

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202490837 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.05.28

(22) Дата подачи заявки  
2022.10.07

(51) Int. Cl. A61K 47/69 (2017.01)  
A61K 47/64 (2017.01)  
A61K 47/54 (2017.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 31/16 (2006.01)

(54) ПЕПТИДНЫЕ ДЕНДРОНЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/262,269

(32) 2021.10.08

(33) US

(86) PCT/IB2022/059608

(87) WO 2023/057975 2023.04.13

(71) Заявитель:  
АстраЗенека АБ (SE)

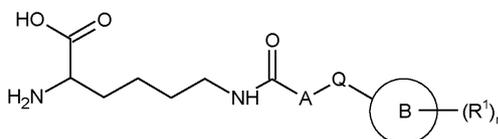
(72) Изобретатель:

Урелло Морган Одри, Кристи Роналд  
Джеймс, Воган Ханна (US)

(74) Представитель:

Билык А.В., Поликарпов А.В.,  
Соколова М.В., Путинцев А.И.,  
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев  
А.В., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Данное изобретение относится к пептидным дендронам, содержащим один или несколько остатков, полученных из модифицированного лизина формулы (I), фармацевтическим системам доставки, содержащим такие пептидные дендроны, фармацевтическим композициям, содержащим их, и к их применению в терапии.



202490837

A1

A1

202490837

## **ПЕПТИДНЫЕ ДЕНДРОНЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ**

Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета в отношении предварительной заявки на патент США № 63/262269, поданной 8 октября 2021 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

Настоящее изобретение относится к пептидным дендронам, содержащим один или несколько остатков, полученных из модифицированного лизина, и применению данных пептидных дендронов для доставки фармацевтически активных средств, в частности, генетического материала, в клетку. Настоящее изобретение также относится к применению данных пептидных дендронов в терапии.

### **ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Генная терапия представляет собой область медицины, которая фокусируется на терапевтической доставке (чужеродного) генетического материала (такого как ДНК и РНК) в клетки пациента с целью лечения болезни. На сегодняшний день несколько средств генной терапии, включая Luxturna® (слепота, вызванная мутацией RPE65) и Kymriah® (терапия Т-клетками с химерными антигенными рецепторами), получили одобрение регулирующих органов в отношении ряда различных медицинских состояний.

Доставка генов является процессом, применяемым для введения генетического материала в клетку. Для успешной доставки генетический материал должен оставаться стабильным во время транспортировки и, в конечном итоге, быть интернализованным в клетку-мишень. Если генетический материал представляет собой ДНК, он должен быть интернализован в клетку-мишень и доставлен в ядро. Для доставки генов требуется вектор, и подходящие векторы обычно делятся на две категории: вирусные и невирусные.

В опосредованной вирусом доставке генов используется способность вируса вводить свою ДНК внутрь клетки-хозяина. Генетический материал упаковывается в вирусную частицу с дефицитом репликации с образованием вирусного вектора. Способы с применением вирусов высокоэффективны, но могут вызывать иммунный ответ. Кроме того, с их помощью можно доставить в клетки только очень маленькие фрагменты генетического материала, их получение является трудоемким, а также существуют риски возникновения случайных сайтов вставки, цитопатических эффектов и мутагенеза.

Для вариантов применения, касающихся доставки генов, искусственные векторы имеют ряд преимуществ по сравнению с вирусами с точки зрения структурной универсальности и масштабируемости; и они могут быть разработаны исключительно и

специально для достижения одной необходимой цели. Эти материалы могут быть разработаны для упаковки генетического материала в наночастицы или везикулы, которые были сконструированы для преодоления биологических барьеров, ассоциированных с захватом клетками, транспортом в цитозоль и (при необходимости) доставкой в ядро. Обычный подход заключается в упаковке генетического материала в мультимолекулярные сборки с такими материалами, как полимеры, пептиды или липиды с положительными зарядами, которые ассоциированы с анионными нуклеиновыми кислотами. Электростатические взаимодействия между положительными и отрицательными зарядами приводят к самосборке в структуры нано- или микрочастиц, а размер и форма этих частиц могут контролироваться типом материала и условиями конденсации (Park *et al.* Adv Drug Del Rev, 2006, 58(4):467-86).

Включение ДНК, например в подходящий вектор, подобный наночастице, значительно улучшает захват ДНК клетками по сравнению с захватом ДНК в свободной форме. ДНК слишком велика и отрицательно заряжена, чтобы самостоятельно интернализироваться в клетки (которые также имеют чистый отрицательный заряд) с помощью пассивных процессов, таких как диффузия через клеточную мембрану. ДНК в свободной форме также имеет тенденцию запускать иммунный ответ, что приводит к ее разрушению. Включение ДНК в подходящий вектор может нейтрализовать ее отрицательный заряд и защитить ее от разрушения во внеклеточном пространстве.

Для эффективной интернализации вектора он должен быть транспортирован в клетку посредством процесса, называемого эндоцитозом. В ходе данного процесса вектор окружается участком клеточной мембраны, который затем отпочковывается внутрь клетки с образованием эндосомы. Вектор должен быть выполнен с возможностью протекания данного процесса, но при этом уменьшать вероятность захвата лизосомами, т. е. секвестрации в кислые компартменты лизосом, что связаны с мембраной. Одним из способов достижения этого является обеспечение разрывов эндосом до того, как может произойти перенос в лизосому. Это может быть достигнуто за счет буферизирующего действия вектора в отношении рН эндосомы (эндосома становится еще более кислой после захвата клеткой) до тех пор, пока полученный осмотический градиент не приведет к разрыву эндосомы и высвобождению генетического материала в цитоплазму, где он может быть доступен для транскрипции/трансляции. Подходящие векторные материалы с эффективной буферной емкостью в диапазоне буферизации эндосом (рН 7,4-рН 5,0) могут замедлять подкисление эндосомы за счет принятия протонов, что вызывает приток дополнительных протонов и противоионов из цитозоля.

Существующие искусственные системы доставки генов ограничены *in vivo* низкой стабильностью, высокой токсичностью и низкоэффективным проникновением генетического материала в цитоплазму. Конструирование многофункционального материала, подходящего для доставки генов, что позволяет достичь оптимального баланса между свойствами состава (размером, зарядом и т. д.), стабильностью, буферной емкостью и токсичностью при сохранении высокой эффективности доставки, оказалось затруднительным и сложным, но это значительно упростит получение итогового состава.

Пептидные дендроны (PD) представляют собой 3-мерные структуры, содержащие аминокислотные остатки, где боковую цепь одного из остатков, например  $\epsilon$ -амин лизина, используют для образования ветвлений или поколений, надстраивая молекулу до состояния 3D-макромолекулы. Пептидные дендроны, как правило, получают с применением твердофазного синтеза пептидов, что позволяет точно контролировать последовательность и геометрию аминокислотных остатков в пределах четко определенной структуры. Конечные продукты являются монодисперсными, с легко адаптируемыми свойствами (т. е. гидрофобностью, плотностью заряда и молекулярным весом), что обеспечивает многофункциональную оптимизацию и гибкость в применении.

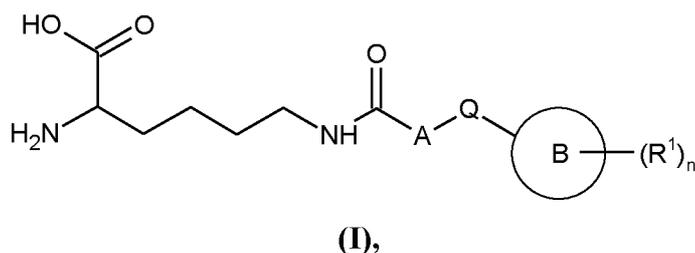
Пептидные дендроны широко исследовали, но производственные затраты и низкая протеолитическая стабильность препятствовали клиническому успеху. Kwok et al (ACS Nano, 2013 May 28;7(5):4668-82, doi: 10.1021/nn400343z и ChemBioChem, 2016, 17(23), 2223–2229) исследовали гибридные системы пептидных дендримеров/липидов в качестве реагентов для трансфекции ДНК и РНК, но были ограничены дипептидными ветвлениями вследствие ограничений синтеза, ограничивающих функциональность материала и эффективность *in vivo*.

В настоящей заявке описаны определенные пептидные дендроны, содержащие один или несколько остатков, полученных из модифицированного лизина. Данные пептидные дендроны i) обладают улучшенными буферными свойствами, отрегулированными для обеспечения протонирования во время перехода pH, который происходит во время интернализации в клетку и переноса в лизосому, ii) являются более стабильными благодаря увеличенному связыванию нуклеиновых кислот посредством электростатических и неэлектростатических (например, пи-пи стекинг) взаимодействий, iii) характеризуются повышенной биосовместимостью при использовании компонентов ядра на основе метаболитов, которые встречаются в природе и, вероятно, будут менее токсичными или иммуногенными, и/или iv) обеспечивают ответное высвобождение нуклеиновой кислоты посредством специфического внутриклеточного ферментативного разложения (катепсин-В). Они образуют наночастицы с несколькими форматами

нуклеиновых кислот, включая плазмидные ДНК, мРНК, siRNA и антисмысловые олигонуклеотиды (ASO) (~25-100 нм, сферы, палочки и тороиды), и демонстрируют более высокую стабильность в сыворотке крови и пролонгированную циркуляцию в крови после внутривенной инъекции мышам без проявления ассоциированной с этим токсичности. Они продемонстрировали способность обеспечивать успешную доставку и/или совместную доставку широкого спектра форматов нуклеиновых кислот, включая ДНК, мРНК, siRNA и ASO, и защиту инкапсулированного генетического материала, не так легко диссоциируя, пока находятся внутри клетки. Более того, совместная доставка РНК/ДНК в одной и той же наночастице позволяет контролировать кинетику экспрессии белка, экспрессию синергических терапевтических средств и обеспечивает расширение применения наночастиц в областях, где требуется несколько компонентов, таких как CRISPR.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном изобретении, в частности, описан пептидный дендрон, содержащий один или несколько остатков, полученных из модифицированного лизина формулы (I):



где

**A** представляет собой связь, C<sub>1-6</sub>-алкилен, карбоциклил или гетероциклил, при этом указанный карбоциклил или гетероциклил может быть необязательно замещен при атоме углерода одним или несколькими R<sup>2</sup>, и при этом, если указанный гетероциклил содержит фрагмент -NH-, то атом азота может быть необязательно замещен группой, выбранной из R<sup>A</sup>;

**Q** представляет собой связь, карбоциклил или гетероциклил; при этом указанный карбоциклил или гетероциклил может быть необязательно замещен при атоме углерода одним или несколькими R<sup>3</sup>, и при этом, если указанный гетероциклил содержит фрагмент -NH-, то атом азота может быть необязательно замещен группой, выбранной из R<sup>B</sup>;

**кольцо B** представляет собой морфолинил или тиоморфолинил, при этом, если указанный морфолинил или тиоморфолинил содержит фрагмент -NH-, то атом азота может быть необязательно замещен группой, выбранной из R<sup>C</sup>;

каждый из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> независимо выбран из галогена, нитро, циано, гидрокси, трифторметокси, трифторметила, amino, карбокси, карбамоила, меркапто, сульфоамила,

метила, этила, метокси, этокси, ацетила, ацетокси, метиламино, этиламино, диметиламино, диэтиламино, N-метил-N-этиламино, ацетиламино, N-метилкарбамоила, N-этилкарбамоила, N,N-диметилкарбамоила, N,N-диэтилкарбамоила, N-метил-N-этилкарбамоила, метилтио, этилтио, метилсульфинила, этилсульфинила, мезила, этилсульфонила, метоксикарбонила, этоксикарбонила, N-метилсульфамоила, N-этилсульфамоила, N,N-диметилсульфамоила, N,N-диэтилсульфамоила и N-метил-N-этилсульфамоила;

**n** составляет 0-4;

**R<sup>A</sup>**, **R<sup>B</sup>** и **R<sup>C</sup>** независимо выбраны из метила, этила, пропила, изопропила, ацетила, мезила, этилсульфонила, метоксикарбонила, этоксикарбонила, пропоксикарбонила, бутоксикарбонила, карбамоила, N-метилкарбамоила, N-этилкарбамоила, N,N-диметилкарбамоила, N,N-диэтилкарбамоила и N-метил-N-этилкарбамоила.

В данном изобретении также описан, в частности, пептидный дендрон, описанный в данном документе, для применения в доставке фармацевтически активного средства в клетку.

В данном изобретении также описана, в частности, фармацевтическая композиция, которая содержит один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе, и фармацевтически активное средство.

В данном изобретении также описан, в частности, способ генной терапии, который включает введение указанному животному эффективного количества фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

Многие варианты осуществления подробно раскрыты на всем протяжении настоящего описания и будут понятны читателю, являющемуся специалистом в данной области техники. Настоящее изобретение не следует интерпретировать как ограниченное каким-либо из перечисленных вариантов осуществления.

Формы единственного числа означают “по меньшей мере один”. В любом варианте осуществления, где формы единственного числа применяются для обозначения указанного материала или элемента, формы единственного числа могут означать “один”.

“Содержащий” означает, что указанный материал или элемент может содержать другие материалы или элементы. В любом варианте осуществления, где упомянуто “содержащий”, указанный материал или элемент может иметь в составе по меньшей мере 1% вес/вес, по меньшей мере 5% вес/вес, по меньшей мере 10% вес/вес, по меньшей мере 20% вес/вес, по меньшей мере 30% вес/вес или по меньшей мере 40% вес/вес данного материала или элемента. “Содержащий” также может означать “состоящий из” (или

“состоит из”) или “состоящий по сути из” (или “состоит по сути из”) указанного материала или элемента.

“Состоящий из” или “состоит из” означает, что указанный материал или элемент полностью сформирован из данного материала или элемента. В любом варианте осуществления, где указано “состоящий из” или “состоит из”, упомянутый материал или элемент может иметь в составе 100% вес/вес данного материала или элемента.

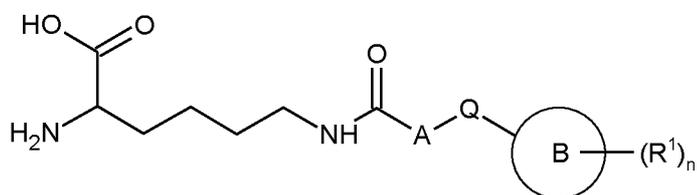
“По сути состоящий из” или “по сути состоит из” означает, что приведенный материал или элемент практически полностью состоит из данного материала или элемента. В любом варианте осуществления, где упомянуто “по сути состоящий из” или “по сути состоит из”, приведенный материал или элемент может иметь в составе по меньшей мере 50% вес/вес, по меньшей мере 60% вес/вес, по меньшей мере 70% вес/вес, по меньшей мере 80% вес/вес, по меньшей мере 90% вес/вес, по меньшей мере 95% вес/вес или по меньшей мере 99% вес/вес данного материала или элемента.

В любом варианте осуществления, где для определения материала или элемента применяют “представляет собой” или “может представлять собой”, “представляет собой” или “может представлять собой” могут означать, что материал или элемент “состоит из” или “состоит по сути из” данного материала или элемента.

В любом варианте осуществления данного описания, где упомянуто “приблизительно”, “приблизительно” может означать +/- 0 (т. е. без отклонения), +/- 0,01, +/- 0,05, +/- 0,1, +/- 0,5, +/- 1, +/- 2, +/-5, +/- 10 или +/- 20 процентов от указанного числа. Если указано число, в дополнительном варианте осуществления оно дополнительно относится к приближенному значению от указанного числа.

Пункты формулы изобретения являются вариантами осуществления.

В данном документе раскрыт пептидный дендрон, содержащий один или несколько остатков, полученных из модифицированного лизина формулы (I):



(I),

где A, Q, B, R<sup>1</sup> и n являются такими, как описано в данном документе.

В одном варианте осуществления A представляет собой связь.

В одном варианте осуществления A представляет собой C<sub>1-6</sub>алкилен.

В одном варианте осуществления A представляет собой метилен.

В одном варианте осуществления А представляет собой карбоциклил, при этом указанный карбоциклил может быть необязательно замещен при атоме углерода одним или несколькими  $R^2$ .

В одном варианте осуществления А представляет собой гетероциклил, при этом указанный гетероциклил может быть необязательно замещен при атоме углерода одним или несколькими  $R^2$ , и при этом, если указанный гетероциклил содержит фрагмент -NH-, то атом азота может быть необязательно замещен группой, выбранной из  $R^A$ .

В одном варианте осуществления А представляет собой гетероциклил.

В одном варианте осуществления А представляет собой пиридил.

В одном варианте осуществления А представляет собой связь,  $C_{1-6}$ алкилен или гетероциклил.

В одном варианте осуществления А представляет собой связь, метилен или пиридил.

В одном варианте осуществления Q представляет собой связь.

В одном варианте осуществления Q представляет собой карбоциклил, при этом указанный карбоциклил может быть необязательно замещен при атоме углерода одним или несколькими  $R^3$ .

В одном варианте осуществления Q представляет собой гетероциклил, при этом указанный гетероциклил может быть необязательно замещен при атоме углерода одним или несколькими  $R^3$ , и при этом, если указанный гетероциклил содержит фрагмент -NH-, то атом азота может быть необязательно замещен группой, выбранной из  $R^B$ .

В одном варианте осуществления кольцо В представляет собой морфолинил.

В одном варианте осуществления кольцо В представляет собой морфолинил, при этом, если указанный морфолинил содержит фрагмент -NH-, то атом азота может быть необязательно замещен группой, выбранной из  $R^C$ .

В одном варианте осуществления кольцо В представляет собой тиоморфолинил.

В одном варианте осуществления кольцо В представляет собой тиоморфолинил, при этом, если указанный тиоморфолинил содержит фрагмент -NH-, то атом азота может быть необязательно замещен группой, выбранной из  $R^C$ .

В одном варианте осуществления  $R^1$  представляет собой галоген.

В одном варианте осуществления n равняется 0.

В одном варианте осуществления n равняется 1.

В одном варианте осуществления n равняется 2.

В одном варианте осуществления n равняется 3.

В одном варианте осуществления n равняется 4.

В одном варианте осуществления представлен пептидный дендрон, содержащий один или несколько остатков, полученных из модифицированного лизина формулы **(I)**, где:

A представляет собой связь, C<sub>1-6</sub>-алкилен или гетероциклил;

Q представляет собой связь;

кольцо B представляет собой морфолинил или тиоморфолинил; и

n равняется 0.

В одном варианте осуществления представлен пептидный дендрон, содержащий один или несколько остатков, полученных из модифицированного лизина формулы **(I)**, где:

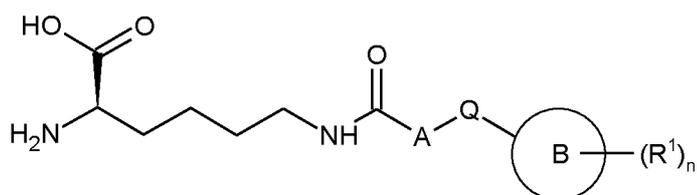
A представляет собой связь, метилен или пиридил;

Q представляет собой связь;

кольцо B представляет собой морфолинил или тиоморфолинил; и

n равняется 0.

В одном варианте осуществления модифицированный лизин формулы **(I)** представляет собой модифицированный лизин формулы **(IA)**:

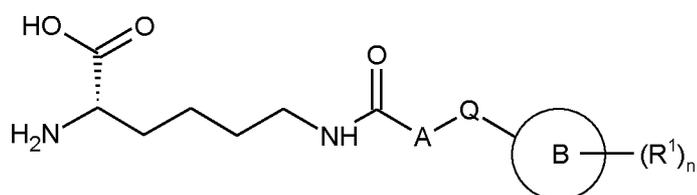


**(IA)**,

где A, Q, B, R<sup>1</sup> и n являются такими, как описано в данном документе.

