, H или алкил;

$M^1$  и  $M^2$ , каждый независимо, - биоразлагаемые группы;

Z отсутствует, алкилен или  $-O-P(O)(OH)-O-$ ;

каждая ----- прикрепленная к Z, является необязательной связью, так что, когда Z отсутствует,  $Q^3$  и  $Q^4$  не непосредственно ковалентно связаны друг с другом;

a = 1, 2, 3, 4, 5 или 6;

b = 0, 1, 2 или 3;

c, d, e, f, i, j, m, n, q и r, каждый независимо, равны 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

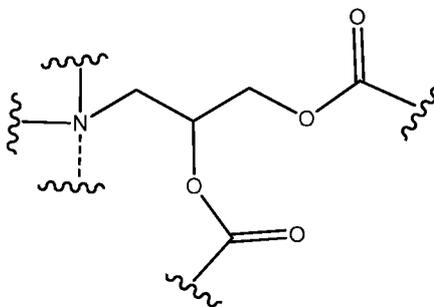
g и h, каждый независимо, равны 0, 1 или 2;

k и l, каждый независимо, равны 0 или 1, где по меньшей мере один k и l = 1; и

o и p, каждый независимо, равны 0, 1 или 2,

где

(i) соединение не содержит следующий фрагмент:



где ---- является дополнительной связью; и

(ii)  $Q^3$  и  $Q^4$ , каждый независимо, отделены от третичного атома углерода, отмеченного звездочкой (\*) цепочкой из 8 или более атомов.

2. Соединение по п.1, отличающееся тем, что  $M^1$  и  $M^2$ , каждый независимо:  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-SC(O)-$ ,  $-C(O)S-$ ,  $-OC(S)-$ ,  $-C(S)O-$ ,  $-S-S-$ ,  $-C(R^5)=N-$ ,  $-N=C(R^5)-$ ,  $-C(R^5)=N-O-$ ,  $-O-N=C(R^5)-$ ,  $-C(O)(NR^5)-$ ,  $-N(R^5)C(O)-$ ,  $-C(S)(NR^5)-$ ,  $-N(R^5)C(O)-$ ,  $-N(R^5)C(O)N(R^5)-$ ,  $-OC(O)O-$ ,  $-OSi(R^5)_2O-$ ,  $-C(O)(CR^3R^4)C(O)O-$  или  $-OC(O)(CR^3R^4)C(O)-$ .

3. Соединение по п.2, отличающееся тем, что  $M^1$  и  $M^2$ , каждый независимо:  $C(O)-O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(R^5)=N-$ ,  $-C(R^5)=N-O-$ ,  $-O-C(O)O-$ ,  $-C(O)N(R^5)-$ ,  $-C(O)S-$ ,  $-C(S)O-$ ,  $-OSi(R^5)_2O-$ ,  $-C(O)(CR^3R^4)C(O)O-$  или  $-OC(O)(CR^3R^4)C(O)-$ .

4. Соединение по любому из пп 2 и 3, отличающееся тем, что  $M^1$  и  $M^2$  каждый являются  $-C(O)O-$ .

5. Соединение по любому из пп 1-4, отличающееся тем, что  $R^1$  и  $R^2$  каждый являются алкилом.

6. Соединение по п.5, отличающееся тем, что  $R^1$  и  $R^2$  каждый являются метилом.

7. Соединение по любому из пп 1-6, отличающееся тем, что  $Q$  отсутствует,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)N(R^4)-$ ,  $-N(R^5)C(O)-$ ,  $-S-S-$ ,  $-OC(O)O-$ ,  $-C(R^5)=N-O-$ ,  $-OC(O)N(R^5)-$ ,  $-N(R^5)C(O)N(R^5)-$ ,  $-N(R^5)C(O)O-$ ,  $-C(O)S-$ ,  $-C(S)O-$  или  $-C(R^5)=N-O-C(O)-$ .

8. Соединение по пп 1-7, отличающееся тем, что  $Q$  отсутствует.

9. Соединение по любому из пп 1-8, причем каждый экземпляр  $R$  является, независимо,  $-CH_2-$ ,  $-C(CH_3)_2-$  или  $-CH(iPr)-$ .

10. Соединение по любому из пп 1-9, отличающееся тем, что  $Q^1$  и  $Q^2$ , каждый независимо, отсутствует или  $-O-$ .

11. Соединение по любому из пп 1-10, отличающееся тем, что  $a = 2, 3$  или  $4$  и  $b = 0$ .

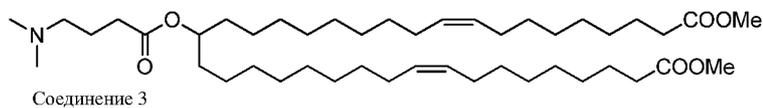
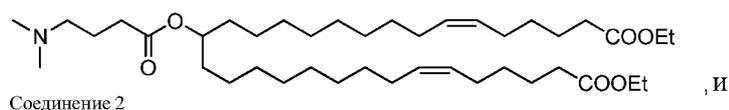
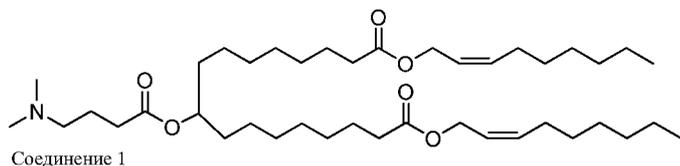
12. Соединение по любому из пп 1-11, отличающееся тем, что альфа- или бета-атом углерода биоразлагаемой группы замещен одной или двумя алкильными группами или спироциклическими группами.

13. Соединение по п.1, отличающееся тем, что соблюдается одно или несколько из следующих условий:

- (i)  $Q^1$  и  $Q^2$  отсутствуют;
- (ii)  $M^1$  и  $M^2$  являются оба  $-C(O)O-$ ;
- (iii)  $g$  и  $h$  оба равны 1;
- (iv)  $g$  и  $h$  оба равны 0;
- (v)  $c$  и  $e$  всего 7;
- (vi)  $d$  и  $f$  всего 7;
- (vii)  $c$ ,  $e$  и  $i$  всего 7;
- (viii)  $d$ ,  $f$  и  $j$  всего 7;
- (ix)  $i$  и  $j$  каждый 7;

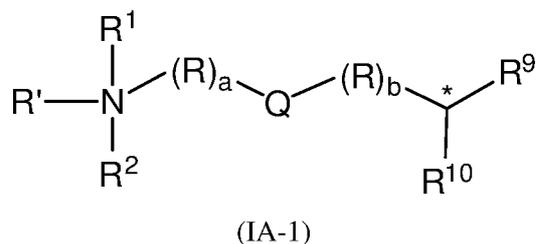
- (x) k и l оба равны 1;
- (xi) m и n оба равны 0;
- (xii) m и q всего 1 или m и q всего 2;
- (xiii) m и l всего 6;
- (xiv) r и n всего 6;
- (xv) p и o оба равны 0;
- (xvi) n и r всего 2 или n и r всего 1; и
- (xvii) Q<sup>3</sup> представляет собой H.

14. Соединение по п.1, гдеотличающееся тем, что выбрано из:



или его соли.

15.Соединение формулы IA-1



или его соли.

где

R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> каждый независимо, опционально замещенный алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, циклоалкилалкил или гетероцикл; или

R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют опционально замещенное гетероциклическое кольцо;

в каждом случае R является, независимо,  $-(CR^3R^4)-$ ;

в каждом случае  $R^3$  и  $R^4$  независимо друг от друга - H, OH, алкил, алкокси,  $-NH_2$ , алкиламино или диалкиламино (в одном из предпочтительных вариантов воплощения, в каждом случае  $R^3$  и  $R^4$  независимо друг от друга - H или  $C_1-C_4$  -алкил);

или  $R^3$  и  $R^4$  вместе с атомом углерода, к которому они непосредственно присоединены, образуют циклоалкильную группу, причем не более трех групп R в каждом из  $R^9$  и  $R^{10}$  являются циклоалкилом;

Q отсутствует или представляет собой  $-O-$ ,  $-NH-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)N(R^4)-$ ,  $-N(R^5)C(O)-$ ,  $-S-S-$ ,  $-OC(O)O-$ ,  $-O-N=C(R^5)-$ ,  $-C(R^5)=N-O-$ ,  $-OC(O)N(R^5)-$ ,  $-N(R^5)C(O)N(R^5)-$ ,  $-N(R^5)C(O)O-$ ,  $-C(O)S-$ ,  $-C(S)O-$  или  $-C(R^5)=N-O-C(O)-$ ;

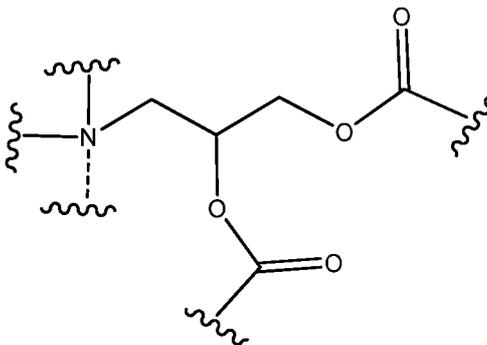
a = 1, 2, 3, 4, 5 или 6;

b = 0, 1, 2 или 3;

$R'$  - отсутствует, водород или алкил (например,  $C_1-C_4$  -алкил);

каждый из  $R^9$  и  $R^{10}$  независимо друг от друга -  $C_{12}-C_{24}$  алкил,  $C_{12}-C_{24}$  алкенил или  $C_{12}-C_{24}$  алкокси, имеющий одну или более биоразлагаемую группу; каждая биоразлагаемая группа самостоятельно прерывает  $C_{12}-C_{24}$  алкил, алкенил или алкоксигруппу, или заменяется на конце  $C_{12}-C_{24}$  алкил, алкенил или алкоксигруппой; где

(i) соединение не содержит следующий фрагмент:

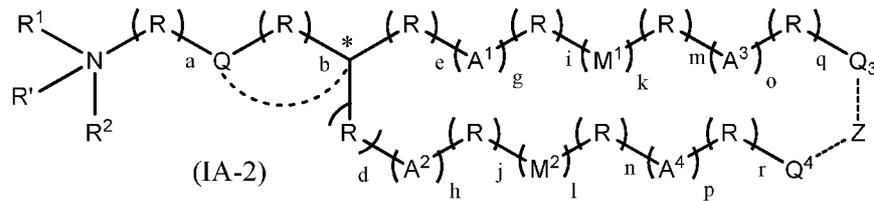


где ---- является опциональной связью; и

(ii) концы  $R^9$  и  $R^{10}$  отделены от третичного атома углерода, отмеченного звездочкой (\*), цепочкой из 8 или более атомов.

16. Соединение по п.15, отличающееся тем, что q отсутствует и  $R'R^1R^2N-(R)_a-Q-(R)_b$  группа является  $(CH_3)_2N-(CH_2)_3-C(O)O-$ ,  $(CH_3)_2N-(CH_2)_2-NH-C(O)O-$ ,  $(CH_3)_2N-(CH_2)_2-OC(O)-NH-$  или  $(CH_3)_2N-(CH_2)_3-C(CH_3)=N-O-$ .

17. Соединение формулы IA-2



или его соль, в котором

$R^1$  - отсутствует, водород или алкил;

$R^1$  и  $R^2$ , каждый независимо, опционально замещенный  $C_1$ - $C_4$  алкил,  $C_2$ - $C_4$  алкенил,  $C_2$ - $C_4$  алкинил,  $C_3$ - $C_6$  циклоалкил, ( $C_3$ - $C_6$  циклоалкил)  $C_1$ - $C_4$  алкил или моноциклический гетероцикл; или

$R^1$  и  $R^2$  вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют опционально замещенное 5 - или 6-членное гетероциклическое кольцо;

в каждом случае  $R$  является, независимо,  $-(CR^3R^4)-$ ;

в каждом случае  $R^3$  и  $R^4$  независимо друг от друга - H, OH, алкил, алкокси,  $-NH_2$ , алкиламино или диалкиламино;

или  $R^3$  и  $R^4$  вместе с атомом углерода, к которому они непосредственно присоединены, образуют  $C_3$ - $C_6$  циклоалкильную группу, причем не более трех групп  $R$  в каждой цепи прикреплены к углероду  $C^*$  являются циклоалкилом;

пунктирная линия к  $Q$  отсутствует или связь;

когда пунктирная линия к  $Q$  отсутствует, то  $Q$  отсутствует или представляет собой  $-O-$ ,  $-NH-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)N(R^4)-$ ,  $-N(R^5)C(O)-$ ,  $-S-S-$ ,  $-OC(O)O-$ ,  $-O-N=C(R^5)-$ ,  $-C(R^5)=N-O-$ ,  $-OC(O)N(R^5)-$ ,  $-N(R^5)C(O)N(R^5)-$ ,  $-N(R^5)C(O)O-$ ,  $-C(O)S-$ ,  $-C(S)O-$  или  $-C(R^5)=N-O-C(O)-$ ; или

когда пунктирная линия к  $Q$  представляет собой связь, то  $b=0$  и  $Q$  и третичный углерод, прилегающий к нему ( $C^*$ ), образуют замещенную или незамещенную, моно- или бициклическую гетероциклическую группу, имеющую от 5 до 10 атомов в кольце;