Модифицированный лизин формулы **(IA)** может также называться модифицированным D-лизином.

В одном варианте осуществления модифицированный лизин формулы **(I)** представляет собой модифицированный лизин формулы **(IB)**:



**(IB)**,

где A, Q, B, R<sup>1</sup> и n являются такими, как описано в данном документе.

Модифицированный лизин формулы **(IB)** может также называться модифицированным L-лизином.

В одном варианте осуществления модифицированный лизин формулы **(I)** выбран из:

2-амино-6-{{6-(морфолин-4-ил)пиридин-3-карбонил}амино}гексановой кислоты;

2-амино-6-[(тиоморфолин-3-карбонил)амино]гексановой кислоты и

2-амино-6-[2-(морфолин-4-ил)ацетамидо]гексановой кислоты.

В одном варианте осуществления модифицированный лизин формулы (I) выбран из: (R)-2-амино-6-{[6-(морфолин-4-ил)пиридин-3-карбонил]амино}гексановой кислоты, (R)-2-амино-6-[(тиоморфолин-3-карбонил)амино]гексановой кислоты и (R)-2-амино-6-[2-(морфолин-4-ил)ацетамидо]гексановой кислоты.

В одном варианте осуществления модифицированный лизин формулы (I) выбран из: (S)-2-амино-6-{[6-(морфолин-4-ил)пиридин-3-карбонил]амино}гексановой кислоты; (S)-2-амино-6-[(тиоморфолин-3-карбонил)амино]гексановой кислоты и (S)-2-амино-6-[2-(морфолин-4-ил)ацетамидо]гексановой кислоты.

Применяемый в данном документе термин “замещенный”, если он относится к химической группе, означает химическую группу, содержащую один или несколько атомов водорода, которые удалены и замещены заместителями. Применяемый в данном документе термин “заместитель” имеет стандартное значение, известное в уровне техники, и относится к химической структурной единице, ковалентно присоединенной к исходной группе. Применяемый в данном документе термин “необязательно замещенный” означает, что химическая группа может не иметь заместителей (т. е. является незамещенной) или может иметь один или несколько заместителей (т. е. является замещенной). Следует понимать, что замещение при конкретном атоме ограничено валентностью. В случае, когда необязательные заместители выбраны из перечня групп, следует понимать, что данное определение включает все заместители, выбранные из одной из указанных групп, или заместители, выбранные из двух или более указанных групп. В случае, когда могут присутствовать несколько одинаковых заместителей, например  $R^2$ , следует понимать, что данное определение также предусматривает, что все такие заместители выбраны из одной из указанных групп или заместители выбраны из двух или более указанных групп.

Применяемый в данном документе термин “ $C_{i-j}$ ” обозначает диапазон количества атомов углерода, при этом  $i$  и  $j$  представляют собой целые числа, диапазон количества атомов углерода включает конечные точки (т. е.  $i$  и  $j$ ) и каждое целое число между ними, и при этом  $j$  больше, чем  $i$ . Например,  $C_{1-6}$  обозначает диапазон от одного до шести атомов углерода, включая один атом углерода, два атома углерода, три атома углерода, четыре атома углерода, пять атомов углерода и шесть атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления термин “ $C_{1-6}$ ” означает от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2 атомов углерода.

Применяемый в данном документе термин “алкил”, либо как часть другого термина, либо при использовании независимо, относится к насыщенной углеводородной цепи.

Вышеупомянутая углеводородная цепь может быть прямой цепью или разветвленной цепью. Термин “C<sub>i-j</sub>алкил” относится к алкилу, содержащему от *i* до *j* атомов углерода. Примеры C<sub>1-6</sub>алкила включают без ограничения метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, изобутил, втор-бутил; высшие гомологи, такие как 2-метил-1-бутил, н-пентил, 3-пентил, н-гексил, 1,2,2-триметилпропил и т. п. Ссылки на такие группы, как “бутил”, без дополнительного уточнения относятся ко всем формам бутила, например, н-бутилу, трет-бутилу и т. д.

Применяемый в данном документе термин “алкилен”, либо как часть другого термина, либо при использовании независимо, относится к насыщенную углеводородной цепи. Вышеупомянутая углеводородная цепь может быть прямой цепью или разветвленной цепью. Термин “C<sub>i-j</sub>алкилен” относится к алкилу, содержащему от *i* до *j* атомов углерода. Примеры C<sub>1-6</sub>алкилена включают без ограничения метилен (-CH<sub>2</sub>-), этилен (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), пропилен (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), бутилен (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>- и т. д.) и т. п.

Применяемый в данном документе термин “галоген” относится к фтору, хлору, бром и йоду.

“Гетероцикл” представляет собой насыщенное, частично насыщенное или ненасыщенное моно- или бициклическое кольцо, содержащее 4-12 атомов, из которых по меньшей мере один атом выбран из атома азота, серы или кислорода, которое, если не указано иное, может быть соединено атомом углерода или азота, где группа -CH<sub>2</sub>- может быть необязательно замещена с помощью -C(O)-, и атом серы кольца может являться необязательно окисленным с образованием S-оксидов. Примеры и подходящие значения термина “гетероцикл” представляют собой морфолино, пиперидил, пиридил, пиранил, пирролил, пиразолил, изотиазолил, индолил, хинолил, тиенил, 1,3-бензодиоксолил, тиадiazолил, пиперазинил, тиазолидинил, пирролидинил, тиоморфолино, пирролинил, гомопиперазинил, 3,5-диоксапиперидинил, тетрагидропиранил, имидазолил, пиримидил, пиразинил, пиридазинил, изоксазолил, N-метилпирролил, 4-пиридон, 1-изохинолон, 2-пирролидон и 4-тиазолидон. Конкретным примером термина “гетероцикл” является пиридил. В одном варианте осуществления “гетероцикл” представляет собой насыщенное, частично насыщенное или ненасыщенное моноциклическое кольцо, содержащее 5 или 6 атомов, из которых по меньшей мере один атом выбран из атома азота, серы или кислорода, причем, если не указано иное, оно может быть соединено атомом углерода или азота, группа -CH<sub>2</sub>- может быть необязательно замещена с помощью -C(O)-, и атом серы в кольце может являться необязательно окисленным с образованием S-оксидов.

“Карбоциклил” представляет собой насыщенное, частично насыщенное или ненасыщенное моно- или бициклическое углеродное кольцо, которое содержит 3-12 атомов, где группа  $-CH_2-$  может быть необязательно замещена с помощью  $-C(O)-$ . В одном варианте осуществления “карбоциклил” представляет собой моноциклическое кольцо, содержащее 5 или 6 атомов, или бициклическое кольцо, содержащее 9 или 10 атомов. Подходящие значения для “карбоциклила” включают циклопропил, циклобутил, 1-оксоциклопентил, циклопентил, циклопентенил, циклогексил, циклогексенил, фенил, нафтил, тетралинил, инданил или 1-оксоинданил. Конкретным примером “карбоциклила” является фенил.

“Соединения” по настоящему изобретению охватывают все изотопы атомов в соединениях. Изотопы атома включают атомы, характеризующиеся одинаковым атомным числом, но разными значениями массового числа. Например, если не указано иное, водород, углерод, азот, кислород, фосфор, сера, фтор, хлор, бром или йод в “соединении” по настоящему изобретению также подразумевают их изотопы, такие как без ограничения  $^1H$ ,  $^2H$ ,  $^3H$ ,  $^{11}C$ ,  $^{12}C$ ,  $^{13}C$ ,  $^{14}C$ ,  $^{14}N$ ,  $^{15}N$ ,  $^{16}O$ ,  $^{17}O$ ,  $^{18}O$ ,  $^{31}P$ ,  $^{32}P$ ,  $^{32}S$ ,  $^{33}S$ ,  $^{34}S$ ,  $^{36}S$ ,  $^{17}F$ ,  $^{19}F$ ,  $^{35}Cl$ ,  $^{37}Cl$ ,  $^{79}Br$ ,  $^{81}Br$ ,  $^{127}I$  и  $^{131}I$ . В некоторых вариантах осуществления водород включает протий, дейтерий и тритий. В некоторых вариантах осуществления водород относится к протию. В некоторых вариантах осуществления водород относится к дейтерию. В некоторых вариантах осуществления водород относится к тритию. В некоторых вариантах осуществления термин “замещенный дейтерием” или “замещенный с помощью дейтерия” используется для замены другой изоформы водорода (например, протия) в химической группе на дейтерий. В некоторых вариантах осуществления углерод включает  $^{12}C$  и  $^{13}C$ .

#### *Остаток*

Аминокислоты в описанных в данном документе пептидных дендронах связаны вместе с образованием цепи посредством пептидных связей между  $\alpha$ -аминогруппами и карбоксильными группами. После присоединения к цепи отдельная аминокислота называется “остатком”. “Остаток” получен из аминокислоты. “Остаток” также можно применять для описания концевой аминокислоты, связанной только посредством  $\alpha$ -аминогруппы или карбоксильной группы; при этом необязательно концевая аминокислотная группа представляет собой модифицированную аминокислотную группу, или концевая карбоксильная группа представляет собой модифицированную карбоксильную группу (как описано в данном документе ниже). Ссылки на конкретные аминокислоты в данном документе (например “лизин”) могут относиться к самой аминокислоте или остатку, в зависимости от контекста.

#### *Модифицированный лизин*

В любом варианте осуществления, где упоминаются модифицированные лизины или остатки, полученные из модифицированного лизина, они относятся к лизинам, модифицированным в соответствии с формулой (I) и ее вариантами осуществления.

В любом варианте осуществления, где упоминаются модифицированный лизин или остатки, полученные из модифицированного лизина, это может относиться к модифицированному D-лизину.

В любом варианте осуществления, где упоминаются модифицированный лизин или остатки, полученные из модифицированного лизина, это может относиться к модифицированному L-лизину.

### *Солевые формы*

В любом варианте осуществления, где упоминаются пептидные дендроны, это может относиться к пептидным дендронам в солевой форме.

Применяемый в данном документе термин “солевая форма” относится к производным пептидных дендронов, описанных в данном документе, где исходное соединение модифицировано путем превращения одного или нескольких имеющихся кислотных фрагментов (например, карбоксил и т. п.) и/или основных фрагментов (например, амин, щелочь и т. п.) в их солевую форму. Во многих случаях соединения по настоящему изобретению способны образовывать кислые и/или основные соли благодаря наличию amino- и/или карбоксильных групп или групп, подобных им. Конкретная солевая форма представляет собой фармацевтически приемлемую соль. Применяемый в данном документе термин “фармацевтически приемлемая соль” представляет собой соль, которая безопасна и эффективна для применения у млекопитающих, в частности, у людей.

Подходящие солевые формы пептидного дендрона, описанного в данном документе, включают, например, соль присоединения кислоты, которая может быть получена из, например, неорганической кислоты (например, хлористоводородной, бромистоводородной, серной, азотной, фосфорной кислоты и т. п.) или органической кислоты (например, муравьиной, уксусной, пропионовой, гликолевой, щавелевой, малеиновой, малоновой, янтарной, фумаровой, винной, тримезиновой, лимонной, молочной, фенилуксусной, бензойной, миндальной, метансульфоновой, нападизиловой, этансульфоновой, толуолсульфоновой, трифторуксусной, салициловой, сульфосалициловой кислот и т. п.). Конкретной солью присоединения кислоты является гидрохлорид.

Подходящие солевые формы пептидного дендрона, описанного в данном документе, включают, например, соль присоединения основания, которая может быть получена из, например, неорганических оснований (например, натриевая, калиевая, аммониевая соли и

гидроксид, карбонат, бикарбонатные соли металлов из столбцов I-XII периодической таблицы элементов, таких как кальций, магний, железо, серебро, цинк, медь и т. п.) или органических оснований (например, первичных, вторичных и третичных аминов, замещенных аминов, в том числе встречающихся в природе замещенных аминов, циклических аминов, основных ионообменных смол и т. п.). Некоторые органические амины включают без ограничения изопропиламин, бензатин, холинат, диэтанолламин, диэтиламин, лизин, меглумин, пиперазин и трометамин. Перечни дополнительных подходящих солей можно найти, например, в “Remington's Pharmaceutical Sciences”, 20th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985) и в “Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use” за авторством Stahl и Wermuth (Wiley-VCH, Вайнхайм, Германия, 2002).

*Терминология в отношении пептидных дендронов, применяемая в данном документе*

В настоящей заявке описаны пептидные дендроны, содержащие один или несколько остатков, полученных из модифицированного лизина формулы **(I)**, описанной в данном документе. Когда в данном документе упоминается пептидный дендрон, это относится к 3-мерной структуре, содержащей аминокислотные остатки, где боковая цепь одного из остатков, например  $\epsilon$ -амин лизина, образует точку ветвления, создавая последующие поколения, надстраивая таким образом молекулу до состояния 3D-макромолекулы. Пептидные дендроны содержат по меньшей мере одну точку ветвления, образуя нелинейную молекулу по меньшей мере первого поколения (G1).

В данном документе применяется следующая терминология.

- **Поколение 0:** последовательность аминокислотных остатков, предшествующая первой точке ветвления в пептидном дендроне.
- **Точка ветвления:** аминокислотный остаток с боковой цепью, которая модифицирована посредством добавления аминокислотного остатка, который дает начало новому поколению.
- **Поколения:** аминокислотные остатки между точками ветвления, при этом каждая из последующих серий поколений имеет порядковый номер (G1, G2, G3...).
- **Нацеливающая группа:** фрагмент, характеризующийся аффинностью в отношении конкретного типа клеток или органа, например, на основе сахара, малой молекулы, пептида и/или антитела.

В соответствии с общепринятыми правилами, в пептидах сначала изображают N-концевую аминокислоту, а в конце C-концевую аминокислоту (пишется слева направо).

Лизин (LYS) относится к немодифицированному лизину, если не указано иное.

В любом варианте осуществления, где аминокислота может быть хиральной, это может относиться к D-аминокислоте.

В любом варианте осуществления, где аминокислота может быть хиральной, это может относиться к L-аминокислоте.

В любом варианте осуществления, где аминокислота может быть хиральной, данная аминокислота может представлять собой смесь L- и D- аминокислот.

#### *Пептидные дендроны*

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, это может относиться к пептидному дендрону, синтезированному посредством методик, которые позволяют точно контролировать его состав и чистоту. Подходящие методики включают твердофазный синтез пептидов.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, это может относиться к пептидному дендрону, где точки ветвления, поколение 0 и последующие поколения вместе содержат менее чем 120 аминокислотных остатков.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, это может относиться к пептидному дендрону, где точки ветвления, поколение 0 и последующие поколения вместе содержат менее чем 100 аминокислотных остатков.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, это может относиться к пептидному дендрону, где точки ветвления, поколение 0 и последующие поколения вместе содержат менее чем 80 аминокислотных остатков.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, это может относиться к пептидному дендрону, где точки ветвления, поколение 0 и последующие поколения вместе содержат менее чем 60 аминокислотных остатков.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, это может относиться к пептидному дендрону, где точки ветвления, поколение 0 и последующие поколения вместе содержат приблизительно 52 аминокислотных остатка.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, это может относиться к пептидному дендрону, где точки ветвления, поколение 0 и последующие поколения вместе содержат 52 аминокислотных остатка.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, пептидный дендрон может быть представлен в солевой форме.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, пептидный дендрон содержит один или несколько остатков, полученных из модифицированного лизина, определенного в данном документе, и один или несколько остатков лейцина.



В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, по меньшей мере одно поколение содержит один или несколько остатков, полученных из модифицированного лизина, определенного в данном документе, один или несколько остатков лейцина и один или несколько остатков лизина.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, по меньшей мере одно поколение содержит один или несколько остатков, полученных из модифицированного лизина, определенного в данном документе, один или несколько остатков аргинина и один или несколько остатков лейцина.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, поколение(поколения) содержит(содержат) один или несколько остатков, полученных из модифицированного лизина, определенного в данном документе, и один или несколько остатков лейцина.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, поколение(поколения) содержит(содержат) один или несколько остатков, полученных из модифицированного лизина, определенного в данном документе, и один или несколько остатков аргинина.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, поколение(поколения) содержит(содержат) один или несколько остатков, полученных из модифицированного лизина, определенного в данном документе, и один или несколько остатков лизина.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, поколение(поколения) содержит(содержат) один или несколько остатков, полученных из модифицированного лизина, определенного в данном документе, один или несколько остатков аргинина и один или несколько остатков лизина.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, поколение(поколения) содержит(содержат) один или несколько остатков, полученных из модифицированного лизина, определенного в данном документе, один или несколько остатков лейцина и один или несколько остатков лизина.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, поколение(поколения) содержит(содержат) один или несколько остатков, полученных из модифицированного лизина, определенного в данном документе, один или несколько остатков аргинина и один или несколько остатков лейцина.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, % аминокислот со значением pKa боковой цепи  $>7,4$  составляет 25-50%.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, % аминокислот со значением рКа боковой цепи  $>7,4$  составляет 25-30%.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, % аминокислот со значением рКа боковой цепи  $>7,4$  составляет 30-35%.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, % аминокислот со значением рКа боковой цепи  $>7,4$  составляет 35-40%.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, % аминокислот со значением рКа боковой цепи  $>7,4$  составляет 40-45%.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, % аминокислот со значением рКа боковой цепи  $>7,4$  составляет 45-50%.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, % аминокислот со значением рКа боковой цепи, равным 4,0-6,5, составляет 25-50%.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, % аминокислот со значением рКа боковой цепи, равным 4,0-6,5, составляет 25-30%.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, % аминокислот со значением рКа боковой цепи, равным 4,0-6,5, составляет 30-35%.

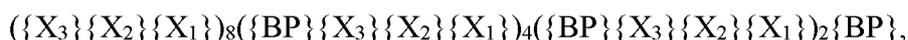
В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, % аминокислот со значением рКа боковой цепи, равным 4,0-6,5, составляет 35-40%.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, % аминокислот со значением рКа боковой цепи, равным 4,0-6,5, составляет 40-45%.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, % аминокислот со значением рКа боковой цепи, равным 4,0-6,5, составляет 45-50%.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, среди аминокислотных остатков последующих поколений % остатков со значением рКа боковой цепи  $>7,4$  составляет 25-50% и % остатков со значением рКа боковой цепи, равным 4,0-6,5, составляет 25-50%.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, пептидный дендрон предусматривает пептидный дендрон формулы (II):

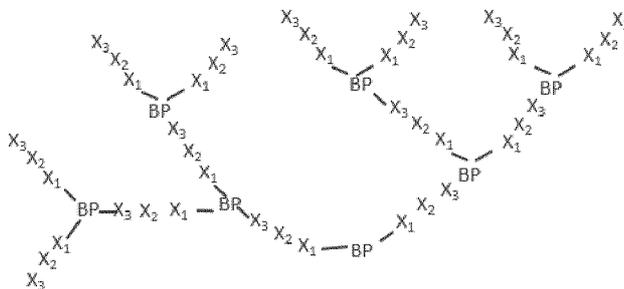


где

один из  $X_1$ ,  $X_2$  или  $X_3$  представляет собой основной аминокислотный остаток;  
 другой из  $X_1$ ,  $X_2$  или  $X_3$  представляет собой гидрофобный аминокислотный остаток;  
 оставшийся из  $X_1$ ,  $X_2$  или  $X_3$  представляет собой остаток, полученный из модифицированного лизина, определенного в данном документе, и

BP представляет собой аминокислотный остаток в точке ветвления.