$Q^3$  и  $Q^4$ , каждый независимо, - H, -  $(CR^3R^4)$  -, арил или фрагмент холестерина;

в каждом случае  $A^1$ ,  $A^2$ ,  $A^3$  и  $A^4$  представляет собой, независимо,  $-(CR^5R^5-CR^5=CR^5)-$ ;

в каждом случае  $R^5$  представляет собой, независимо, H или алкил;

$M^1$  и  $M^2$ , каждый независимо, представляет собой  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(R^5)=N-$ ,  $-C(R^5)=N-O-$ ,  $-O-C(O)O-$ ,  $-C(O)N(R^5)-$ ,  $-C(O)S-$ ,  $-C(S)O-$ ,  $-OSi(R^5)_2O-$ ,  $-C(O)(CR^3R^4)C(O)O-$  или  $-OC(O)(CR^3R^4)C(O)-$ ;

$Z$  - отсутствует, алкилен или  $-O-P(O)(OH)-O-$ ;

каждая ----- прикрепленная к  $Z$ , является необязательной связью, так что, когда  $Z$

отсутствует,  $Q^3$  и  $Q^4$  не непосредственно ковалентно связаны друг с другом;

$a = 1, 2, 3, 4, 5$  или  $6$ ;

$b = 0, 1, 2$  или  $3$ ;

$d, e, i, j, m, n, q$  и  $r$ , каждый независимо, равен  $0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$  или  $10$ ;

$g$  и  $h$ , каждый независимо, равен  $0, 1$  или  $2$ ;

сумма  $d + 3h$  составляет по меньшей мере  $4$ , и сумма  $e + 3g$  составляет по меньшей мере  $4$ ;

$k$  и  $l$ , каждый независимо, равен  $0$  или  $1$ , где по меньшей мере один  $k$  и  $l = 1$ ; и

$o$  и  $p$ , каждый независимо, равен  $0, 1$  или  $2$ ,

где  $Q^3$  и  $Q^4$ , каждый независимо, отделены от третичного атома углерода, отмеченного звездочкой (\*), цепочкой из  $8$  или более атомов.

18. Соединение по п.17, отличающееся тем, что  $R'$  отсутствует или алкил.

19. Соединение по п.17 или 18, отличающееся тем, что  $R^1$  и  $R^2$ , каждый независимо, являются  $C_1$ - $C_4$  алкилом.

20. Соединение по любому из предыдущих пунктов 17-19, отличающееся тем, что в каждом случае  $R$  является, независимо,  $-CH_2-$  или  $-CH(CH_3)-$ .

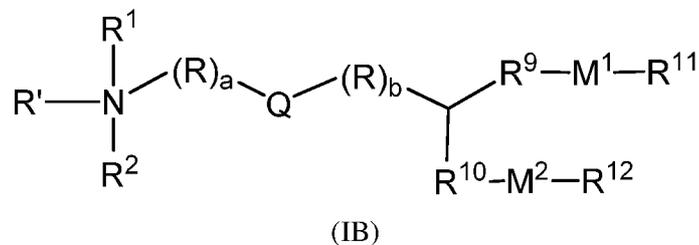
21. Соединение по любому из предыдущих пунктов 17-20, отличающееся тем, что  $Q^3$  и  $Q^4$ , каждый независимо, -  $H$ , арил или фрагмент холестерина.

22. Соединение по любому из предыдущих пунктов 17-21, отличающееся тем, что  $M^1$  и  $M^2$  каждый -  $C(O)-O-$ .

23. Соединение по любому из предыдущих пунктов 17-22, отличающееся тем, что сумма  $e+3g+i+m+3o+q$  составляет примерно от  $8$  до примерно  $20$ .

24. Соединение по любому из предыдущих пунктов 17-22, отличающееся тем, что сумма  $d+3h+j+n+3r+g$  составляет примерно от  $8$  до примерно  $20$ .

25. Соединение формулы IB



где

$R^1$  и  $R^2$ , каждый независимо, опционально замещенный алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, циклоалкилалкил или гетероцикл; или

$R^1$  и  $R^2$  вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют опционально замещенное гетероциклическое кольцо;

в каждом случае  $R$  является, независимо,  $-(CR^3R^4)-$ ;

в каждом случае  $R^3$  и  $R^4$  независимо друг от друга - H, OH, алкил, алкокси,  $-NH_2$ , алкиламино или диалкиламино (в одном из предпочтительных вариантов воплощения, в каждом случае  $R^3$  и  $R^4$  независимо друг от друга - H или  $C_1$ - $C_4$  алкил);

или  $R^3$  и  $R^4$  вместе с атомом углерода, к которому они непосредственно присоединены, образуют циклоалкильную группу, причем не более трех групп  $R$  в каждой цепи, прикрепленной к углероду  $C^*$ , являются циклоалкилом (например, циклопропилом);

$Q$  отсутствует или представляет собой  $-O-$ ,  $-NH-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)N(R^4)-$ ,  $-N(R^5)C(O)-$ ,  $-S-S-$ ,  $-OC(O)O-$ ,  $-O-N=C(R^5)-$ ,  $-C(R^5)=N-O-$ ,  $-OC(O)N(R^5)-$ ,  $-N(R^5)C(O)N(R^5)-$ ,  $-N(R^5)C(O)O-$ ,  $-C(O)S-$ ,  $-C(S)O-$  или  $-C(R^5)=N-O-C(O)-$ ;

$a = 1, 2, 3, 4, 5$  или  $6$ ;

$b = 0, 1, 2$  или  $3$ ;

$R'$  - отсутствует, водород или алкил (например,  $C_1$ - $C_4$  алкил);

$M^1$  и  $M^2$ , каждый независимо, представляют собой биоразлагаемые группы;

каждый из  $R^9$  и  $R^{10}$  независимо представляют собой алкилен или алкенилен, и

каждый из  $R^{11}$  и  $R^{12}$  независимо представляют собой алкил или алкенил,

опционально заканчивающийся  $COOR^{13}$ , где каждый  $R^{13}$  независимо представляет собой алкил;

при условии, что:

$R^9$ ,  $M^1$  и  $R^{11}$  вместе имеют по меньшей мере 8 атомов углерода в длину; и

$R^{10}$ ,  $M^2$  и  $R^{12}$  вместе имеют по меньшей мере 8 атомов углерода в длину.

26. Соединение по п.25, отличающееся тем, что  $R^9$  и  $R^{10}$  независимо друг от друга представляют собой  $C_4$ - $C_{12}$  алкилен или  $C_4$ - $C_{12}$  алкенилен,  $M^1$  и  $M^2$  представляют собой  $-C(O)O-$ , и  $R^{11}$  и  $R^{12}$  представляют собой  $C_4$ - $C_{12}$  алкилен или  $C_4$ - $C_{12}$  алкенилен.

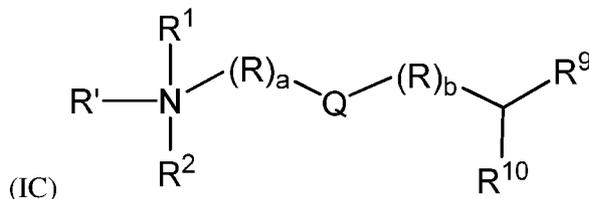
27. Соединение по п.25 или 26, отличающееся тем, что  $R^9$ ,  $M^1$  и  $R^{11}$  вместе составляют от 12 до 24 атомов углерода в длину.

28. Соединение по п.25 или 26, отличающееся тем,  $R^{10}$ ,  $M^2$  и  $R^{12}$  вместе составляют от 12 до 24 атомов углерода в длину.

29. Соединение по любому из предыдущих пунктов 25-28, отличающееся

тем, что  $R'R^1R^2N-(R)_a-Q-(R)_b-$  группа является  $(CH_3)_2N-(CH_2)_3-C(O)O-$ ,  $(CH_3)_2N-(CH_2)_2-NH-C(O)O-$ ,  $(CH_3)_2N-(CH_2)_2-OC(O)-NH-$  или  $(CH_3)_2N-(CH_2)_3-C(CH_3)=N-O-$ .

### 30. Соединение формулы IC



в котором

$R^1$  и  $R^2$  каждый независимо, опционально замещенный алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, циклоалкилалкил или гетероцикл; или

$R^1$  и  $R^2$  вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют опционально замещенное гетероциклическое кольцо;

в каждом случае  $R$  является, независимо,  $-(CR^3R^4)-$ ;

в каждом случае  $R^3$  и  $R^4$  независимо друг от друга - H, OH, алкил, алкокси,  $-NH_2$ , алкиламино или диалкиламино (в одном из предпочтительных вариантов воплощения, в каждом случае  $R^3$  и  $R^4$  независимо друг от друга - H или  $C_1-C_4$  алкил);

или  $R^3$  и  $R^4$  вместе с атомом углерода, к которому они непосредственно присоединены, образуют циклоалкильную группу, причем не более трех групп  $R$  в каждой цепи прикрепленной к углероду  $C^*$ , являются циклоалкилом (например, циклопропилом);

$Q$  отсутствует или представляет собой  $-O-$ ,  $-NH-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)N(R^4)-$ ,  $-N(R^5)C(O)-$ ,  $-S-S-$ ,  $-OC(O)O-$ ,  $-O-N=C(R^5)-$ ,  $-C(R^5)=N-O-$ ,  $-OC(O)N(R^5)-$ ,  $-N(R^5)C(O)N(R^5)-$ ,  $-N(R^5)C(O)O-$ ,  $-C(O)S-$ ,  $-C(S)O-$  или  $-C(R^5)=N-O-C(O)-$ ;

$a = 1, 2, 3, 4, 5$  или  $6$ ;

$b = 0, 1, 2$  или  $3$ ;

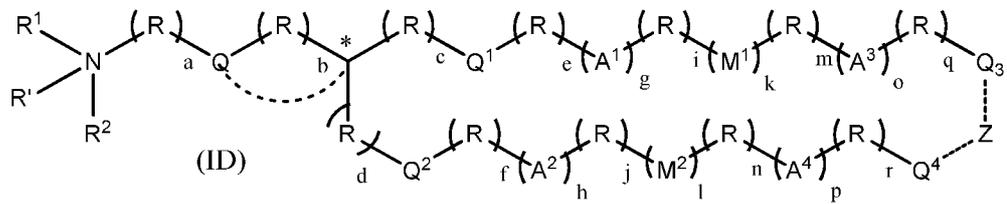
$R'$  - отсутствует, водород или алкил (например,  $C_1-C_4$  алкил);

каждый из  $R^9$  и  $R^{10}$  независимо друг от друга представляют собой  $C_{12}-C_{24}$  алкил или алкенил, замещенный на его конце биоразлагаемой группой.

31. Соединение по п.30, отличающееся тем, что каждая из биоразлагаемых групп является  $-COOR^{13}$ , где каждый  $R^{13}$  является, независимо, алкилом.

32. Соединение по п.30 или 31, отличающееся тем, что  $R'R^1R^2N-(R)_a-Q-(R)_b-$  группа представляет собой  $(CH_3)_2N-(CH_2)_3-C(O)O-$ ,  $(CH_3)_2N-(CH_2)_2-NH-C(O)O-$ ,  $(CH_3)_2N-(CH_2)_2-OC(O)-NH-$  или  $(CH_3)_2N-(CH_2)_3-C(CH_3)=N-O-$ .

## 33. Соединение формулы ID



или его соли,

где

R' - отсутствует, водород или алкил;

R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup>, каждый независимо, представляет собой опционально замещенный алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, циклоалкилалкил или гетероцикл; или

R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют опционально замещенное гетероциклическое кольцо;

в каждом случае R является, независимо, - (CR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>) -;

в каждом случае R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> независимо друг от друга представляют собой H, OH, алкил, алкокси, -NH<sub>2</sub>, алкиламино или диалкиламино (в одном из предпочтительных вариантов воплощения, в каждом случае R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> независимо друг от друга представляют собой H или алкил);

или R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> вместе с атомом углерода, к которому они непосредственно присоединены, образуют циклоалкильную группу, причем не более трех групп R в каждой цепи, прикрепленной к углероду C\*, являются циклоалкилом (например, циклопропилом);