В формуле (II) одна группа  $X_1$  присоединена к  $\alpha$ -амину аминокислоты ВР, а другая присоединена к реакционноспособной группе, например, аминогруппе, в боковой цепи, например, к  $\epsilon$ -амину лизина. Пептидные дендроны формулы (II) имеют следующую структуру:



В пептидных дендронах формулы (II) аминокислотный остаток  $X_1$  в пределах одного поколения может быть одинаковым или разным и/или аминокислотный остаток  $X_1$  в разных поколениях может быть одинаковым или разным. То же применимо к  $X_2$  и  $X_3$  соответственно.

В одном варианте осуществления  $X_1$  представляет собой основной аминокислотный остаток.

В одном варианте осуществления  $X_1$  представляет собой гидрофобный аминокислотный остаток.

В одном варианте осуществления  $X_1$  представляет собой остаток, полученный из модифицированного лизина, определенного в данном документе.

В одном варианте осуществления  $X_2$  представляет собой основной аминокислотный остаток.

В одном варианте осуществления  $X_2$  представляет собой гидрофобный аминокислотный остаток.

В одном варианте осуществления  $X_2$  представляет собой остаток, полученный из модифицированного лизина, определенного в данном документе.

В одном варианте осуществления  $X_3$  представляет собой основной аминокислотный остаток.

В одном варианте осуществления  $X_3$  представляет собой гидрофобный аминокислотный остаток.

В одном варианте осуществления  $X_3$  представляет собой остаток, полученный из модифицированного лизина, определенного в данном документе.

В одном варианте осуществления

$X_1$  представляет собой основной аминокислотный остаток;

$X_2$  представляет собой гидрофобный аминокислотный остаток, и  
 $X_3$  представляет собой остаток, полученный из модифицированного лизина, определенного в данном документе.

В одном варианте осуществления  
 $X_3$  представляет собой основной аминокислотный остаток;  
 $X_2$  представляет собой гидрофобный аминокислотный остаток, и  
 $X_1$  представляет собой остаток, полученный из модифицированного лизина, определенного в данном документе.

Один из  $X_1$ ,  $X_2$  или  $X_3$  представляет собой основной аминокислотный остаток. Основной аминокислотный остаток представляет собой аминокислотный остаток с боковой цепью, способной нести положительный заряд.

В одном варианте осуществления основной аминокислотный остаток выбран из аргинина, орнитина и лизина.

В одном варианте осуществления основной аминокислотный остаток представляет собой аргинин.

В одном варианте осуществления основной аминокислотный остаток представляет собой орнитин.

В одном варианте осуществления основной аминокислотный остаток представляет собой лизин.

В одном варианте осуществления  $X_1$  выбран из аргинина, орнитина и лизина.

В одном варианте осуществления  $X_1$  представляет собой аргинин.

В одном варианте осуществления  $X_1$  представляет собой орнитин.

В одном варианте осуществления  $X_1$  представляет собой лизин.

В одном варианте осуществления  $X_2$  выбран из аргинина, орнитина и лизина.

В одном варианте осуществления  $X_2$  представляет собой аргинин.

В одном варианте осуществления  $X_2$  представляет собой орнитин.

В одном варианте осуществления  $X_2$  представляет собой лизин.

В одном варианте осуществления  $X_3$  выбран из аргинина, орнитина и лизина.

В одном варианте осуществления  $X_3$  представляет собой аргинин.

В одном варианте осуществления  $X_3$  представляет собой орнитин.

В одном варианте осуществления  $X_3$  представляет собой лизин.

Один из  $X_1$ ,  $X_2$  или  $X_3$  представляет собой гидрофобный аминокислотный остаток. Гидрофобный аминокислотный остаток представляет собой аминокислотный остаток с боковой цепью, состоящей в основном из углерода и водорода, и имеет тенденцию отталкиваться от воды.



В одном варианте осуществления  $X_2$  представляет собой тирозин.

В одном варианте осуществления  $X_2$  представляет собой метионин.

В одном варианте осуществления  $X_2$  представляет собой валин.

В одном варианте осуществления  $X_3$  выбран из аланина, изолейцина, лейцина, фенилаланина, триптофана, тирозина, метионина и валина.

В одном варианте осуществления  $X_3$  представляет собой аланин.

В одном варианте осуществления  $X_3$  представляет собой изолейцин.

В одном варианте осуществления  $X_3$  представляет собой лейцин.

В одном варианте осуществления  $X_3$  представляет собой фенилаланин.

В одном варианте осуществления  $X_3$  представляет собой триптофан.

В одном варианте осуществления  $X_3$  представляет собой тирозин.

В одном варианте осуществления  $X_3$  представляет собой метионин.

В одном варианте осуществления  $X_3$  представляет собой валин.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, пептидный дендрон предусматривает пептидный дендрон формулы (II), определенной в данном документе, где:

$X_1$  представляет собой аргинин;

$X_2$  представляет собой лейцин;

$X_3$  представляет собой остаток, полученный из модифицированного лизина, определенного в данном документе, и

ВР представляет собой лизин.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, пептидный дендрон предусматривает пептидный дендрон формулы (II), определенной в данном документе, где:

$X_1$  представляет собой остаток, полученный из модифицированного лизина, определенного в данном документе;

$X_2$  представляет собой лейцин;

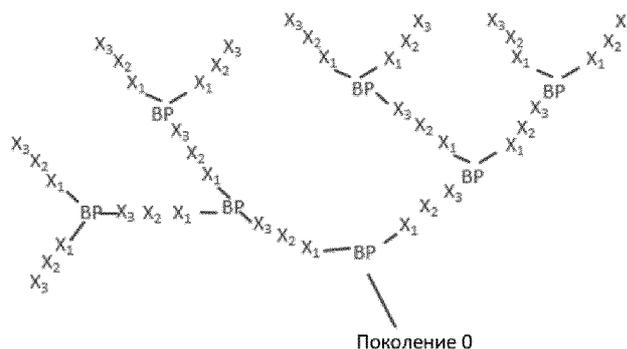
$X_3$  представляет собой аргинин, и

ВР представляет собой лизин.

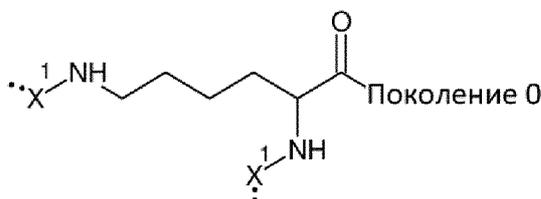
### *Поколение 0*

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, пептидный дендрон содержит последовательность аминокислотных остатков, которая называется “поколение 0”, присоединенную к аминокислоте в 1-й точке ветвления в пептидном дендроне. Последовательность аминокислотных остатков поколения 0 может располагаться на С-конце или N-конце, в частности, на С-конце. Например, пептидный

дендрон с последовательностью аминокислотных остатков поколения 0 может быть проиллюстрирован следующим образом:



Если 1-я точка ветвления представляет собой лизин, последовательность поколения 0 в вышеуказанном графическом изображении может быть присоединена следующим образом:



где “..” представляет собой остальную часть молекулы.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, пептидный дендрон содержит аминокислотную последовательность поколения 0 на С-конце аминокислоты в точке ветвления, предшествующей первому поколению.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, пептидный дендрон содержит аминокислотную последовательность поколения 0 на N-конце аминокислоты в точке ветвления, предшествующей первому поколению.

В любом варианте осуществления, где упоминается аминокислотная последовательность поколения 0, последовательность поколения 0 содержит один или несколько остатков глицина.

В любом варианте осуществления, где упоминается аминокислотная последовательность поколения 0, последовательность поколения 0 содержит остаток глицина.

В любом варианте осуществления, где упоминается аминокислотная последовательность поколения 0, последовательность поколения 0 содержит два остатка глицина.

В любом варианте осуществления, где упоминается аминокислотная последовательность поколения 0, последовательность поколения 0 содержит три остатка глицина.

В любом варианте осуществления, где упоминается аминокислотная последовательность поколения 0, последовательность поколения 0 содержит один или несколько остатков валина.

В любом варианте осуществления, где упоминается аминокислотная последовательность поколения 0, последовательность поколения 0 содержит остаток валина.

В любом варианте осуществления, где упоминается аминокислотная последовательность поколения 0, последовательность поколения 0 содержит один или несколько остатков цитруллина.

В любом варианте осуществления, где упоминается аминокислотная последовательность поколения 0, последовательность поколения 0 содержит остаток цитруллина.

В любом варианте осуществления, где упоминается аминокислотная последовательность поколения 0, последовательность поколения 0 содержит один или несколько остатков серина.

В любом варианте осуществления, где упоминается аминокислотная последовательность поколения 0, последовательность поколения 0 содержит остаток серина.

В любом варианте осуществления, где упоминается аминокислотная последовательность поколения 0, последовательность поколения 0 содержит один или несколько остатков цистеина.

В любом варианте осуществления, где упоминается аминокислотная последовательность поколения 0, последовательность поколения 0 содержит остаток цистеина.

В любом варианте осуществления, где упоминается аминокислотная последовательность поколения 0, последовательность поколения 0 может оканчиваться остатком цистеина. Концевой цистеин обеспечивает дополнительную функционализацию посредством химического взаимодействия с участием тиольной группы. В другом варианте осуществления последовательность поколения 0 может оканчиваться лизином, серином, тирозином и/или реакционноспособным производным аминокислоты, таким как азидофенилаланин. Другие реакционноспособные производные аминокислот включают те, которые содержат азидные, алкиновые, циклопентадиеновые и тетразиновые группы.

В любом варианте осуществления, где упоминается аминокислотная последовательность поколения 0, последовательность поколения 0 оканчивается остатком цистеина, где концевая карбоксильная группа была амидирована с образованием группы

$C(O)NH_2$ . Амидирование делает группу  $COOH$  инертной, снижает общий заряд пептида и обеспечивает лучшую имитацию природных пептидов.

В любом варианте осуществления, где упоминается аминокислотная последовательность поколения 0, последовательность поколения 0 содержит остатки глицина, валина, цитруллина, серина, аланина, лизина, фенилаланина и/или цистеина.

В любом варианте осуществления, где упоминается аминокислотная последовательность поколения 0, последовательность поколения 0 содержит остатки глицина, валина, цитруллина, серина и/или цистеина.

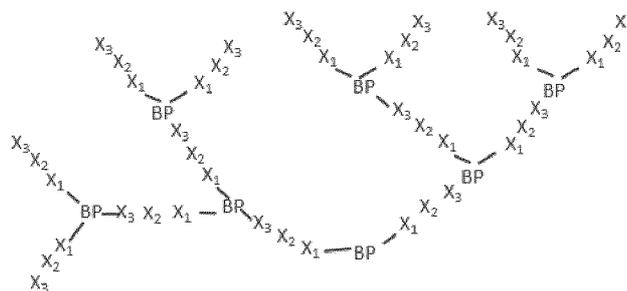
В любом варианте осуществления, где упоминается аминокислотная последовательность поколения 0, последовательность поколения 0 содержит остатки глицина, валина, цитруллина, серина и цистеина.

В любом варианте осуществления, где упоминается аминокислотная последовательность поколения 0, последовательность поколения 0 состоит из GLY-VAL-CIT-GLY-GLY-SER-CYS (SEQ ID NO: 5).

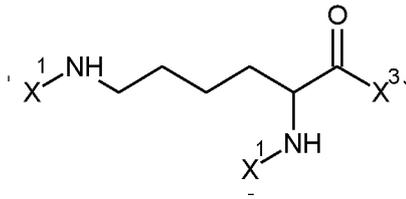
В любом варианте осуществления, где упоминается аминокислотная последовательность поколения 0, последовательность поколения 0 содержит последовательность VAL-CIT, VAL-ALA, LYS-PHE, GLY-GLY-PHE-GLY (SEQ ID NO: 1) или GLY-PHE-LEU-GLY (SEQ ID NO: 2).

#### *Точка ветвления*

Точка ветвления представляет собой аминокислотный остаток с боковой цепью, которая модифицирована посредством добавления аминокислотного остатка, который дает начало новому поколению. Точки ветвления на следующем графическом изображении отмечены как BP:



Если точка ветвления представляет собой лизин, то лизин может образовывать точки ветвления на вышеприведенном графическом изображении следующим образом:



где “..” представляет собой остальную часть молекулы.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, точки ветвления в пептидном дендроне могут представлять собой одинаковые или разные аминокислотные остатки.

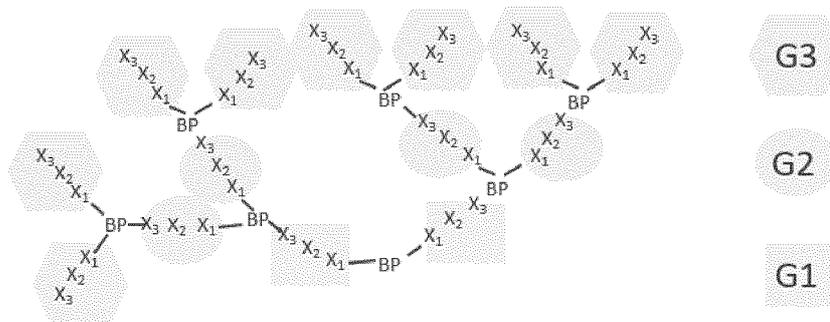
В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, точки ветвления в пептидном дендроне могут представлять собой одинаковые аминокислотные остатки.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, это может относиться к пептидному дендрону, где лизин образует одну или несколько точек ветвления.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, это может относиться к пептидному дендрону, где лизин образует все точки ветвления.

### Поколения

Пептидные дендроны содержат поколения. Поколения могут быть проиллюстрированы следующим образом:



где G1 представляет собой 1-е поколение, G2 2-е поколение и G3 3-е поколение, вместе называемые поколениями. Дополнительное поколение может быть добавлено посредством добавления дополнительной аминокислоты точки ветвления (BP) к концевым группам X<sub>3</sub> в поколении G3 с последующим добавлением последовательностей аминокислотных остатков поколения G4, например, дополнительных групп X<sub>3</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>1</sub> и т. д.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, это может относиться к пептидному дендрону, содержащему поколения, состоящие из 5 аминокислотных остатков.



В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, это может относиться к пептидному дендрону, содержащему поколения, состоящие из разных пептидных цепей.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, это может относиться к пептидному дендрону, содержащему поколения, состоящие из разных пептидных цепей в каждом поколении.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, это может относиться к пептидному дендрону, содержащему поколения, содержащие основной аминокислотный остаток.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, это может относиться к пептидному дендрону, содержащему поколения, содержащие гидрофобный аминокислотный остаток.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, это может относиться к пептидному дендрону, содержащему поколения, содержащие основной аминокислотный остаток и гидрофобный аминокислотный остаток.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, это может относиться к пептидному дендрону, содержащему поколения, содержащие основной аминокислотный остаток, гидрофобный аминокислотный остаток и остаток, полученный из модифицированного лизина, определенного в данном документе.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, это может относиться к пептидному дендрону, содержащему поколения, содержащие один или несколько остатков, полученных из модифицированного лизина, определенного в данном документе, и один или несколько остатков лейцина.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, это может относиться к пептидному дендрону, содержащему поколения, содержащие один или несколько остатков, полученных из модифицированного лизина, определенного в данном документе, и один или несколько остатков аргинина.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, это может относиться к пептидному дендрону, содержащему поколения, содержащие один или несколько остатков, полученных из модифицированного лизина, определенного в данном документе, один или несколько остатков аргинина и один или несколько остатков лейцина.

В любом варианте осуществления, где упоминается пептидный дендрон, это может относиться к пептидному дендрону, содержащему одно или несколько поколений, содержащих ARG-LEU-LYS(модифицированный), где LYS(модифицированный)



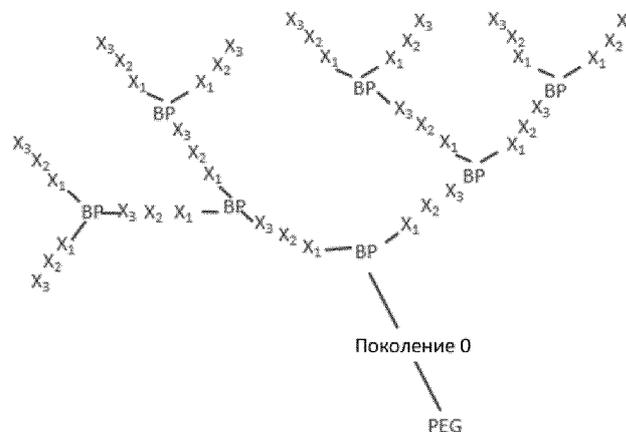


В дополнительном варианте осуществления пептидные дендроны, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать биологически совместимый гидрофильный полимер, например, полиэтиленгликолевую или полисаркозиновую группу.

Полиэтиленгликоль (PEG) представляет собой полимер, состоящий из повторяющихся субъединиц  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , где, как правило,  $n > 3$  и  $< 250$ . Как правило, его синтезируют с применением полимеризации оксида этилена с раскрытием кольца. Полимеры PEG могут быть линейными или разветвленными. Разветвленные PEG, как правило, содержат от трех до тридцати цепей PEG, исходящих из группы центрального ядра.

В одном варианте осуществления пептидные дендроны, описанные в данном документе, могут содержать полиэтиленгликолевую группу, называемую в данном документе “пептидный дендрон на основе полиэтиленгликоля” или “пептидный дендрон на основе PEG”. Группа PEG может способствовать стабилизации наночастицы и образовывать “стелс-слой”, который обеспечивает уменьшение неспецифических взаимодействий белков посредством стерического экранирования.

Группа PEG может быть присоединена, необязательно посредством линкерной группы, к концевому аминокислотному остатку в аминокислотной последовательности поколения 0 пептидного дендрона следующим образом:



Группа PEG может быть присоединена к пептидному дендрону посредством концевой группы  $-O-$  или посредством концевой группы  $-CH_2-$  PEG; и может быть присоединена к амину или карбокси концевому аминокислотному остатку в аминокислотной последовательности поколения 0, необязательно посредством линкерной группы. Группа PEG также может быть присоединена к реакционноспособной группе в боковой цепи концевому аминокислотному остатку, например, группе  $-SH$  в боковой цепи концевому цистеину, необязательно посредством линкерной группы, в частности, если концевая карбоксильная группа концевому цистеину также была амидирована.

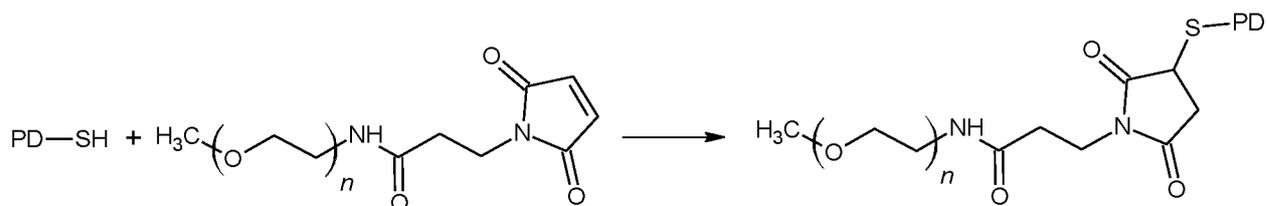
В любом варианте осуществления, где упоминаются пептидные дендроны на основе полиэтиленгликоля, могут присутствовать модификации на концевом участке группы

PEG, который не присоединен к пептидному дендрону, или концевой участок может быть представлен водородом. Подходящей модификацией концевого участка полиэтиленгликолевой группы является, например, C<sub>1</sub>-алкил, например, метил, или C<sub>1</sub>-алкокси, например, метокси.