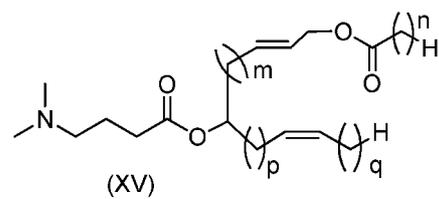
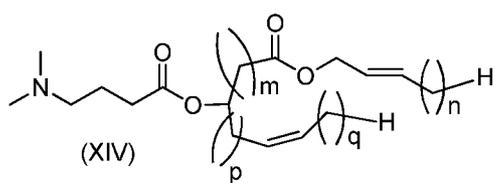
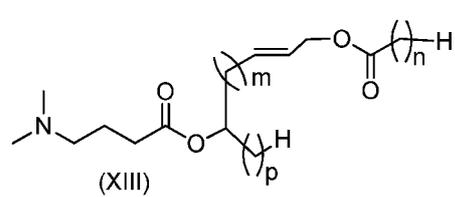
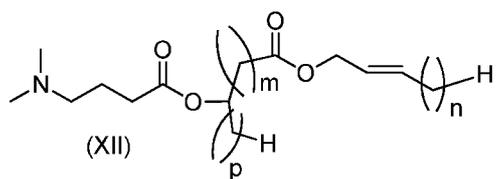
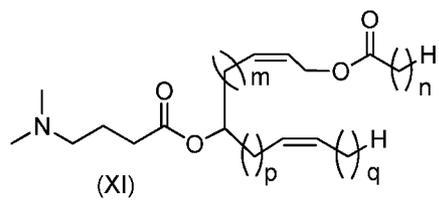
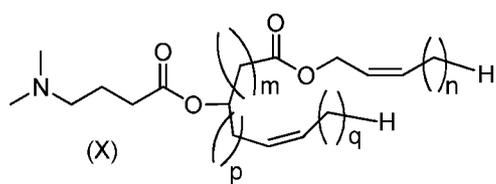
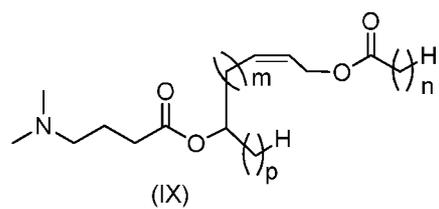
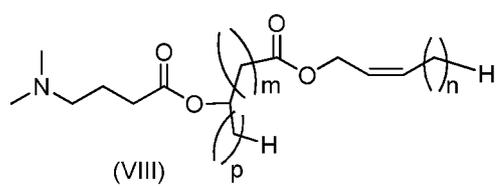
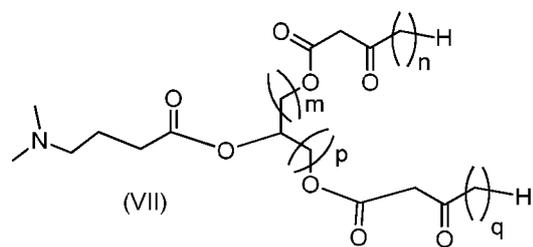
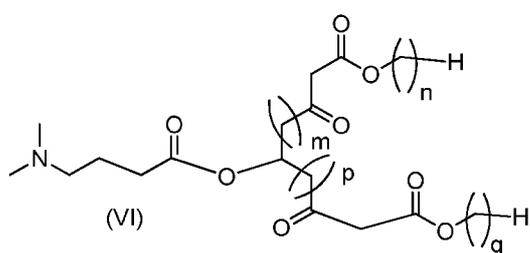
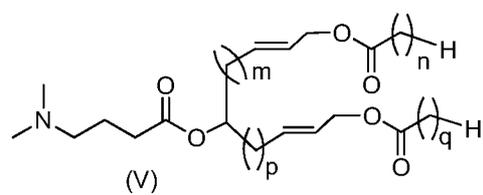
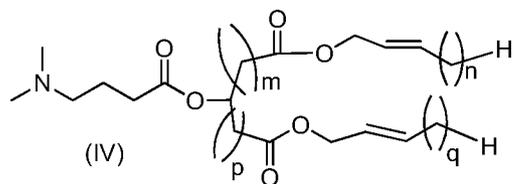
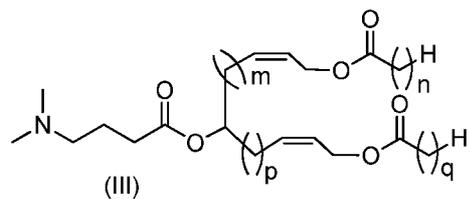
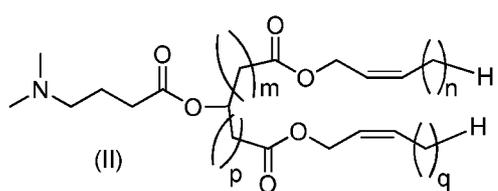
пунктирная линия к Q отсутствует или связь;

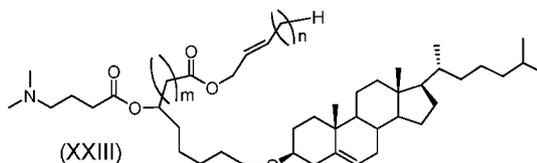
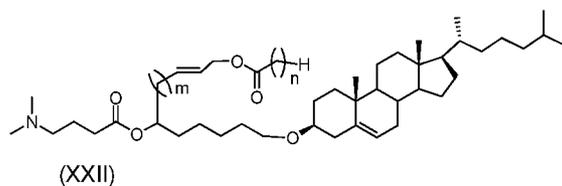
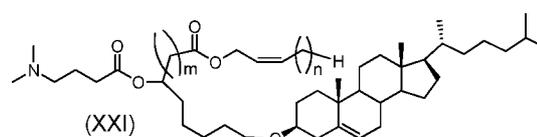
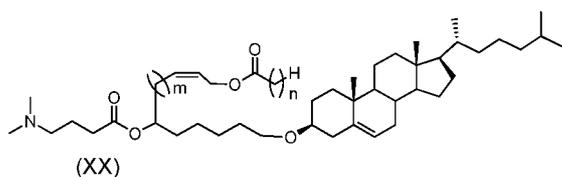
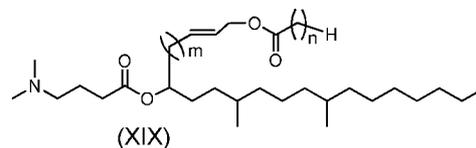
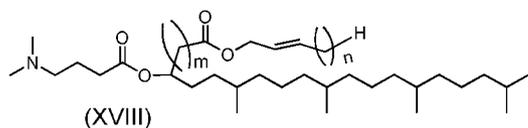
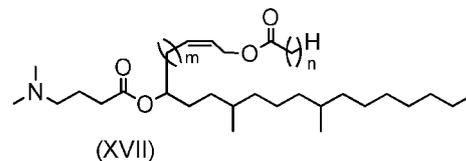
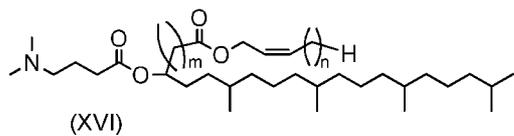
когда пунктирная линия к Q отсутствует, то Q отсутствует или представляет собой -O-, -NH-, -S-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(R<sup>4</sup>)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)-, -S-S-, -OC(O)O-, -O-N=C(R<sup>5</sup>)-, -C(R<sup>5</sup>)=N-O-, -OC(O)N(R<sup>5</sup>)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)N(R<sup>5</sup>)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)O-, -C(O)S-, -C(S)O- или -C(R<sup>5</sup>)=N-O-C(O)-; или

когда пунктирная линия к Q представляет собой связь, то b= 0 и Q и третичный углерод, прилегающий к нему (C\*), образуют замещенную или незамещенную, моно- или бициклическую гетероциклическую группу, имеющую от 5 до 10 кольцевых атомов (например, гетероатомов в гетероциклической группе, выбранных из O и S, предпочтительно O);

Q<sup>1</sup> и Q<sup>2</sup>, каждый независимо, отсутствует, или представляет собой , -O-, -S-, -OC(O)-, -C(O)O-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(S)-, -C(S)O-, -S-S-, -C(O)(NR<sup>5</sup>)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)-, -C(S)(NR<sup>5</sup>)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)N(R<sup>5</sup>)- или -OC(O)O-;







и их соли,

где

m, n, o и p, каждый в отдельности, равны 1-25, при условии, что:

(i) в Формулах (II), (IV), (VI) и (VII), m и p равны 4 или больше;

(ii) в Формулах (VIII), (X), (XII), (XIV), (XVI), (XVIII), (XXI) и (XXIII), m равно 4

или больше; и

(iii) в Формулах (VIII), (IX), (XII) и (XIII), p равно 8 или больше.

35. Соединение, имеющее:

(i) центральный атом углерода,

(ii) азотсодержащую головную группу, связанную с центральным атомом, и

(iii) два гидрофобных хвоста, непосредственно связанных с центральным атомом углерода, каждый гидрофобных хвост содержащий C<sub>8</sub> или более алифатическую группу, присоединенную к центральному атому углерода, где алифатическая группа (a) является разрываемой биоразлагаемой группой, такой, что существует цепочка по меньшей мере из четырех атомов углерода между биоразлагаемой группой и центральным атомом углерода, или (b) включает в себя биоразлагаемую группу на терминальном конце гидрофобного хвоста.

36. Соединение по п. 35, отличающееся тем, что биоразлагаемую группу выбирают из -OC(O)-, -C(O)O-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(S)-, -C(S)O-, -S-S-, -C(R<sup>5</sup>)=N-, -N=C(R<sup>5</sup>)-, -C(R<sup>5</sup>)=N-O-, -O-N=C(R<sup>5</sup>)-, -C(O)(NR<sup>5</sup>)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)-, -C(S)(NR<sup>5</sup>)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)-, -N(R<sup>5</sup>)C(O)N(R<sup>5</sup>)-, -OC(O)O-, -OSi(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>O-, -C(O)(CR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>)C(O)O- и -OC(O)(CR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>)C(O)-.

37. Соединение по любому из пп. 35 и 36, в которых алифатическая группа в одном или обоих гидрофобных хвостах катионных липидов включает в себя по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь.

38. Соединение по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что соединение представлено в форме фармацевтически приемлемой соли.

39. Соединение по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что соединение представлено в виде катионных липидов.

40. Липидная частица, содержащая нейтральный липид, липид, способный снизить агрегацию, и катионный липид по п. 39.

41. Липидная частица по п.20, отличающаяся тем, что нейтральный липид выбирают из DSPC, DPPC, POPC, DOPE или SM; липид, способный уменьшить агрегацию, является PEG- липидом, и липидная частица дополнительно содержит стерол.

42. Липидная частица по любому из пп 40 и 41, отличающаяся тем, что катионный липид присутствует в мольных процентах около 20% и около 60%; нейтральный липид присутствует в мольных процентах от примерно 5% до примерно 25%; стерол присутствует в мольных процентах от примерно 25% до примерно 55%; и PEG -липид является PEG - DMA, PEG-DMG, или их сочетанием, и присутствует в мольных процентах от примерно 0,5% до примерно 15%.

43. Липидная частица по любому из пп 40-42, дополнительно содержащая активный агент.

44. Липидная частица по п. 43, отличающаяся тем, что активный агент представляет собой нуклеиновую кислоту, выбранную из плазмиды, иммуностимулирующих олигонуклеотидов, миРНК, антисмыслового олигонуклеотида, микроРНК, антагомира, аптамера и рибозима.

45. Липидная частица по любому из пп 40-44, отличающаяся тем, что липидная частица *in vivo* имеет период полураспада ( $t_{1/2}$ ) менее чем примерно 3 часа.

46. Липидная частица по любому из пп 40-44, отличающаяся тем, что липидная частица *in vivo* имеет период полураспада ( $t_{1/2}$ ), который составляет менее 10%, чем для липидной частицы, содержащей тот же катионный липид без биоразлагаемой группы.

47. Фармацевтическая композиция, содержащая частицу липида по любому из пп

40-46 и фармацевтически приемлемый носитель.

48. Способ модуляции экспрессии целевого гена в клетке, включающий предоставление в клетку липидной частицы по любому из пп 40-46.

49. Способ по п. 48, отличающийся тем, что активный агент представляет собой нуклеиновую кислоту, выбранную из плазмиды, иммуностимулирующего олигонуклеотида, миРНК, антисмыслового олигонуклеотида, микроРНК, антагомира, аптамера и рибозима.

50. Способ лечения заболевания или расстройства, для которого характерна избыточная экспрессия полипептида в субъекте, включающий предоставление субъекту фармацевтической композиции по п. 47, включающий активный агент представляет собой нуклеиновую кислоту, выбранную из группы, состоящей из миРНК, микроРНК и антисмыслового олигонуклеотида, и в котором миРНК, микроРНК или антисмысловый олигонуклеотид включает в себя полинуклеотид, который специфически связывается с полинуклеотидом, который кодирует полипептид или комплементарен ему.

51. Способ лечения заболевания или расстройства, характеризующегося повышенной экспрессией полипептида у субъекта, включающий в себя предоставление субъекту фармацевтической композиции по п. 47, а активное вещество представляет собой плазмиду, которая кодирует полипептид или функциональный вариант или его фрагмент.

52. Способ индукции иммунного ответа у субъекта, включающий предоставление субъекту фармацевтической композиции по п. 47, в котором активный агент является иммуностимулирующим олигонуклеотидом.

53. Способ по п. 52, отличающееся тем, что ген-мишень выбран из группы, состоящей из Factor VII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, PDGF beta ген, Erb-B ген, Src ген, CRK ген, GRB2 ген, RAS ген, MEKK ген, JNK ген, RAF ген, Erk1/2 ген, PCNA(p21) ген, MYB ген, JUN ген, FOS ген, BCL-2 ген, Cyclin D ген, VEGF ген, EGFR ген, Cyclin A ген, Cyclin E ген, WNT-1 ген, beta-катенин ген, c-MET ген, PKC ген, NFkB ген, STAT3 ген, сурвивин ген, Her2/Neu ген, SORT1 ген, XBP1 ген, топоизомеразы I ген, топоизомеразы II alpha ген, p73 ген, p21(WAF1/CIP1) ген, p27(KIP1) ген, PPM1D ген, RAS ген, кавеолин I ген, MIB I ген, MTA1 ген, M68 ген, опухолевый супрессорный ген и p53 опухолевый супрессорный ген.