В любом варианте осуществления, где упоминаются пептидные дендроны на основе полиэтиленгликоля, может присутствовать реакционноспособная группа на концевом участке группы PEG, который не присоединен к пептидному дендрону, или концевой участок может быть представлен водородом. Подходящие реакционноспособные группы включают малеимид, азид, алкин (например, C<sub>2</sub>-алкин) и циклопентадиен. Данная реакционноспособная группа может использоваться для присоединения таких частиц, как радиоактивные метки, красители и лиганды, нацеливающие на клетки, до или после конъюгации PEG с пептидным дендроном.

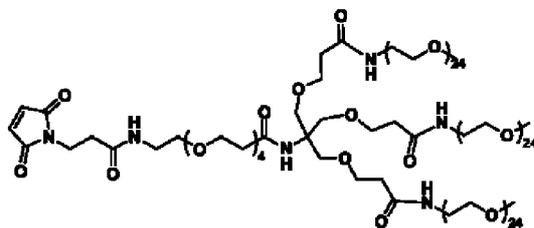
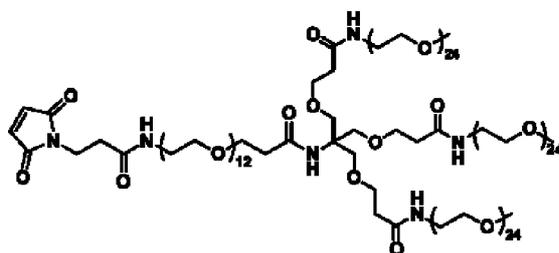
В любом варианте осуществления, где упоминаются пептидные дендроны на основе полиэтиленгликоля, между полиэтиленгликолевой группой и пептидным дендроном может присутствовать линкерная группа. Подходящая линкерная группа представляет собой C<sub>1</sub>-алкиламино, например, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-, при этом образуется, например, PEG-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-PD или PEG-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-PD; или C<sub>1</sub>-алкилен, например -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, при этом образуется, например, PEG-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-PD; где PD представляет собой пептидный дендрон.

В том случае, когда полиэтиленгликолевая группа присоединена к реакционноспособной группе в боковой цепи концевого аминокислотного остатка, например, группе -SH в боковой цепи концевого цистеина, для присоединения полиэтиленгликолевой группы могут применяться различные способы. Как правило, это приводит к тому, что полиэтиленгликолевая группа присоединяется к пептидному дендрону посредством линкерной группы. Например, полиэтиленгликоль, функционализированный функциональной группой 3-малеимидопропановой кислоты, соединенной с полиэтиленгликолем посредством амидной связи, представляет собой реагент, реакционноспособный в отношении тиола. Другой конец молекулы полиэтиленгликоля может быть представлен концевым метилом. Реакция с применением функционализированной полиэтиленгликолевой группы с такими характеристиками, приводящая к образованию линкерной группы между группой PEG и пептидным дендроном, может быть проиллюстрирована следующим образом:

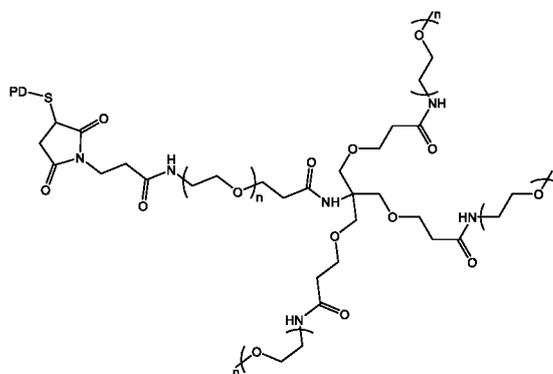


где “SH” в “PD-SH” относится к тиолу в боковой цепи цистеина, PD представляет собой пептидный дендрон, и “n” составляет количество повторяющихся субъединиц -  $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ .

Примеры дополнительных функционализированных групп PEG, содержащих разветвленную группу PEG, включают:



Примером такого пептидного дендрона, содержащего разветвленную группу PEG, является:



где n составляет количество повторяющихся субъединиц  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ , и где  $\sum_n$  (сумма всех объединенных групп n) составляет 4-250.

В любом варианте осуществления, где упоминается полиэтиленгликоль, это может относиться к полимеру с молекулярным весом в диапазоне 0,5-30 кДа.

В любом варианте осуществления, где упоминается полиэтиленгликоль, это может относиться к полимеру с молекулярным весом в диапазоне 2-20 кДа.

В любом варианте осуществления, где упоминается полиэтиленгликоль, это может относиться к полимеру с молекулярным весом в диапазоне 4-11 кДа.

В любом варианте осуществления, где упоминается полиэтиленгликоль, это может относиться к полимеру с молекулярным весом в диапазоне 1-6 кДа.

В любом варианте осуществления, где упоминается полиэтиленгликоль, это может относиться к полимеру с молекулярным весом в пределах приблизительно 2 кДа.

В любом варианте осуществления, где упоминается полиэтиленгликоль, это может относиться к полимеру с молекулярным весом в пределах приблизительно 5 кДа.

В любом варианте осуществления, где упоминается полиэтиленгликоль, это может относиться к полимеру с молекулярным весом в пределах приблизительно 10 кДа.

В любом варианте осуществления, где упоминается полиэтиленгликоль, это может относиться к полимеру, содержащему повторяющиеся субъединицы  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ , где  $n > 3$ .

В любом варианте осуществления, где упоминается полиэтиленгликоль, это может относиться к полимеру, содержащему повторяющиеся субъединицы  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ , где  $n > 10$ .

В любом варианте осуществления, где упоминается полиэтиленгликоль, это может относиться к полимеру, содержащему повторяющиеся субъединицы  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ , где  $n > 20$ .

В любом варианте осуществления, где упоминается полиэтиленгликоль, это может относиться к полимеру, содержащему повторяющиеся субъединицы  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ , где  $n > 30$ .

В любом варианте осуществления, где упоминается полиэтиленгликоль, это может относиться к полимеру, содержащему повторяющиеся субъединицы  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ , где  $n > 50$ .

В любом варианте осуществления, где упоминается полиэтиленгликоль, это может относиться к полимеру, содержащему повторяющиеся субъединицы  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ , где  $n > 100$ .

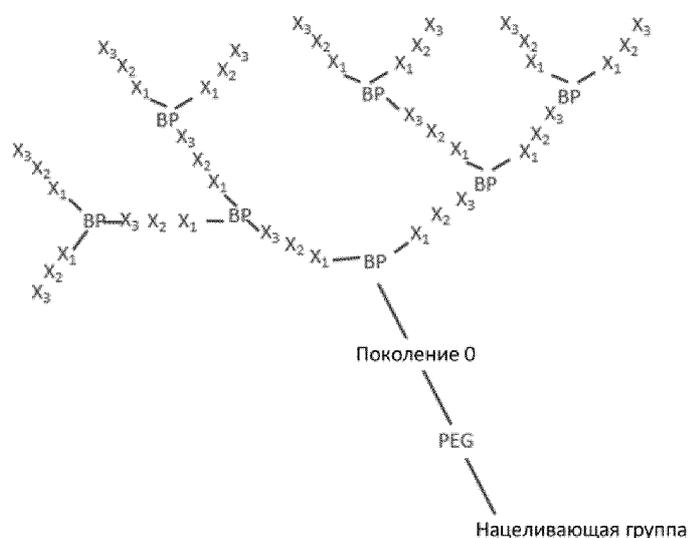
В любом варианте осуществления, где упоминается полиэтиленгликоль, это может относиться к полимеру, содержащему повторяющиеся субъединицы  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ , где  $n > 150$ .



В любом варианте осуществления, где упоминается полиэтиленгликоль, это может относиться к полимеру, содержащему повторяющиеся субъединицы  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ , где  $n < 10$ .

### Нацеливающая группа

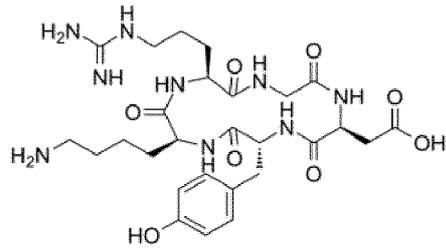
В дополнительном варианте осуществления пептидные дендроны, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать нацеливающую группу. Нацеливающие группы относятся к нацеливающим фрагментам, которые связываются с клеткой и/или способствуют интернализации в клетку. Нацеливающая группа может быть присоединена, необязательно посредством линкерной группы, к группе PEG пептидного дендрона следующим образом:



В любом варианте осуществления, где упоминается нацеливающая группа, нацеливающая группа может быть выбрана из пептидов, антител, сахаров или малых молекул.

Подходящие нацеливающие пептиды, которые могут быть присоединены к группе PEG, необязательно посредством линкерной группы, включают:

- пептиды, нацеливающие на рецептор трансферрина, например, **Ac-KTGGAWSIIDCSMNYCLYIEG** (SEQ ID NO: 3) (где выделенная жирным шрифтом “C” указывает на то, что цистеины сшиты посредством дисульфидных связей) (например, <https://doi.org/10.21954/ou.ro.0000d744>);
- циклические RGD-пептиды, например, нацеливающие на интегрин  $\alpha_3\beta_5$  в опухолях и воспаленной сосудистой системе, например, цикло(-Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys) (SEQ ID NO: 4):



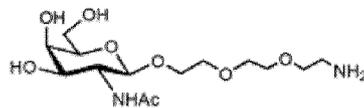
; и

- пептиды, нацеливающие на мышцы, например, ASSLNIA (SEQ ID NO: 6) (Т. I. Samoylova, B. F. Smith. *Muscle Nerve*. 1999 Apr; 22(4):460-6; doi: 10.1002/(sici)1097-4598(199904)22:4<460::aid-mus6>3.0.co;2-l).

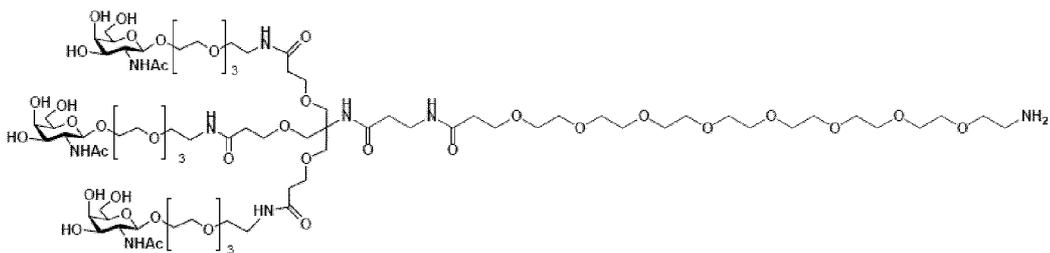
Подходящие нацеливающие антитела включают:

- антитела, нацеливающие на Т-клетки, например, Fab к CD3 (Van Wauwe et al. *J Immunol*, 1980, 124(6):2708-2713); и
- антитела, нацеливающие на кавеолы, например, мономерный FC Meca32 (например, антитела, описанные в Gabriela M. Marchetti, et al. *Commun Biol*. 2019; 2: 92; опубликована онлайн 7 марта 2019 г. doi: 10.1038/s42003-019-0337-2, и аналогичные).

Подходящие нацеливающие сахара включают сахара, нацеливающие на асиалогликопротеиновый рецептор в печени, например, молекулы, содержащие GalNac и Tri-GalNac:



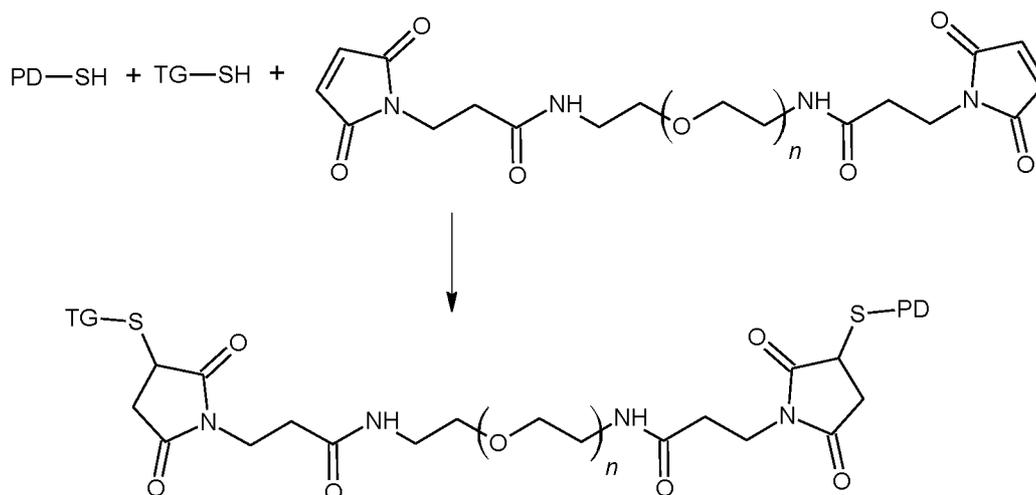
и



Подходящие низкомолекулярные нацеливающие средства включают фолат.

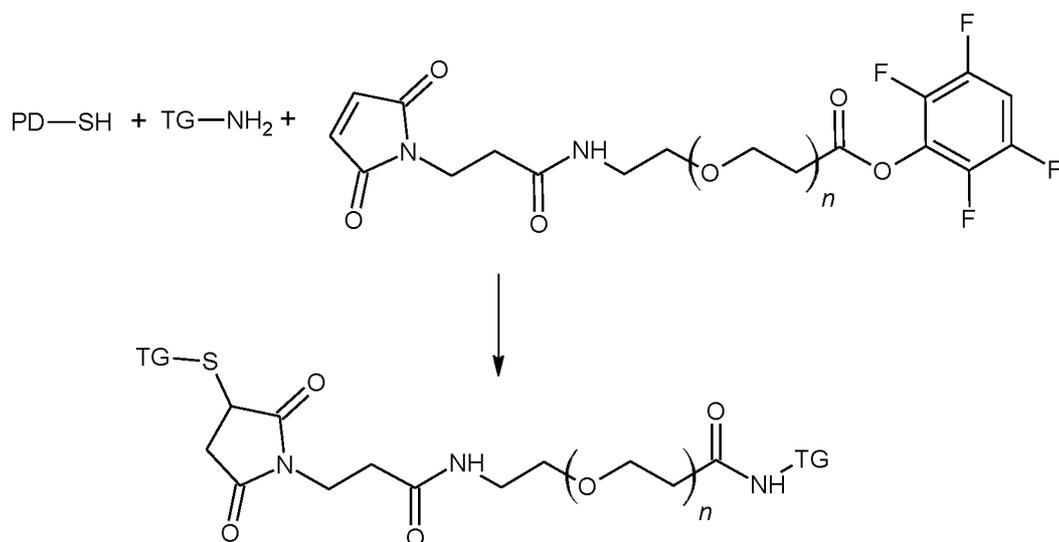
В случае некоторых нацеливающих групп группа -SH в составе нацеливающей группы может применяться для присоединения к группе PEG, с применением способов, аналогичных способам для присоединения группы PEG, описанным в данном документе выше. Как правило, это приводит к тому, что нацеливающая группа присоединяется к полиэтиленгликолевой группе посредством линкерной группы. Преимущественным реагентом является бифункциональный реагент на основе PEG, который может быть

конъюгирован с пептидным дендроном и нацеливающей группой посредством химического взаимодействия с участием тиольной группы. Один такой реагент представляет собой реагент на основе PEG, где оба конца молекулы функционализованы малеимидопропионатными группами. Упрощенная версия реакции с использованием бифункционализированной полиэтиленгликолевой группы с такими характеристиками, приводящая к образованию линкерной группы как между группой PEG и пептидным дендроном, так и между группой PEG и нацеливающей группой, может быть проиллюстрирована следующим образом:



где “SH” в “PD-SH” относится к тиолу в боковой цепи цистеина, “SH” в “TG-SH” относится к реакционноспособному тиолу в нацеливающей группе, PD представляет собой пептидный дендрон, TG представляет собой нацеливающую группу, и “n” составляет количество повторяющихся субъединиц  $-(OCH_2CH_2)_n-$ .

Пептидная нацеливающая группа или другая нацеливающая группа с реакционноспособным амином (например, сахар, функционализированный амином) может быть присоединена к группе PEG с применением альтернативных активированных реагентов на основе PEG. Как правило, это также приводит к тому, что нацеливающая группа присоединяется к полиэтиленгликолевой группе посредством линкерной группы. Преимущественным реагентом является бифункциональный реагент на основе PEG, который может быть конъюгирован с пептидным дендроном посредством химического взаимодействия с участием тиольной группы и с пептидной нацеливающей группой посредством амидной связи. Один такой реагент представляет собой реагент на основе PEG, где один конец молекулы функционализирован малеимидопропионатной группой, а другой сложным эфиром тетрафторфенила (TFP). Упрощенная версия реакции с использованием бифункционализированной полиэтиленгликолевой группы с такими характеристиками может быть проиллюстрирована следующим образом:



*Концевая аминогруппа необязательно может представлять собой модифицированную аминогруппу.*

В одном варианте осуществления концевая аминогруппа пептидного дендрона может быть немодифицированной. Немодифицированная концевая аминогруппа означает, что она представляет собой группу -NH<sub>2</sub>.

В одном варианте осуществления концевая аминогруппа пептидного дендрона может представлять собой модифицированную аминогруппу.

Модификации, как правило, представляют собой химические модификации, которые включают без ограничения добавление химических групп, создание новых связей и удаление химических групп. Модифицированные аминогруппы хорошо известны специалистам в данной области техники и включают без ограничения ацелированные, дезамино, N-низший алкил-, N-ди-низший алкил-, ограниченные алкильные (например, разветвленные, циклические, конденсированные, адамантильные) и N-ацильные модификации. Модифицированные аминогруппы могут также включать без ограничения внутреннюю амидную связь, предусматривающую N-концевые (например, *pyroGlu*) защищенные аминогруппы или присоединяющую радиоактивную, флуоресцентную метку или аффинную метку (например, биотин). Модифицированные аминогруппы могут также включать без ограничения буферные группы (2-амино-6-{{6-(морфолин-4-ил)пиридин-3-карбонил}амино}гексановую кислоту, 2-амино-6-[(тиоморфолин-3-карбонил)амино]гексановую кислоту и 2-амино-6-[2-(морфолин-4-ил)ацетиамидо]гексановую кислоту) и сшивающие группы (т. е. циклопентадиен).

Подходящей защитной группой для аминогруппы является, например, ацильная группа, например алканоильная группа, такая как ацетильная, алкоксикарбонильная группа, например, метоксикарбонильная, этоксикарбонильная или трет-бутоксикарбонильная группа, арилметоксикарбонильная группа, например бензилоксикарбонильная, или

ароильная группа, например бензоильная. Конкретная модифицированная аминогруппа представляет собой ациламино. Конкретная модифицированная аминогруппа представляет собой ацетиламино.

Низший алкил представляет собой  $C_{1-4}$ алкил, включая трет-бутил, бутил, пропил, изопропил, этил и метил.

*Концевая карбоксильная группа может необязательно представлять собой модифицированную карбоксильную группу.*

В одном варианте осуществления концевая карбоксильная группа пептидного дендрона является немодифицированной. Немодифицированная концевая карбоксильная группа означает, что она представляет собой группу  $-C(O)OH$ .

В одном варианте осуществления концевая карбоксильная группа пептидного дендрона представляет собой модифицированную карбоксильную группу.

Модификации, как правило, представляют собой химические модификации, которые включают без ограничения добавление химических групп, создание новых связей и удаление химических групп. Модифицированные карбоксильные группы хорошо известны специалистам в данной области техники и включают без ограничения модификации с помощью амида, низшего алкиламида, конформационно ограниченного алкила (например, разветвленного, циклического, конденсированного, адамантильного), диалкиламида и сложного эфира низших алкилов. Модифицированные карбоксильные группы могут также включать без ограничения защищенные карбоксильные группы или присоединяющие радиоактивную метку, флуоресцентную метку, или аффинную метку (например, биотин), или лиганд, нацеливающий на клетки. Подходящая защитная группа для карбоксильной группы представляет собой, например, этерифицирующую группу, например, метилэтильную группу, трет-бутильную группу или бензильную группу. Конкретная модифицированная карбоксильная группа представляет собой  $-CO_2NH_2$ . Конкретная модифицированная карбоксильная группа является амидированной с C-конца. Конкретная модифицированная карбоксильная группа представляет собой карбоксамидную группу. Конкретная модифицированная карбоксильная группа представляет собой  $N-(C_{1-4}алкил)карбамоильную$  группу.

#### *Фармацевтически активные средства*

Композиции и способы, описанные в данном документе, являются подходящими для доставки фармацевтически активных средств. Фармацевтически активное средство представляет собой любое вещество, способное оказывать фармакологическое действие на организм человека или животного, что приводит к терапевтическому результату.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из генетического материала, химически модифицированных нуклеиновых кислот, олигонуклеотидов, терапевтических пептидов, химиотерапевтических средств, белков, белковых конъюгатов, визуализирующих средств, комплексов нуклеиновых кислот с белками, связанных с технологией CRISPR, и природных компонентов вируса, таких как капсиды или ферменты.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из генетического материала.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из нуклеиновой кислоты.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из генетического материала, такого как ДНК или РНК.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из генетического материала, такого как ДНК и РНК.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из генетического материала, такого как ДНК и/или РНК.

В любом варианте осуществления, где упоминается ДНК, это может быть плазида, линейная ДНК, короткая одно- или двухнитевая ДНК, минимизированные векторы, такие как мини-кольца и мини-нити, свернутая ДНК, включая “шпилькообразную” и “крестообразную” ДНК, и ДНК вирусного происхождения.

В любом варианте осуществления, где упоминается РНК, это может представлять собой мРНК или siRNA.

В любом варианте осуществления, где упоминается РНК, это может представлять собой мРНК, gRNA и/или siRNA.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из ДНК.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из РНК.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из ДНК и мРНК.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из мРНК и gRNA.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из ДНК и gRNA.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из ДНК и мРНК и gRNA.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из олигонуклеотида.

В любом варианте осуществления, где упоминается олигонуклеотид, это могут быть антисмысловые олигонуклеотиды (ASO), олигонуклеотиды, связанные с процессом РНК-интерференции (RNAi), и аптамерные РНК.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из химически модифицированных нуклеиновых кислот.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из терапевтических пептидов.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из химиотерапевтических средств.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из белков.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из белковых конъюгатов.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из средств для визуализации.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из комплексов нуклеиновых кислот с белками, связанных с технологией CRISPR.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из ДНК, gRNA и/или мРНК, связанных с технологией CRISPR.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из природных компонентов вируса, таких как капсиды или ферменты.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из нуклеиновых кислот (т. е. плазмид и мРНК), которые кодируют терапевтические белки, такие как моноклональные антитела, например, абциксимаб, адалимумаб, алефацепт, алемтузумаб, базиликсимаб, белимумаб, безлтоксумаб, канакинумаб, цертолизумаба пегол, цетуксимаб, даклизумаб, деносумаб, эфализумаб, голимумаб, инфлектру, ипилимумаб, иксекизумаб, натализумаб, ниволумаб, оларатумаб, омализумаб, паливизумаб, панитумумаб, пембролизумаб, ритуксимаб, тоцилизумаб, трастузумаб, секукинумаб и устекинумаб; ферменты, например, агалзидазу бета, имиглюцеразу, велаглюцеразу альфа, талиглюцеразу, алглюкозидазу альфа, алглюкозидазу альфа, ларонидазу, идурсульфазу для внутривенного введения и галсульфазу; факторы роста и цитокины, например, IL-2 и IFN- $\alpha$ .

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из нуклеиновых кислот (т. е. плазмид и мРНК), которые кодируют терапевтические белки, такие как моноклональные антитела, ферменты, факторы роста и цитокины.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из нуклеиновых кислот (т. е. плазмид и мРНК), которые кодируют терапевтические белки, такие как моноклональные антитела, ферменты, факторы роста, факторы транскрипции и цитокины.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из нуклеиновых кислот (т. е. плазмид и мРНК), которые кодируют моноклональные антитела.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из нуклеиновых кислот (т. е. плазмид и мРНК), которые кодируют MEDI8852 и STK11.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из нуклеиновых кислот (т. е. плазмид и мРНК), которые кодируют моноклональные антитела, выбранные из

абциксимаба, адалимумаба, алефацепта, алемтузумаба, базиликсимаба, белимумаба, безлтоксумаба, канакинумаба, цертолизумаба пегола, цетуксимаба, даклизумаба, деносумаба, эфализумаба, голимумаба, инфлектры, ипилимумаба, иксекизумаба, натализумаба, ниволумаба, оларатумаба, омализумаба, паливизумаба, панитумумаба, пембролизумаба, ритуксимаба, тоцилизумаба, трастузумаба, секукинумаба и устекинумаба.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из нуклеиновых кислот (т. е. плазмид и мРНК), которые кодируют ферменты.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из нуклеиновых кислот (т. е. плазмид и мРНК), которые кодируют ферменты, выбранные из агалзидазы бета, имиглуцеразы, велаглуцеразы альфа, талиглуцеразы, алглюкозидазы альфа, алглюкозидазы альфа, ларонидазы, идурсульфазы для внутривенного введения и галсульфазы.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из нуклеиновых кислот (т. е. плазмид и мРНК), которые кодируют факторы роста.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из нуклеиновых кислот (т. е. плазмид и мРНК), которые кодируют факторы транскрипции.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из нуклеиновых кислот (т. е. плазмид и мРНК), которые кодируют фактор транскрипции HNF-4 $\alpha$ .

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из нуклеиновых кислот (т. е. плазмид и мРНК), которые кодируют цитокины.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из нуклеиновых кислот (т. е. плазмид и мРНК), которые кодируют цитокины, выбранные из IL-2 и IFN- $\alpha$ .

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из siRNA.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из мРНК.

В любом варианте осуществления, где упоминается фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из gRNA.

В любом варианте осуществления, где указано фармацевтически активное средство, фармацевтически активное средство может быть выбрано из siRNA, применяемой для снижения экспрессии белка в вариантах применения, включающих регуляцию экспрессии онкогена, фактора роста и цитокинов.

В любом варианте осуществления, где фармацевтически активное средство выбрано из нуклеиновой кислоты, соотношение основные аминокислотные остатки в пептидном дендроне : фосфат в нуклеиновой кислоте (N:P) составляет приблизительно 2:1.

В любом варианте осуществления, где фармацевтически активное средство выбрано из нуклеиновой кислоты, соотношение основные аминокислотные остатки в пептидном дендроне : фосфат в нуклеиновой кислоте (N:P) составляет приблизительно 4:1.

В любом варианте осуществления, где фармацевтически активное средство выбрано из нуклеиновой кислоты, соотношение основные аминокислотные остатки в пептидном дендроне : фосфат в нуклеиновой кислоте (N:P) составляет приблизительно 6:1.

В любом варианте осуществления, где фармацевтически активное средство выбрано из ДНК, соотношение основные аминокислотные остатки в пептидном дендроне : фосфат в ДНК (N:P) составляет приблизительно 2:1.

В любом варианте осуществления, где фармацевтически активное средство выбрано из ДНК, соотношение основные аминокислотные остатки в пептидном дендроне : фосфат в ДНК (N:P) составляет приблизительно 4:1.

В любом варианте осуществления, где фармацевтически активное средство выбрано из ДНК, соотношение основные аминокислотные остатки в пептидном дендроне : фосфат в ДНК (N:P) составляет приблизительно 6:1.

В любом варианте осуществления, где фармацевтически активное средство выбрано из РНК, соотношение основные аминокислотные остатки в пептидном дендроне : фосфат в РНК (N:P) составляет приблизительно 2:1.

В любом варианте осуществления, где фармацевтически активное средство выбрано из РНК, соотношение основные аминокислотные остатки в пептидном дендроне : фосфат в РНК (N:P) составляет приблизительно 4:1.

В любом варианте осуществления, где фармацевтически активное средство выбрано из РНК, соотношение основные аминокислотные остатки в пептидном дендроне : фосфат в РНК (N:P) составляет приблизительно 6:1.

В любом варианте осуществления, где фармацевтически активное средство выбрано из РНК, соотношение основные аминокислотные остатки в пептидном дендроне : фосфат в ДНК и РНК (N:P) составляет приблизительно 2:1.

В любом варианте осуществления, где фармацевтически активное средство выбрано из РНК, соотношение основные аминокислотные остатки в пептидном дендроне : фосфат в ДНК и РНК (N:P) составляет приблизительно 4:1.

В любом варианте осуществления, где фармацевтически активное средство выбрано из РНК, соотношение основные аминокислотные остатки в пептидном дендроне : фосфат в ДНК и РНК (N:P) составляет приблизительно 6:1.

#### *Фармацевтическая система доставки*

В одном варианте осуществления представлена фармацевтическая система доставки, которая содержит пептидный дендрон, содержащий один или несколько остатков, полученных из модифицированного лизина, описанного в данном документе.

Фармацевтическая система доставки представляет собой систему доставки, которую можно использовать для доставки фармацевтически активного средства в организм человека или животного, например, в клетку.

В одном варианте осуществления представлено применение пептидного дендрона, содержащего один или несколько остатков, полученных из модифицированного лизина, описанного в данном документе, в фармацевтической системе доставки.

В одном варианте осуществления представлен пептидный дендрон, содержащий один или несколько остатков, полученных из модифицированного лизина, как описано в данном документе, для применения в качестве фармацевтической системы доставки.

В одном варианте осуществления представлена система доставки для фармацевтически активного средства, которая содержит пептидный дендрон, содержащий один или несколько остатков, полученных из модифицированного лизина, описанного в данном документе.

В одном варианте осуществления фармацевтическая система доставки, описанная в данном документе, может содержать один или несколько разных пептидных дендронов, например, два разных пептидных дендрона. Смесь пептидных дендронов можно использовать для инкорпорирования нацеливающих фрагментов, стабилизации наночастиц и/или синергического объединения различных свойств.

В одном варианте осуществления представлена фармацевтическая система доставки, которая содержит один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе.

В любом варианте осуществления, где упоминается фраза “один или несколько пептидных дендронов”, это может относиться к одному пептидному дендрону.

В любом варианте осуществления, где упоминается фраза “один или несколько пептидных дендронов”, это может относиться к двум разным пептидным дендронам.

В любом варианте осуществления, где упоминается фраза “один или несколько пептидных дендронов”, это может относиться к нескольким разным пептидным дендронам.

В одном варианте осуществления представлена система доставки для фармацевтически активного средства, которая содержит один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе.

В одном варианте осуществления фармацевтическая система доставки, описанная в данном документе, может содержать пептидный дендрон, содержащий полиэтиленгликолевую группу, и пептидный дендрон, содержащий как полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу.

В одном варианте осуществления фармацевтическая система доставки, описанная в данном документе, может характеризоваться соотношением пептидные дендроны, содержащие полиэтиленгликолевую группу : пептидные дендроны, содержащие как полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу, составляющим приблизительно 1:50.

В одном варианте осуществления фармацевтическая система доставки, описанная в данном документе, может характеризоваться соотношением пептидные дендроны, содержащие полиэтиленгликолевую группу : пептидные дендроны, содержащие как полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу, составляющим более чем 1:50.

В одном варианте осуществления фармацевтическая система доставки, описанная в данном документе, может характеризоваться соотношением пептидные дендроны, содержащие полиэтиленгликолевую группу : пептидные дендроны, содержащие как полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу, составляющим менее чем 1:50.

В одном варианте осуществления фармацевтическая система доставки, описанная в данном документе, может характеризоваться соотношением пептидные дендроны, содержащие полиэтиленгликолевую группу : пептидные дендроны, содержащие как полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу, составляющим приблизительно 1:20.









В одном варианте осуществления фармацевтическая система доставки, описанная в данном документе, может характеризоваться соотношением пептидные дендроны, содержащие полиэтиленгликолевую группу : пептидные дендроны, содержащие как полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу, составляющим более чем 20:1.

В одном варианте осуществления фармацевтическая система доставки, описанная в данном документе, может характеризоваться соотношением пептидные дендроны, содержащие полиэтиленгликолевую группу : пептидные дендроны, содержащие как полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу, составляющим менее чем 20:1.

В одном варианте осуществления фармацевтическая система доставки, описанная в данном документе, может характеризоваться соотношением пептидные дендроны, содержащие полиэтиленгликолевую группу : пептидные дендроны, содержащие как полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу, составляющим приблизительно 50:1.

В одном варианте осуществления фармацевтическая система доставки, описанная в данном документе, может характеризоваться соотношением пептидные дендроны, содержащие полиэтиленгликолевую группу : пептидные дендроны, содержащие как полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу, составляющим более чем 50:1.

В одном варианте осуществления фармацевтическая система доставки, описанная в данном документе, может характеризоваться соотношением пептидные дендроны, содержащие полиэтиленгликолевую группу : пептидные дендроны, содержащие как полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу, составляющим менее чем 50:1.

Пептидные дендроны, описанные в данном документе, и фармацевтически активное средство могут быть объединены при осторожном перемешивании в физиологически изотоническом буфере (например, 5% трегалоза или сахароза, 20 мМ HEPES или фосфатно-солевой буфер (PBS)) с образованием наночастиц. Такие составы могут доставляться немедленно, храниться при 4°C или могут быть лиофилизированы для длительного хранения.

Пептидные дендроны, описанные в данном документе, могут быть получены в форме, подходящей для перорального введения, например, в виде таблетки или капсулы, для парентеральной инъекции (включая внутривенную, подкожную, внутрикожную, внутримышечную, внутрисосудистую инъекцию или инфузию), для местного применения

в виде мази или крема или для ректального введения в виде суппозитория. В частности, пептидные дендроны, описанные в данном документе, могут быть получены в форме, подходящей для инъекции, например, внутривенной, подкожной, внутрикожной или внутримышечной инъекции.

#### *Дополнительные вспомогательные вещества*

В одном варианте осуществления в составы и композиции, содержащий один или несколько пептидных дендронов и фармацевтически активные средства, описанные в данном документе, можно добавлять дополнительные вспомогательные вещества. Это может обеспечивать повышение стабильности наночастицы и способствует улучшению упаковки нуклеиновой кислоты, что приводит к показателям улучшения в отношении клеточной доставки и трансфекции.

В одном варианте осуществления представлен состав, содержащий один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе, и липид.

В одном варианте осуществления представлен состав, содержащий один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе, и липид, выбранный из смеси 1:1 (вес/вес) хлорида N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-n,n,n-триметиламмония (DOTMA) и диолеоилфосфатидилэтаноламина (DOPE).

В одном варианте осуществления представлен состав, содержащий один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе, и липид, выбранный из смеси хлорида N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-n,n,n-триметиламмония (DOTMA) и диолеоилфосфатидилэтаноламина (DOPE), (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконт-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноата (MC3), дистеароилфосфатидилхолина (DSPC), димиристоилглицерина (DMG) и гептадекан-9-ил-8-((2-гидроксиэтил)(6-оксо-6-(ундецилокси)гексил)амино)октаноата (SM-102) или холестерина.

#### *Варианты применения*

Пептидные дендроны, описанные в данном документе, можно применять для доставки фармацевтически активного средства, подходящего для лечения широкого спектра заболеваний, включая нарушения обмена веществ, иммунологические нарушения, гормональные нарушения, рак, гематологические нарушения, генетические нарушения, инфекционное заболевание, заболевание сердца, нарушения костей, респираторные нарушения, неврологические нарушения, применения как вспомогательной терапии, для лечения нарушений со стороны органа зрения или нарушений всасывания.

Терапевтическое применение может включать системную экспрессию белков (т. е. антител для лечения от вирусов) или направленную доставку (например, к метастатическим опухолям, CAR-T in vivo).

В одном варианте осуществления представлена фармацевтическая система доставки, которая содержит один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе, для применения в терапии.

В одном варианте осуществления представлена система доставки для фармацевтически активного средства, которая содержит один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе, для применения в терапии.

В одном варианте осуществления представлен пептидный дендрон для применения в доставке фармацевтически активного средства в клетку.

В одном варианте осуществления представлена фармацевтическая система доставки, которая содержит один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе, для применения в лечении нарушений обмена веществ, иммунологических нарушений, гормональных нарушений, рака, гематологических нарушений, генетических нарушений, инфекционного заболевания, заболевания сердца, нарушений костей, респираторных нарушений, неврологических нарушений, применения как вспомогательной терапии, в лечении нарушений со стороны органа зрения или нарушений всасывания.

В одном варианте осуществления представлена система доставки для фармацевтически активного средства, которая содержит один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе, для применения в лечении нарушений обмена веществ, иммунологических нарушений, гормональных нарушений, рака, гематологических нарушений, генетических нарушений, инфекционного заболевания, заболевания сердца, нарушений костей, респираторных нарушений, неврологических нарушений, применения как вспомогательной терапии, в лечении нарушений со стороны органа зрения или нарушений всасывания.

В одном варианте осуществления представлена система доставки для фармацевтически активного средства, которая содержит один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе, для применения в генной терапии.

Применяемые в данном документе термины “лечение” и “лечить” означают обращение вспять, облегчение, отсрочку начала или подавление прогрессирования заболевания или нарушения или одного или нескольких их симптомов, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления лечение можно проводить после развития одного или нескольких симптомов. В других вариантах осуществления лечение можно проводить при отсутствии симптомов. Например, лечение предрасположенного индивидуума можно проводить до появления симптомов (например, с учетом наличия симптомов в анамнезе и/или с учетом генетических или других факторов предрасположенности). Лечение также

можно продолжать после исчезновения симптомов, например, чтобы предупредить или отсрочить их рецидив.

#### *Фармацевтические композиции*

В одном варианте осуществления представлена фармацевтическая композиция, которая содержит один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе.

В любом варианте осуществления, где фармацевтическая композиция содержит один или несколько пептидных дендронов, фармацевтическая композиция может содержать один пептидный дендрон.

В любом варианте осуществления, где фармацевтическая композиция содержит “один или несколько пептидных дендронов”, фармацевтическая композиция может содержать несколько разных пептидных дендронов.

В любом варианте осуществления, где фармацевтическая композиция содержит “один или несколько пептидных дендронов”, фармацевтическая композиция может содержать два разных пептидных дендрона.

В любом варианте осуществления, где фармацевтическая композиция содержит “один или несколько пептидных дендронов”, фармацевтическая композиция может содержать по меньшей мере два разных пептидных дендрона.

В одном варианте осуществления представлена фармацевтическая композиция, которая содержит один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе, и фармацевтически активное средство.

В одном варианте осуществления представлена фармацевтическая композиция, которая содержит один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе.

В одном варианте осуществления представлена фармацевтическая композиция, которая содержит два или более разных пептидных дендронов.