54. Способ по п. 53, отличающийся тем, что ген-мишень содержит одну или несколько мутаций.

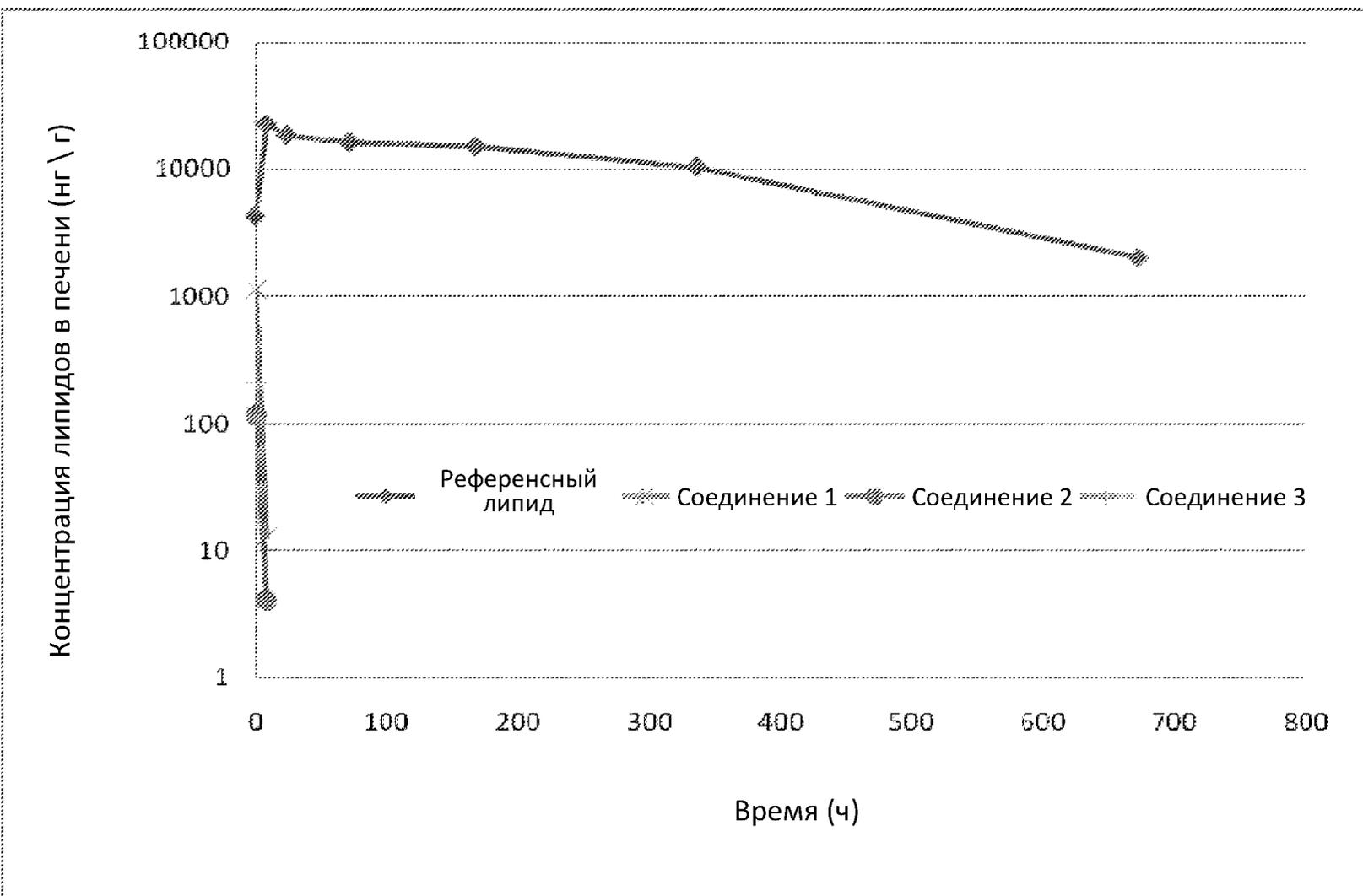
55. Способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты, включающий введение нуклеиновой липидной частицы, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты и катионный липид, катионный липид имеющий

(i) центральный атом углерода,

(ii) азотсодержащую головную группу, непосредственно связанную с центральным атомом, и

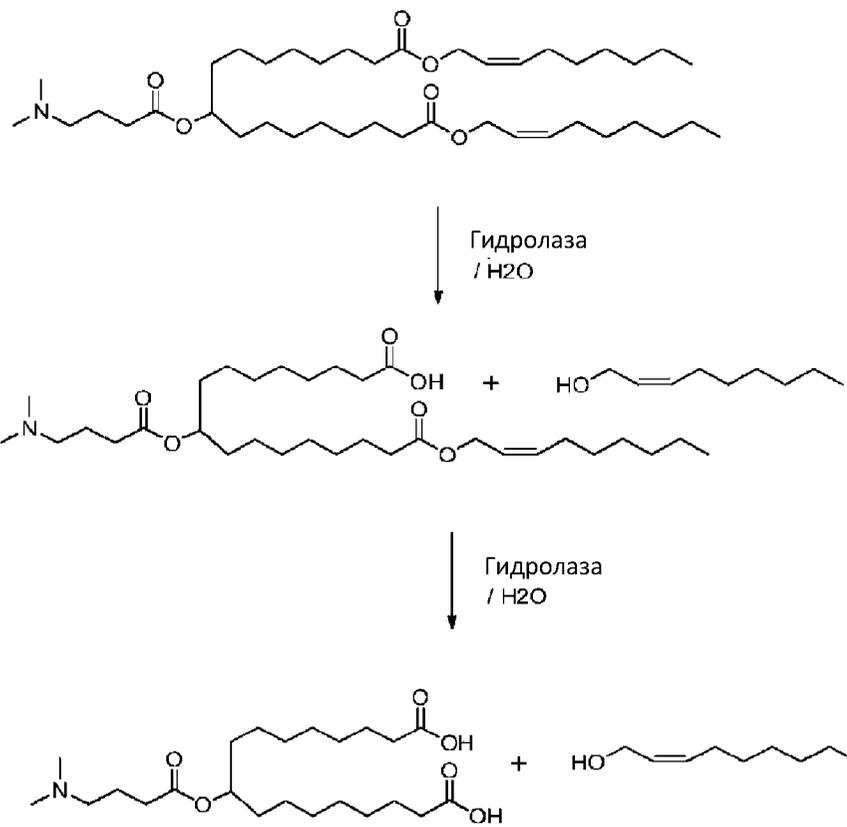
(iii) два гидрофобных хвоста, непосредственно связанных с центральным атомом углерода, где каждый гидрофобный хвост содержит  $C_{14}$  или более алифатическую группу, присоединенную к центральному атому углерода, где алифатическая группа (a) является разрываемой биоразлагаемой группой, такой, что существует цепочка по меньшей мере из четырех атомов углерода между биоразлагаемой терминальным конце гидрофобного хвоста, такую, что катионный липид остается нетронутым до доставки молекулы нуклеиновой кислоты, после чего расщепление гидрофобного хвоста происходит *in vivo*.