В одном варианте осуществления представлена композиция, содержащая фармацевтически активное средство и один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может содержать пептидный дендрон, содержащий полиэтиленгликолевую группу, и пептидный дендрон, содержащий как полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может характеризоваться соотношением пептидных дендронов, содержащие полиэтиленгликолевую группу : пептидные дендроны, содержащие как





полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу, составляющим менее чем 1:5.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может характеризоваться соотношением пептидные дендроны, содержащие полиэтиленгликолевую группу : пептидные дендроны, содержащие как полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу, составляющим приблизительно 2:4.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может характеризоваться соотношением пептидные дендроны, содержащие полиэтиленгликолевую группу : пептидные дендроны, содержащие как полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу, составляющим более чем 2:4.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может характеризоваться соотношением пептидные дендроны, содержащие полиэтиленгликолевую группу : пептидные дендроны, содержащие как полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу, составляющим менее чем 2:4.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может характеризоваться соотношением пептидные дендроны, содержащие полиэтиленгликолевую группу : пептидные дендроны, содержащие как полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу, составляющим приблизительно 1:1.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может характеризоваться соотношением пептидные дендроны, содержащие полиэтиленгликолевую группу : пептидные дендроны, содержащие как полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу, составляющим приблизительно 4:2.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может характеризоваться соотношением пептидные дендроны, содержащие полиэтиленгликолевую группу : пептидные дендроны, содержащие как полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу, составляющим более чем 4:2.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может характеризоваться соотношением пептидные дендроны, содержащие полиэтиленгликолевую группу : пептидные дендроны, содержащие как

полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу, составляющим менее чем 4:2.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может характеризоваться соотношением пептидные дендроны, содержащие полиэтиленгликолевую группу : пептидные дендроны, содержащие как полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу, составляющим приблизительно 5:1.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может характеризоваться соотношением пептидные дендроны, содержащие полиэтиленгликолевую группу : пептидные дендроны, содержащие как полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу, составляющим более чем 5:1.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может характеризоваться соотношением пептидные дендроны, содержащие полиэтиленгликолевую группу : пептидные дендроны, содержащие как полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу, составляющим менее чем 5:1.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может характеризоваться соотношением пептидные дендроны, содержащие полиэтиленгликолевую группу : пептидные дендроны, содержащие как полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу, составляющим приблизительно 10:1.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может характеризоваться соотношением пептидные дендроны, содержащие полиэтиленгликолевую группу : пептидные дендроны, содержащие как полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу, составляющим более чем 10:1.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может характеризоваться соотношением пептидные дендроны, содержащие полиэтиленгликолевую группу : пептидные дендроны, содержащие как полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу, составляющим менее чем 10:1.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может характеризоваться соотношением пептидные дендроны, содержащие полиэтиленгликолевую группу : пептидные дендроны, содержащие как



полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу, составляющим более чем 50:1.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может характеризоваться соотношением пептидные дендроны, содержащие полиэтиленгликолевую группу : пептидные дендроны, содержащие как полиэтиленгликолевую группу, так и нацеливающую группу, составляющим менее чем 50:1.

В одном варианте осуществления представлена фармацевтическая композиция, содержащая один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе, для применения в терапии.

В одном варианте осуществления представлена фармацевтическая композиция, содержащая один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе, и фармацевтически активное средство для применения в терапии.

В одном варианте осуществления представлена фармацевтическая композиция, которая содержит один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе, для применения в лечении нарушений обмена веществ, иммунологических нарушений, гормональных нарушений, рака, гематологических нарушений, генетических нарушений, инфекционного заболевания, заболевания сердца, нарушений костей, респираторных нарушений, неврологических нарушений, применения как вспомогательной терапии, в лечении нарушений со стороны органа зрения или нарушений всасывания.

В одном варианте осуществления представлена фармацевтическая композиция, которая содержит один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе, и фармацевтически активное средство для применения в лечении нарушений обмена веществ, иммунологических нарушений, гормональных нарушений, рака, гематологических нарушений, генетических нарушений, инфекционного заболевания, заболевания сердца, нарушений костей, респираторных нарушений, неврологических нарушений, применения как вспомогательной терапии, в лечении нарушений со стороны органа зрения или нарушений всасывания.

В одном варианте осуществления представлена фармацевтическая композиция, которая содержит один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе, и фармацевтически активное средство для применения в генной терапии.

В одном варианте осуществления представлена фармацевтическая композиция, которая содержит один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе, для применения в генной терапии.

*Способы лечения*

В одном варианте осуществления представлен способ лечения нарушений обмена веществ, иммунологических нарушений, гормональных нарушений, рака, гематологических нарушений, генетических нарушений, инфекционного заболевания, заболевания сердца, нарушений костей, респираторных нарушений, неврологических нарушений, применения как вспомогательной терапии, лечения нарушений со стороны органа зрения или нарушений всасывания, который включает введение указанному животному эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе.

В одном варианте осуществления представлен способ лечения нарушений обмена веществ, иммунологических нарушений, гормональных нарушений, рака, гематологических нарушений, генетических нарушений, инфекционного заболевания, заболевания сердца, нарушений костей, респираторных нарушений, неврологических нарушений, применения как вспомогательной терапии, лечения нарушений со стороны органа зрения или нарушений всасывания, который включает введение указанному животному эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе, и фармацевтически активное средство.

В одном варианте осуществления представлен способ генной терапии, который включает введение одного или нескольких пептидных дендронов, описанных в данном документе.

В одном варианте осуществления представлен способ генной терапии, который включает введение одного или нескольких пептидных дендронов, описанных в данном документе, и фармацевтически активного средства.

#### *Применение фармацевтических композиций*

В одном варианте осуществления представлено применение фармацевтической композиции, которая содержит один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе, в изготовлении лекарственного препарата для лечения нарушений обмена веществ, иммунологических нарушений, гормональных нарушений, рака, гематологических нарушений, генетических нарушений, инфекционного заболевания, заболевания сердца, нарушений костей, респираторных нарушений, неврологических нарушений, применения как вспомогательной терапии, для лечения нарушений со стороны органа зрения или нарушений всасывания.

В одном варианте осуществления представлено применение фармацевтической композиции, которая содержит один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе, и фармацевтически активного средства в изготовлении лекарственного

препарата для лечения нарушений обмена веществ, иммунологических нарушений, гормональных нарушений, рака, гематологических нарушений, генетических нарушений, инфекционного заболевания, заболевания сердца, нарушений костей, респираторных нарушений, неврологических нарушений, применения как вспомогательной терапии, для лечения нарушений со стороны органа зрения или нарушений всасывания.

В одном варианте осуществления представлено применение фармацевтической композиции, которая содержит один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе, в генной терапии.

В одном варианте осуществления представлено применение фармацевтической композиции, которая содержит один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе, и фармацевтически активного средства в генной терапии.

### *Наборы*

В одном варианте осуществления предусмотрен набор, содержащий:

- a) один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе, в первом компоненте;
- b) фармацевтически активное средство во втором компоненте и
- c) средство-контейнер для вмещения указанных первого и второго компонентов.

В одном варианте осуществления предусмотрен набор, содержащий:

- a) один или несколько пептидных дендронов, описанных в данном документе, в первом компоненте;
- b) фармацевтически активное средство во втором компоненте и
- c) средство-контейнер для вмещения указанных первого и второго компонентов;
- d) инструкции по применению.

## **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

**Фигура 1.** Иллюстративное схематическое изображение синтеза пептидных дендронов (PD), как описано в примере 2.

**Фигура 2А и фигура 2В.** Результаты по стабильности пептидной наночастицы (PNP) в отношении анионной диссоциации (А) и способности к разложению катепсином В (В), как описано в примере 7. Стабильность наночастицы является критически важной для эффективной доставки интактной нуклеиновой кислоты в клетки-мишени, тем не менее, нуклеиновая кислота должна высвободиться при поглощении клетками для выполнения своей функции. В связи с этим были сконструированы PD для ферментативного разложения при поглощении клетками. Было определено, что материалы с высвобождением, отвечающим на стимулы, обладают повышенной эффективностью и меньшей токсичностью. Результаты демонстрируют, что наночастицы PD3(MN) и

PD3(TM) были значительно более устойчивы к анионной диссоциации по сравнению с наночастицами, составленными с PD1, немодифицированными (NM) PD и PD3(His), которые обеспечивали легкое высвобождение ДНК при концентрациях сульфата декстрана, превышающих 50 мкг/мл. Более того, PD3(M), PD3(MN) и PD3(TM) обеспечивали легкое высвобождение ДНК в ответ на активность катепсина В по сравнению с составами на основе немодифицированного PD3 и всех PD2.

**Фигура 3А, фигура 3В и фигура 3С.** Результаты, полученные в результате скрининга трансфекции *in vitro*, как описано в примере 8. Различные линии клеток оценивали, как показано на фигуре 3А (линии клеток немелкоклеточного рака легкого человека H1299) и фигуре 3В (линия клеток мышечных трубочек мыши C2C12). Данные люминесценции собирали в четырех повторностях и представляли как среднее значение +/- стандартное отклонение. На фигуре 3С продемонстрированы результаты скрининга двух разных составов на основе NP с PD3(MN) и PD3(TM), в различных линиях клеток (H1299, C2C12, HEK393 и HEPG2) с целью выявления лучших показателей для различных вариантов применения. Данные результаты демонстрируют, что модификация MN была более эффективной в клетках легких (H1299, линия клеток немелкоклеточной карциномы легкого человека, полученная из лимфы) и мышц (C2C12, миообласты мыши). В качестве альтернативы модификация TM показала наилучшие результаты в линиях клеток, полученных из органов фильтрации, включая почку (HEK393, клетки эмбриональной почки человека) и печень (HEPG2, линия клеток гепатомы человека).

**Фигура 4.** Данные, полученные в результате эксперимента в отношении экспрессии мРНК люциферазы у мышей, описанного в примере 9. Трансляцию NP с ДНК *in vivo* тестировали в ходе исследований внутримышечной экспрессии на мышах. Для отслеживания экспрессии в реальном времени обеспечивали экспрессию репортерного белка люциферазы. Экспрессию наблюдали и определили как устойчивую на протяжении периода наблюдения, составляющего 1 месяц. Экспрессию оценивали еженедельно с применением IVIS и собирали данные люминесценции в четырех повторностях и представляли как среднее значение +/- стандартное отклонение. Результаты демонстрируют, что MeO-PEG-PD(MN) обеспечивает эффективную доставку ДНК посредством ИМ-инъекции *in vivo*, в результате чего наблюдается устойчивая экспрессия в течение месяца.

**Фигура 5А и фигура 5В.** Данные, полученные в результате эксперимента в отношении терапевтической экспрессии, описанного в примере 10. На фигуре 5А продемонстрированы результаты, полученные с mAb к вирусу гриппа MEDI8852, и на фигуре 5В продемонстрированы результаты, полученные с супрессором опухоли серин-

треониновой киназой 11 (STK11). MEDI8852 количественно определяли путем непрямого ELISA и данные по уровням экспрессии собирали в трех повторностях и представляли как среднее значение +/- стандартное отклонение. Масс-спектрометрию применяли для дополнительного подтверждения экспрессии. STK11 количественно определяли с применением анализов по методу вестерн-блоттинга. Задачей NP является экспрессия терапевтических белков с использованием клеток хозяина. Данные результаты показывают, что NP обладают способностью экспрессировать широкий спектр терапевтических средств, включая mAb (т. е. MEDI8852 (mAb к вирусу гриппа)) и ферменты (т. е. ингибитор опухоли серин-треониновая киназа 11 (STK11)), *in vivo* в представляющих интерес для механизма действия терапевтических средств линиях клеток.

**Фигура 6А, фигура 6В и фигура 6С.** Результаты, полученные в отношении трансфекций нацеленных NP с ДНК *in vitro*, как описано в примере 11. Нацеленные наночастицы на основе PD тестировали в различных линиях клеток и установили, что они обеспечивают повышение трансфекции. В H1299 TfR (фигура 6А) и cRGD (фигура 6В) обеспечивали повышение общих уровней экспрессии (доставка GFP, флуоресценция) и кинетикой (доставка люциферазы Gwiz, люминесценция) по сравнению с коммерческим полиэтиленимином для контроля трансфекции (PEI). Подобные улучшения трансфекции наблюдали в клетках C2C12 и CT26 при сравнении с ненацеленными NP (фигура 6С). Нацеленную доставку ДНК можно применять для повышения эффективности трансфекции и/или достижения специфической в отношении клеток экспрессии. Платформа PD была целенаправленно сконструирована с гибкой стратегией нацеливания, которая позволила инкорпорировать ряд нацеливающих лигандов на основе как пептидов, так и антител (как показано в примерах 3 и 5), что значительно повысило трансфекцию. Более того, посредством пегилирования и нацеливания была достигнута высокоспецифичная экспрессия. Данные результаты демонстрируют, что нацеливание можно применять для усиления экспрессии во многих сильно различающихся линиях клеток.

**Фигура 7.** Данные, полученные в результате эксперимента с NP, нацеленными на легкое *in vivo*, описанного в примере 12. Нацеленные на PV1 наночастицы вводили IV мышам BALB/C и отслеживали экспрессию люциферазы с помощью IVIS в течение 8 дней. Визуализация *ex vivo* в день 3 и день 8 демонстрировала, что только наночастицы с оптимизированной плотностью лиганда характеризовались значимым уровнем экспрессии в легких, на которые осуществлялось целенаправленное воздействие. Специфическая в отношении клеток доставка значительно расширяет варианты потенциального

применения средств терапии на основе нуклеиновой кислоты. Данные результаты демонстрируют, что нацеливающие фрагменты на основе антитела можно использовать для получения нацеленных NP на основе PD и нацеливание на PV1 можно применять для нацеливания на легкие. В данном примере было продемонстрировано, что нацеленные на PV1 NP обеспечивают достижение высокоспецифичной экспрессии в легких мыши в течение минимум 8 дней.

**Фигура 8.** Результаты, полученные в отношении трансфекции клеток H1299 с помощью pDNA по сравнению с наночастицами на основе PD3(MN) с мРНК, как описано в примере 13. Клетки H1299 обрабатывали с помощью наночастиц, полученных с использованием мРНК или pDNA. Кинетику трансфекции отслеживали в режиме реального времени с использованием Incucyte для флуоресцентной визуализации клеток и использовали программное обеспечение прибора для количественной оценки общей интенсивности красной флуоресценции как показателя трансфекции. мРНК не требует сложной ядерной локализации для успешной экспрессии трансгена и, как было продемонстрировано, способствует более быстрой кинетике экспрессии, чем при доставке ДНК. Разработанные авторами NP, как было продемонстрировано, обеспечивают успешную упаковку и доставку мРНК и, как и следовало ожидать, обеспечивают более быструю кинетику экспрессии, чем при доставке ДНК. Данные результаты демонстрируют, что экспрессия мРНК осуществляется значительно быстрее, однако через 48 часов достигаются такие же уровни экспрессии, как и при доставке pDNA.

**Фигура 9.** Данные, полученные в результате эксперимента в отношении экспрессии люциферазы у мыши, описанного в примере 14. Мышей CD обрабатывали внутримышечно с помощью pDNA или мРНК в комплексе с MeO PEG-PD3(MN). Экспрессию оценивали с применением IVIS. Данные люминесценции собирали в четырех повторностях и представляли как среднее значение +/- стандартное отклонение. Данные результаты демонстрируют, что как мРНК, так и pDNA можно доставлять внутримышечно *in vivo* с применением платформы PD, причем NP с мРНК характеризуются более быстрой кинетикой экспрессии.

**Фигура 10.** Данные, полученные в результате эксперимента в отношении экспрессии mAb к вирусу гриппа MEDI8852 у мышей, описанного в примере 15. Мышей BALB/c обрабатывали с помощью NP с мРНК путем IV-инъекции и количественно оценивали экспрессию MEDI8852 посредством ELISA. Данные результаты демонстрируют, что значительные уровни mAb регистрировали на протяжении периода продолжительностью 8 дней, что подтверждает способность PD обеспечивать экспрессию терапевтических белков *in vivo*.

**Фигура 11.** Результаты, полученные в отношении трансфекции неактивированных первичных Т-клеток с помощью NP на основе PD3(MN) с мРНК mCherry с различными показателями fab, нацеленного на CD3, как описано в примере 16. Данные результаты демонстрируют, что ненацеленные NP обладают способностью трансфицировать Т-клетки, однако CD3-нацеливание значительно улучшает доставку, когда нацеливающий fab представлен на уровнях от низкого (25%) до умеренного (50%).

**Фигура 12.** Результаты, полученные в отношении сайленсинга CTNNB1, отслеживали с помощью репортерного анализа и вестерн-блоттинга, как описано в примере 17. Способность NP осуществлять доставку siRNA была продемонстрирована на линии клеток рака толстой кишки SW480 при нацеливании на онкоген CTNNB1. С помощью вестерн-блоттинга было продемонстрировано, что PD3(MN) и PD3(TM) с 1% (вес/вес) DOPE:DOTMA = 1:1 эффективно обеспечивает сайленсинг CTNNB1 на протяжении минимум 5 дней. Данные результаты демонстрируют, что NP на основе PD могут обеспечивать эффективную доставку siRNA в клетки-мишени.

**Фигура 13А, фигура 13В и фигура 13С.** Результаты, полученные в отношении сайленсинга катенина В с помощью NP на основе PD3(MN) с различными показателями нацеливающего пептида cRGD, как описано в примере 18. Активность репортера TopFlash для CTNNB1 в SW480 (фигура 13А), уровни белка CTNNB1 в SW480 (фигура 13В) и пролиферация Colo205 (фигура 13С). Для многих вариантов применения требуется локализованная доставка. Чтобы определить, возможно ли достижение состояния “включение/выключение” доставки с помощью платформы NP, получали пегилированные NP с различными количествами показателя cRGD и использовали их для трансфекции линий клеток рака толстой кишки SW480 и Colo205. Было определено, что пегилирование обеспечивает остановку или снижение сайленсинга, тогда как очередное введение cRGD в NP восстанавливает активность NP. Данные результаты демонстрируют, что пегилирование можно применять для снижения неспецифического поглощения клетками, а нацеливание можно применять для восстановления активности NP.

**Фигура 14.** Результаты, полученные в отношении объема опухоли на мышинной модели метастатического рака толстой кишки, как описано в примере 18. Мышам с установившимися опухолями из линии клеток рака толстой кишки Colo205 внутривенно вводили NP, характеризующиеся разными уровнями нацеливания cRGD, в дни 8, 9, 15 и 16 (указано черными стрелками). Группы включали необработанных мышей (А), мышей, которым вводили ненацеленные NP (В), и мышей, которым вводили нацеленные наночастицы с умеренным (С) или высоким уровнем показателя cRGD (D), при этом каждый набор данных представляет одну мышь. Также определяли средние значения в

динамике по времени (E) и в последний день исследования (F). Трансляцию нацеленной NP с siRNA оценивали на мышинной модели. Было определено, что высокие уровни показателя cRGD обеспечивают значимое замедление роста опухоли по сравнению с ненацеленными NP. Данные результаты демонстрируют, что NP, нацеленные на cRGD, могут обеспечивать улучшенную доставку siRNA, и наглядно свидетельствуют о важности плотности нацеливающего лиганда.

**Фигура 15.** Спектры флуоресценции для NP, составленных с флуоресцентно меченными ДНК (Cy5) и мРНК (Cy3), как описано в примере 19. NP с ДНК, меченной Cy5 (график 1), не возбуждаются синим светодиодом, поэтому флуоресценции при длине волны его излучения (650-700 нм) не обнаружено. NP с мРНК, меченной Cy3 (график 2), возбуждаются и флуоресцируют, при этом пик излучения наблюдается при длине волны около 550-600 нм. Подобным образом, NP, полученные с ДНК, меченной Cy5, в сочетании с NP с мРНК, меченной Cy3 (график 3), флуоресцируют с пиком излучения, характерным для Cy3. Важно отметить, что NP, полученные с применением смеси 1:1 меченной Cy5 ДНК и меченной Cy3 мРНК (график 4), демонстрируют увеличение излучения в области излучения, характерного для Cy5, при длине волны около 560-700 нм, с соответствующим снижением интенсивности флуоресценции в области пика излучения, характерного для Cy3, при длине волны около 550-600 нм. Это указывает на то, что ДНК и мРНК в образце 4 находятся в непосредственной близости (<5 нм), что позволяет резонансному переносу энергии флуоресценции (FRET) от флуорофора Cy3 на мРНК возбуждать флуорофор Cy5 на меченой ДНК. Это является свидетельством совместной инкапсуляции мРНК и ДНК в NP на основе пептидных дендронов.

**Фигура 16.** Кинетика экспрессии гибридных NP на основе PD1D с мРНК и ДНК в клетках H1299, как описано в примере 19. Экспрессию ДНК измеряют по площади флуоресценции GFP и экспрессию мРНК измеряют по площади флуоресценции mCherry. Экспрессия GFP увеличивается в течение 100 часов, в то время как пик экспрессии мРНК приходится на момент времени около 60 часов. Показатели совместной экспрессии ДНК/мРНК, количественно определенные по перекрывающемуся сигналу флуоресценции, характеризуются кинетикой, аналогичной экспрессии мРНК, достигая пика в момент времени около 65 часов. Данные результаты свидетельствуют об успешной совместной доставке ДНК и мРНК в клетки.

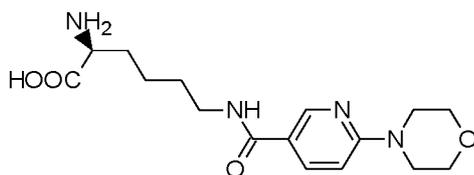
**Фигура 17.** Кинетика экспрессии гибридных NP на основе PD1D с мРНК и ДНК в дифференцированных клетках C2C12, как описано в примере 19. Дифференцированные мышечные клетки C2C12 слились в мышечные трубочки и являются неделяющимися, что затрудняет трансфекцию этих клеток. Экспрессию ДНК измеряют по площади

флуоресценции GFP и экспрессию мРНК измеряют по площади экспрессии mCherry. Экспрессия GFP увеличивается в течение 75 часов с последующим выходом сигнала на плато. Экспрессия мРНК достигает пиковых значений в момент времени около 60 часов и медленно снижается. Показатели совместной экспрессии ДНК/мРНК, количественно определенные по перекрывающемуся сигналу флуоресценции, характеризуются кинетикой, аналогичной экспрессии мРНК, достигая пика в момент времени около 60 часов. Данные результаты свидетельствуют об успешной совместной доставке ДНК и мРНК в неделящиеся клетки.

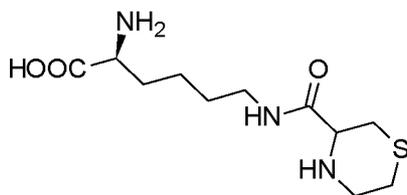
## ПРИМЕРЫ

### Аббревиатуры, используемые в данном документе

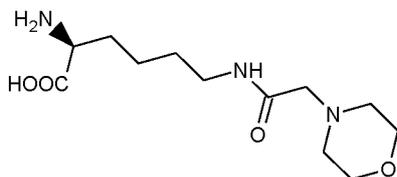
- NP: наночастица;
- PD: пептидный дендрон;
- PDID: внутриклеточная доставка пептидного дендрона;
- аминокислота “CIT”: цитруллин
- Следующие аббревиатуры применяют в данном документе для модифицированных лизинов:



LYS(MN) или K(MN),



LYS(TM) или K(TM),



LYS(M) или K(M).

Следующие полимеры и лиганды включены в пептидные дендроны.

№	Название	Структура	Точка присоединения к PEG-содержащей группе
1	MeO PEG	m-dPEG <sup>®</sup> <sub>36</sub> -MAL; Quanta BioDesign, Плейн-Сити,	N/A

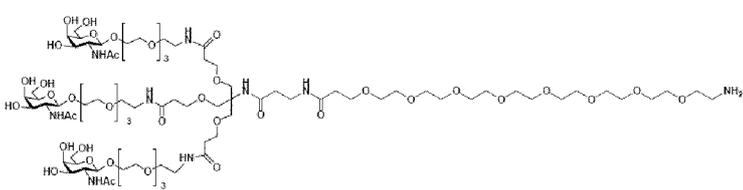
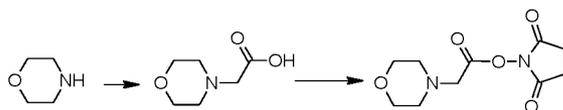
№	Название	Структура	Точка присоединения к PEG-содержащей группе
		Огайо	
2	Mal-PEG	Бис-Mal-PEG <sub>19</sub> (BroadPharm, Сан-Диего, Калифорния)	N/A
3	TfR	Ac-KGGGAWSIIDCSMNYCLYIEG (SEQ ID NO 3, где выделенный жирным шрифтом "С" указывает, что цистеины сшиты посредством дисульфидных связей)	Лизин ε-амин
4	cRGD	Цикло(-Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys) (SEQ ID NO 4)	Лизин ε-амин
5	Антитело к CD3	Van Wauwe et al. J Immunol, 1980, 124(6):2708-2713	циклопентадиген
6	Меса32	Модифицированный из Gabriela M. Marchetti, et al. Commun Biol. 2019; 2: 92; опубликована онлайн 7 марта 2019 г. doi: 10.1038/s42003-019-0337-2	циклопентадиген
7	GalNac	N-Ацетилгалактозаминоновый лиганд: β-GalNac-PEG3-амин (Sussex Research, Онтарио, Канада)	Амин
8	Tri-GalNac	 (Sussex Research, Онтарио, Канада)	Амин

Таблица 1. Краткое описание нацеливающих фрагментов, включенных в PD.

### Пример 1

Получение модифицированных лизинов

Способ 1. Синтез 1-{[(морфолин-4-ил)ацетил]окси} пирролидин-2,5-диона

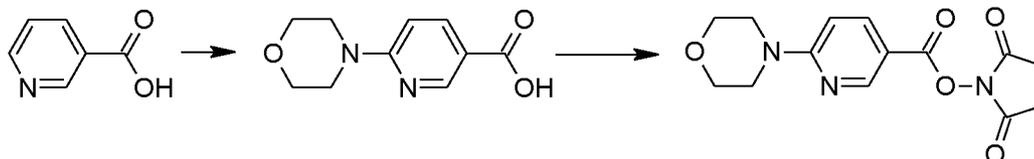


(Морфолин-4-ил)уксусную кислоту (1 г, 6,89 ммоль) растворяли в дихлорметане (DCM) (25 мл) и добавляли N-гидроксисукцинимид (NHS) (872 мг, 7,58 ммоль) и N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодимида гидрохлорид (EDC·HCl) (1,60 г, 8,35 ммоль).

Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего

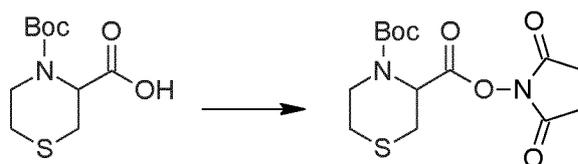
фильтровали через слой силикагеля размером 2" x 3". Слой промывали с помощью DCM (3 x 25 мл), и фильтрат объединяли со смывами и концентрировали с получением 1-{{(морфолин-4-ил)ацетил}окси}пирролидин-2,5-диона (1,3 г, 78%) в виде белого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 3,75 (d, J=3,6 Гц, 4H), 3,57 (s, 2H), 2,85 (s, 4H), 2,67 (d, J=4,2 Гц, 4H); MS (ESI) расч.: 242,09, набл.: 243,3 (M+1).

Способ 2. Синтез 1-{{6-(морфолин-4-ил)пиридин-3-карбонил}окси}пирролидин-2,5-диона



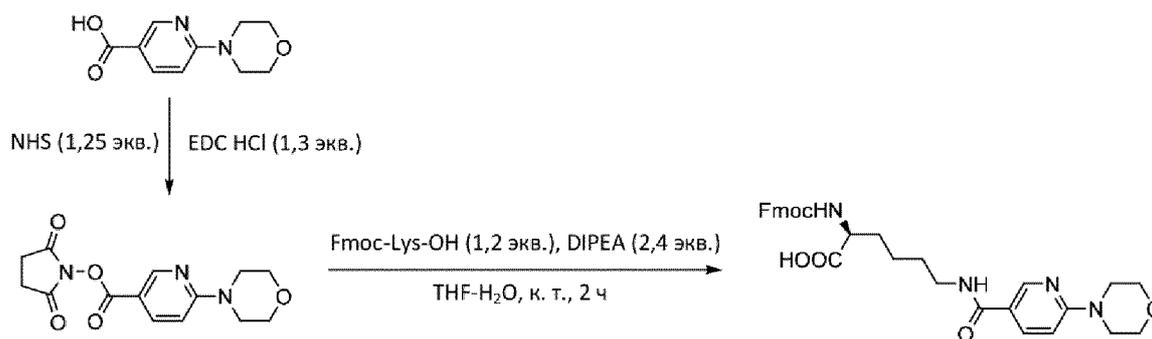
6-(Морфолин-4-ил)пиридин-3-карбоновую кислоту (350 мг, 1,68 ммоль) растворяли в DCM (25 мл) при комнатной температуре и при перемешивании. Добавляли NHS (213 мг, 1,85 ммоль) с последующим добавлением EDC·HCl (418 мг, 2,18 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч и затем фильтровали через слой силикагеля размером 2" x 3". Слой промывали с помощью DCM (3 x 25 мл) и этилацетата (25 мл). Фильтрат и смывы объединяли и концентрировали с получением 1-{{6-(морфолин-4-ил)пиридин-3-карбонил}окси}пирролидин-2,5-диона (325 мг, 63%) в виде белого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,89 (s, 1H), 8,07 (dd, J = 9,3 Гц, 1,5 Гц, 1H), 6,60 (d, J = 9,3 Гц, 1H), 3,80 (d, J = 4,2 Гц, 4H) 3,72 (d, J = 4,2 Гц, 4H), 2,89 (s, 4H). MS (ESI) расч.: 305,1, набл.: 306,3 (M+1).

Способ 3. Синтез трет-бутил-3-{{(2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси}карбонил}тиоморфолин-4-карбоксилата



4-(трет-Бутоксикарбонил)тиоморфолин-3-карбоновую кислоту (1 г, 4,04 ммоль) растворяли в DCM (25 мл) при комнатной температуре и при перемешивании. Добавляли NHS (511 мг, 4,44 ммоль) с последующим добавлением EDC·HCl (1,01 г, 5,25 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч и затем фильтровали через слой силикагеля размером 2" x 3". Слой промывали с помощью DCM (3 x 25 мл), и фильтрат объединяли со смывами и концентрировали с получением трет-бутил-3-{{(2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси}карбонил}тиоморфолин-4-карбоксилата (1,3 г, 93,4%) в виде белого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,38 (br s, 1H), 4,43-4,22 (m, 1H), 3,46-3,21 (m, 1H), 3,19-3,10 (m, 1H), 3,06-2,97 (m, 1H), 2,85 (s, 4H), 2,81-2,62 (m, 1H), 2,61-2,42 (m, 1H), 1,47 (s, 9H). MS (ESI) расч.: 345,4 (M+1).

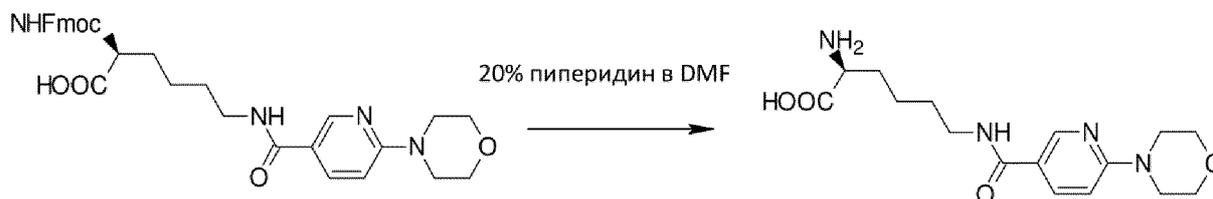
Способ 4. Синтез N2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-N6-(6-морфолиноникотиноил)-L-лизина



Флуоренилметилоксикарбонилхлорид-L-лизин (Fmoc-Lys-OH) (15,3 г, 41,53 ммоль, 1,2 экв.) растворяли в смеси THF-вода (1:1, 800 мл) при механическом перемешивании и при комнатной температуре. Добавляли одной порцией раствор ранее приготовленного сложного эфира (способ 2) в DCM с последующим добавлением DIPEA (10,73 г, 82,99 ммоль, 2,4 экв.). Реакционную смесь дополнительно перемешивали при комнатной температуре до поглощения исходного материала (TLC, 2 ч), затем добавляли этилацетат (EtOAc) (250 мл). Смесь подкисляли с помощью HCl (1 М, 200 мл), выливали в делительную воронку, и слои разделяли. Водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (2 x 250 мл). Органические слои объединяли, промывали солевым раствором (200 мл), высушивали над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт получали в виде маслянистого остатка светло-коричневого цвета, который растворяли в THF, адсорбировали на силикагеле и очищали посредством флэш-хроматографии на колонке (7" x 3") с силикагелем. Колонку промывали с помощью 50% этилацетата в гексанах и с помощью 100% этилацетата с элюированием продукта под вакуумной вытяжкой. Фракции, содержащие необходимый продукт, объединяли и концентрировали в вакууме с получением N2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-N6-(6-морфолиноникотиноил)-L-лизина (12,6 г, 65%) в виде твердого вещества грязно-белого цвета. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,26 (br s, 1H), 8,62 (d, J = 1,5Hz, 1H), 7,93 (dd, J = 2,5, 9Hz, 1H), 7,71 (d, J = 7,5Hz, 2H), 7,53 (dd, J = 4,5, 7,5Hz, 2H), 7,35 (t, J = 7,5Hz, 2H), 7,23 (q, J = 6,5Hz, 2H), 6,59 (t, J = 5Hz, 1H), 6,48 (d, J = 9Hz, 1H), 5,99 (d, J = 8Hz, 1H), 4,41 (dd, J = 7,5, 12,5Hz, 1H), 4,31 (dd, J = 12, 18Hz, 2H), 4,15 (d, J = 7Hz, 1H), 3,71 (t, J = 4,5Hz, 4H), 3,56-3,32 (m, 6H), 1,98-1,87 (m, 1H), 1,86-1,75 (m, 1H), 1,71-1,57 (m, 2H), 1,56-1,39 (m, 2H) ppm; <sup>13</sup>C ЯМР (125 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 175,2, 166,6, 159,9, 156,6, 146,9, 144,1, 143,9, 141,4, 137,7, 127,9, 127,3, 125,3, 120,1, 119,5, 106,3, 67,2, 66,6, 53,8, 47,3, 45,3, 39,5, 32,0, 28,9, 22,4 ppm; MS (ESI) Точная расч. масса для C<sub>31</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 559,26, обнаруженная: 559,35.

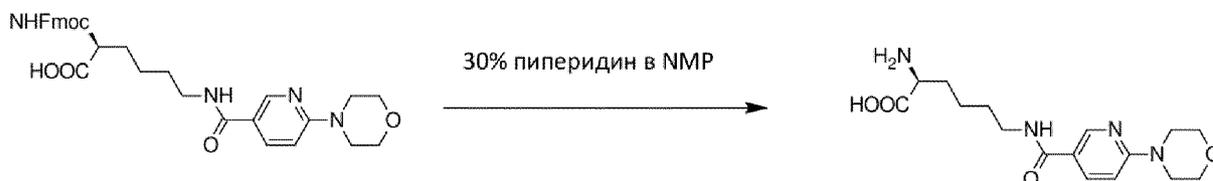
Способ 5. Синтез (2S)-2-амино-6-{{6-(морфолин-4-ил)пиридин-3-карбонил}амино}гексановой кислоты (N6-(6-морфолиноникотиноил)-L-лизина) (LYS(MN))

Процедура 1



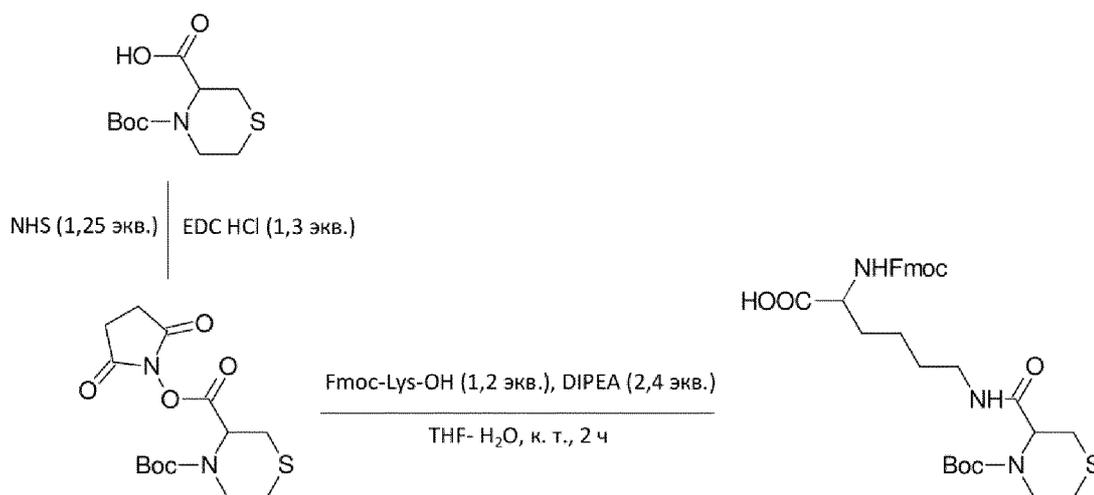
Защитную группу Fmoc в N2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-N6-(6-морфолиноникотиноил)-L-лизине (способ 4) можно удалить с помощью стандартных процедур, известных в уровне техники, например с применением 20% пиперидина в DMF.

Процедура 2



Модифицированный лизин растворяли в 700 мкл NMP (15 мг, 26,87 мкмоль). Затем к раствору (пиперидин:NMP = 7:3; 1 мл) добавляли 300 мкл пиперидина при перемешивании. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем обеспечивали осаждение модифицированного лизина и промывали его 3 раза в холодном диэтиловом эфире (10 мл) с применением центрифугирования (4000 g, 10 минут, 4°C). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) применяли для подтверждения удаления Fmoc 1H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 11,89 (s, 1H), 8,85 (dd, 1H), 7,89 (dd, 1H), 7,34 (dd, 1H), 3,52-3,71(m, 8H), 3,35 (t, 1H), 2,72-2,61 (t, 2H), 2,01-1,57 (m, 6H) ppm. MS (ESI) Точная расч. масса для [M+H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>: 352,55, обнаруженная: 352,04.