Фиг. 1

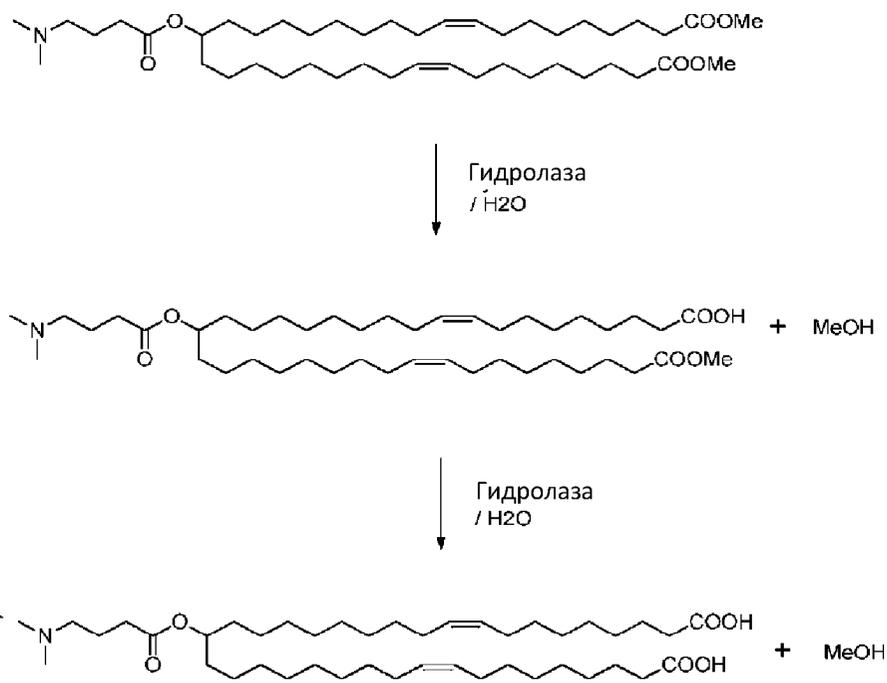


Фиг. 2

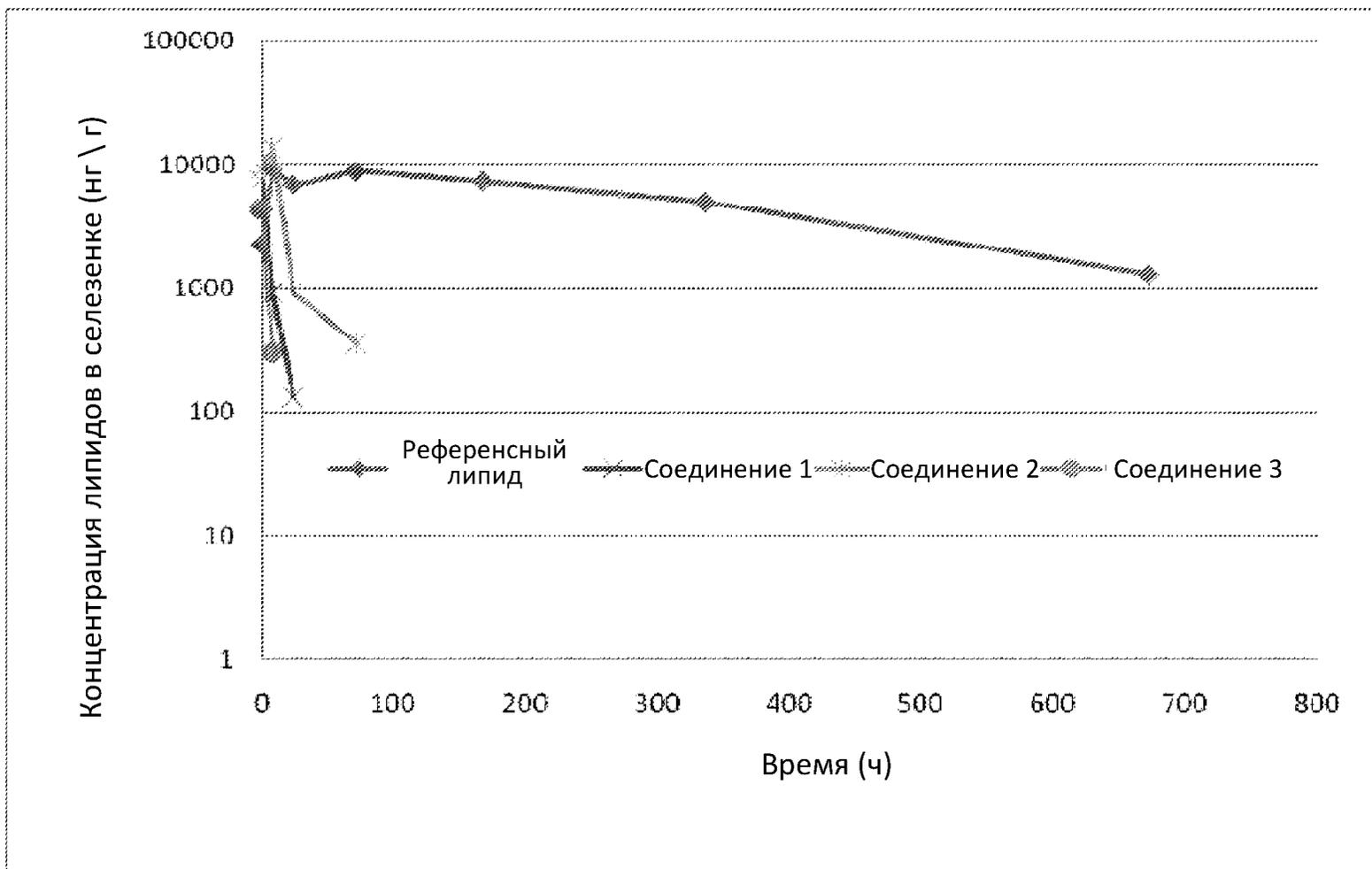
Соединение 1



Соединение 3



Фиг. 3



Фиг. 4