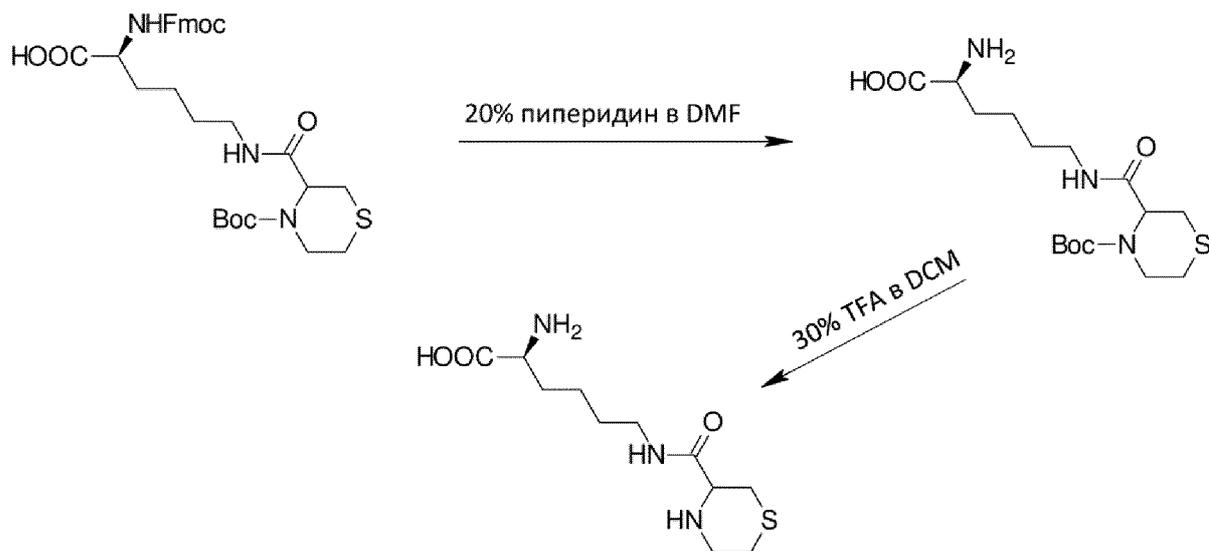
Способ 6. Синтез N2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-N6-(4-(трет-бутоксикарбонил)тиоморфолин-3-карбонил)-L-лизина



Fmoc-L-Lys-OH (8,94 г, 24,26 ммоль, 1,2 экв.) растворяли в смеси THF-вода (1:1, 800 мл) при механическом перемешивании и при комнатной температуре. Добавляли одной порцией раствор ранее полученного активированного сложного эфира (способ 3) в DCM с последующим добавлением DIPEA (6,27 г, 48,53 ммоль, 2,4 экв.). Реакционную смесь дополнительно перемешивали при комнатной температуре до поглощения исходного материала (TLC, 2 ч), затем добавляли EtOAc (250 мл). Смесь подкисляли с помощью HCl (1 М, 200 мл), выливали в делительную воронку, и слои разделяли. Водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (2 x 250 мл). Органические слои объединяли, промывали солевым раствором (200 мл), высушивали над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт получали в виде маслянистого остатка светло-желтого цвета, который растворяли в DCM, адсорбировали на силикагеле и очищали посредством флэш-хроматографии на колонке (7" x 3") с силикагелем. Колонку промывали с помощью 50%-70% этилацетата в гексанах с элюированием продукта под вакуумной вытяжкой. Фракции, содержащие необходимый продукт, объединяли и концентрировали в вакууме с получением N<sub>2</sub>-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-N<sub>6</sub>-(4-(трет-бутоксикарбонил)тиоморфолин-3-карбонил)-L-лизина (9,1 г, 75%) в виде твердого вещества грязно-белого цвета. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,75 (d, J = 7,5Hz, 2H), 7,63-7,51 (m, 2H), 7,38 (t, J = 7,5Hz, 2H), 7,29 (t, J = 7,5Hz, 2H), 5,71 (dd, J = 7,5, 23Hz, 1H), 4,97 (br s, 1H), 4,57-4,23 (m, 4H), 4,20 (t, J = 7Hz, 1H), 3,51-3,18 (m, 3H), 3,17-2,96 (br s, 1H), 2,77 (d, J = 12,5Hz, 1H), 2,70-2,58 (m, 1H), 2,38 (d, J = 12,5Hz, 1H), 1,98-1,86 (m, 1H), 1,85-1,73 (m, 1H), 1,66-1,53 (m, 2H), 1,46 (br s, 12H) ppm; <sup>13</sup>C ЯМР (125 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 175,0, 156,4, 155,8, 143,9, 141,4, 127,9, 127,3, 125,3, 120,1, 67,3, 60,6, 53,8, 47,3, 39,2, 31,5, 29,1, 28,5, 26,7, 22,3 ppm; MS (ESI) Точная расч. масса для C<sub>31</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S [M+Na]<sup>+</sup>: 620,24, обнаруженная: 620,35.

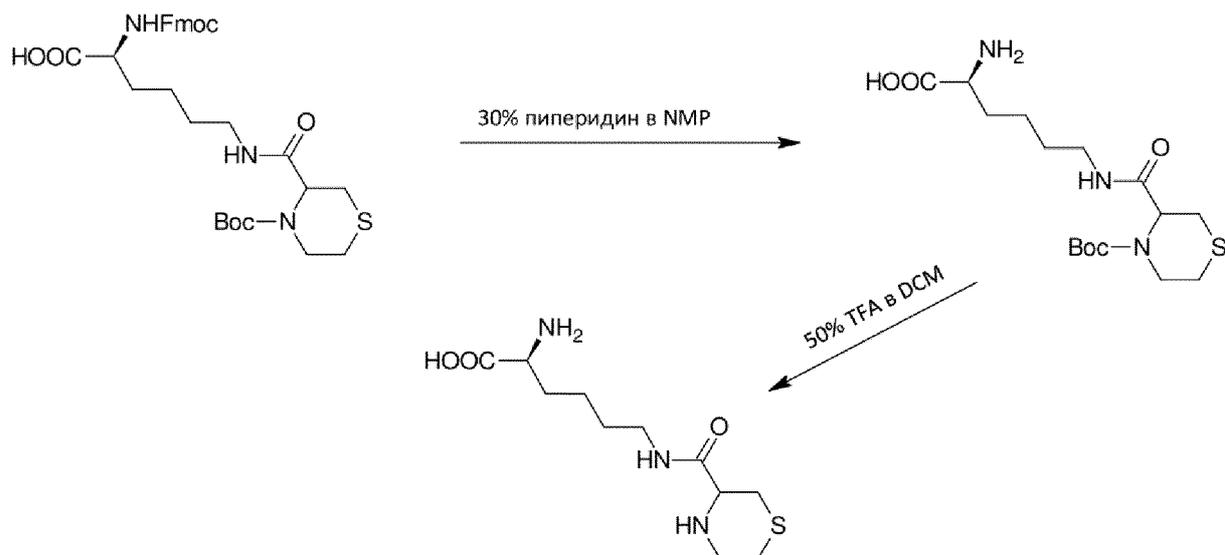
Способ 7. Синтез (2S)-2-амино-6-[(тиоморфолин-3-карбонил)амино]гексановой кислоты (N6-(тиоморфолин-3-карбонил)-L-лизина) (LYS(TM))

Процедура 1



Защитную группу Fmoc в N2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-N6-(4-(трет-бутоксикарбонил)тиоморфолин-3-карбонил)-L-лизине (способ б) можно удалить с помощью стандартных процедур, известных в уровне техники, например, с применением 20% пиперидина в DMF. Подобным образом защитную группу Boc можно удалить с помощью стандартных процедур, известных в уровне техники, например с применением 30% TFA в DCM.

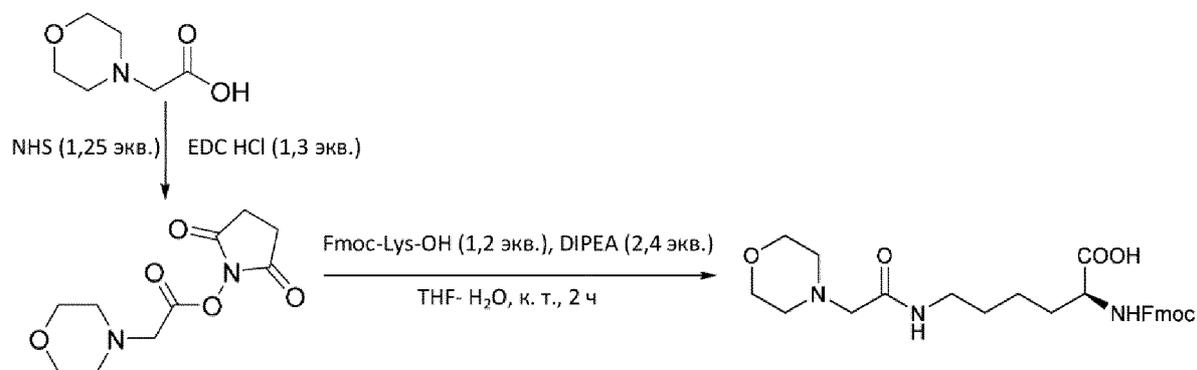
Процедура 2



Модифицированный лизин растворяли в 700 мкл NMP (15 мг, 25,12 мкмоль). Затем к раствору (пиперидин:NMP = 7:3; 1 мл) добавляли 300 мкл пиперидина при перемешивании. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут с удалением защитной группы Fmoc. Затем обеспечивали осаждение

модифицированного лизина и промывали его 3 раза в холодном диэтиловом эфире (10 мл) с применением центрифугирования (4000 g, 10 минут, 4°C). После высушивания на воздухе в течение ночи продукт растворяли в 50% растворе TFA:DCM (1 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут. Раствор TFA:DCM удаляли с применением роторного испарителя, а также обеспечивали осаждение и промывали его 2 раза в холодном этиловом эфире. Удаление Fmoc подтверждали с применением <sup>1</sup>H ЯМР: δ 11,56-12,04 (1H, br), 7,34 (s, 1H), 3,65-3,76 (dd, 2H), 3,42 (t, *J* = 7,3 Гц, 1H), 3,01-3,15 (m, 2H), 2,70-2,89(m, 2H), 2,55-2,61 (t, *J* = 5,6 Гц, 2H), 2,06-2,18 (m, 2H), 1,74-1,85 (m, 2H), 1,58-1,64 (q, 2H) 1,05 (1H, s) ppm и MS (ESI) Точная расч. масса для [M+H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>: 279,22, обнаруженная: 279,62.

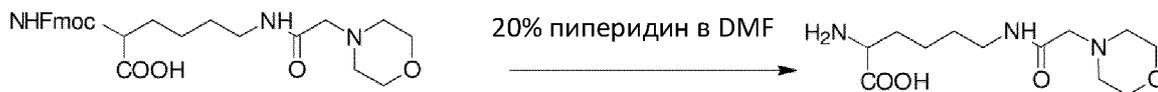
Способ 8. Синтез N2-(1-{{(морфолин-4-ил)ацетил}окси}пирролидин-2,5-дион)-L-лизина



Следующую процедуру можно применять для получения N2-(1-{{(морфолин-4-ил)ацетил}окси}пирролидин-2,5-дион)-L-лизина. Fmoc-L-Lys-OH (1,2 экв.) можно растворить в смеси THF-вода (1:1, 800 мл) при механическом перемешивании и при комнатной температуре. Раствор ранее полученного активированного сложного эфира в DCM можно добавить одной порцией с последующим добавлением DIPEA (2,4 экв.). Реакционную смесь можно дополнительно перемешивать при комнатной температуре до поглощения исходного материала (TLC, 2 ч), затем можно добавить EtOAc (250 мл). Смесь можно подкислить с помощью HCl (1 M, 200 мл), вылить в делительную воронку, и слои разделить. Водный слой можно экстрагировать с помощью EtOAc (2 x 250 мл). Органические слои можно объединить, промыть солевым раствором (200 мл), высушить над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, профильтровать и концентрировать в вакууме. Неочищенный продукт можно растворить в DCM, адсорбировать на силикагеле и очистить посредством флэш-хроматографии на колонке (7" x 3") с силикагелем. Колонку можно промыть с помощью 50%-70% этилацетата в гексанах с элюированием продукта под вакуумной вытяжкой. Фракции, содержащие необходимый продукт, можно объединить и концентрировать в вакууме с получением N2-(N2(1-{{(морфолин-4-ил)ацетил}окси}пирролидин-2,5-дион)-L-лизина.

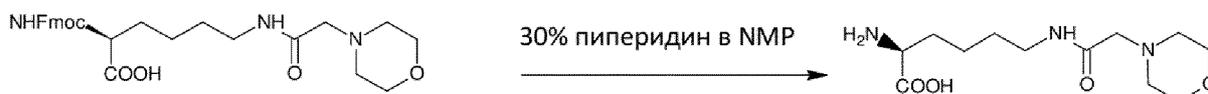
Способ 9. Синтез (2S)-2-амино-6-[2-(морфолин-4-ил)ацетида]гексановой кислоты (N6-(2-морфолиноацетил)-L-лизина) (LYS(M))

Процедура 1



Защитную группу Fmoc в N2-(1-{{(морфолин-4-ил)ацетил}окси}пирролидин-2,5-дион)-L-лизине (способ 8) можно удалить с помощью стандартных процедур, известных в уровне техники, например, с применением 20% пиперидина в DMF.

Процедура 2



Модифицированный лизин растворяли в 700 мкл NMP (15 мг, 25,02 мкмоль). Затем к раствору (пиперидин:NMP = 7:3; 1 мл) добавляли 300 мкл пиперидина при перемешивании. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем обеспечивали осаждение модифицированного лизина и промывали его 3 раза в холодном диэтиловом эфире (10 мл) с применением центрифугирования (4000 g, 10 минут, 4°C). Удаление Fmoc подтверждали с применением Н-ЯМР: 1H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 12,01 (br s, 1H), 3,62-3,74 (m, 4H), 3,40 (t, 1H), 3,29 (s, 2H), 3,10 (t, 1H), 2,59-2,70 (m, 4H), 1,88-2,01 (m, 2H), 1,58-1,65 (m, 2H), и 1,46-1,56 (q, 2H) и MS (ESI) Точная расч. масса для [M+H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>: 273,17, обнаруженная: 273,33.

**Пример 2**

Синтез пептидных дендронов с модифицированными лизинами

Синтезировали серию пептидных дендронов (таблица 2). Модифицированные лизины либо непосредственно включали во время синтеза пептидов с применением модифицированных лизинов, синтезированных в способах 5, 7 и 9 выше (тех, которые отмечены “\*” в таблице), либо их включали впоследствии за счет модификации боковых цепей лизина (ε-амины) с использованием N-гидроксисукцинимидной химии и соединений, синтезированных в способе 1-3 выше в растворе после отщепления от смолы. PD1-PD3 и PD3(His) синтезировали для сравнения, и они содержат немодифицированные лизины (PD 1-3) или гистидин вместо лизина (PD3(His)).

Пептид ный дендро н	Последовательность	Фрагменты последовательностей согласно стандарту ST.26 ВОИС в сопутствующем перечне (ID последовательностей) (X = нестандартная аминокислота)
PD1	({LEU}{ARG}) <sub>8</sub> ( <i>LYS</i> {LEU}{ARG}) <sub>4</sub> ( <i>LYS</i> {LEU}{ARG}) <sub>2</sub> <i>LYS</i> {GLY}{VAL}{CIT}{GLY}{GLY}{SER}{CYS}	LRKLRKLRKGVXGGSC (SEQ ID NO 7) LRKLRKLR (SEQ ID NO 8) LRKLR (SEQ ID NO 9)
PD2	({ARG}{LEU}{LYS}) <sub>8</sub> ( <i>LYS</i> {ARG}{LEU}{LYS}) <sub>4</sub> ( <i>LYS</i> {ARG}{LEU}{LYS}) <sub>2</sub> <i>LYS</i> {GLY}{VAL}{CIT}{GLY}{GLY}{SER}{CYS}	RLKKRLKKRLKKGXVXGGSC (SEQ ID NO 10) RLKKRLKKRLK (SEQ ID NO 11) RLKKRLK (SEQ ID NO 12)
PD3	({LYS}{LEU}{ARG}) <sub>8</sub> ( <i>LYS</i> {LYS}{LEU}{ARG}) <sub>4</sub> ( <i>LYS</i> {LYS}{LEU}{ARG}) <sub>2</sub> <i>LYS</i> {GLY}{VAL}{CIT}{GLY}{GLY}{SER}{CYS}	KLRKKLRKKLRKGVXGGSC (SEQ ID NO 13) KLRKKLRKKLR (SEQ ID NO 14) KLRKKLR (SEQ ID NO 15)
PD3(Hi s)	({HIS}{LEU}{ARG}) <sub>8</sub> ( <i>LYS</i> {HIS}{LEU}{ARG}) <sub>4</sub> ( <i>LYS</i> {HIS}{LEU}{ARG}) <sub>2</sub> <i>LYS</i> {GLY}{VAL}{CIT}{GLY}{GLY}{SER}{CYS}	HLRKHLRKHLRKGXVXGGSC (SEQ ID NO 16) HLRKHLRKHLR (SEQ ID NO 17) HLRKHLR (SEQ ID NO 18)
PD1(M)	({LEU}{LYS(M)}) <sub>8</sub> ( <i>LYS</i> {LEU}{LYS(M)}) <sub>4</sub> ( <i>LYS</i> {LEU}{LYS(M)}) <sub>2</sub> <i>LYS</i> {GLY}{VAL}{CIT}{GLY}{GLY}{SER}{CYS}	LXKLXKLXKGVXGGSC (SEQ ID NO 19) LXKLXKLX (SEQ ID NO 20)
PD1(M N)	({LEU}{LYS(MN)}) <sub>8</sub> ( <i>LYS</i> {LEU}{LYS(MN)}) <sub>4</sub> ( <i>LYS</i> {LEU}{LYS(MN)}) <sub>2</sub> <i>LYS</i> {GLY}{VAL}{CIT}{GLY}{GLY}{SER}{CYS}	LXKLXKLXKGVXGGSC (SEQ ID NO 21) LXKLXKLX (SEQ ID NO 22)
PD1(T M)	({LEU}{LYS(TM)}) <sub>8</sub> ( <i>LYS</i> {LEU}{LYS(TM)}) <sub>4</sub> ( <i>LYS</i> {LEU}{LYS(TM)}) <sub>2</sub> <i>LYS</i> {GLY}{VAL}{CIT}{GLY}{GLY}{SER}{CYS}	LXKLXKLXKGVXGGSC (SEQ ID NO 23) LXKLXKLX (SEQ ID NO 24)
PD2(M)	({ARG}{LEU}{LYS(M)}) <sub>8</sub> ( <i>LYS</i> {A	RLXKRLXKRLXKGVXGGSC (SEQ

Пептид ный дендро н	Последовательность	Фрагменты последовательностей согласно стандарту ST.26 ВОИС в сопутствующем перечне (ID последовательностей) (X = нестандартная аминокислота)
	RG}{LEU}{LYS(M)}) <sub>4</sub> {LYS}{ARG}{LEU}{LYS(M)}) <sub>2</sub> {LYS}{GLY}{VAL}{CIT}{GLY}{GLY}{SER}{CYS}	ID NO 25) RLXKRLXKRLX (SEQ ID NO 26) RLXKRLX (SEQ ID NO 27)
PD2(M N)	({ARG}{LEU}{LYS(MN)}) <sub>8</sub> {LYS}{ARG}{LEU}{LYS(MN)}) <sub>4</sub> {LYS}{ARG}{LEU}{LYS(MN)}) <sub>2</sub> {LYS}{GLY}{VAL}{CIT}{GLY}{GLY}{SER}{CYS}	RLXKRLXKRLXKGVXGGSC (SEQ ID NO 28) RLXKRLXKRLX (SEQ ID NO 29) RLXKRLX (SEQ ID NO 30)
PD2(T M)	({ARG}{LEU}{LYS(TM)}) <sub>8</sub> {LYS}{ARG}{LEU}{LYS(TM)}) <sub>4</sub> {LYS}{ARG}{LEU}{LYS(TM)}) <sub>2</sub> {LYS}{GLY}{VAL}{CIT}{GLY}{GLY}{SER}{CYS}	RLXKRLXKRLXKGVXGGSC (SEQ ID NO 31) RLXKRLXKRLX (SEQ ID NO 32) RLXKRLX (SEQ ID NO 33)
PD3(M)	({LYS(M)}{LEU}{ARG}) <sub>8</sub> {LYS}{LYS(M)}{LEU}{ARG}) <sub>4</sub> {LYS}{LYS(M)}{LEU}{ARG}) <sub>2</sub> {LYS}{GLY}{VAL}{CIT}{GLY}{GLY}{SER}{CYS}	XLRKXLRKXLRKGVXGGSC (SEQ ID NO 34) XLRKXLRKXLR (SEQ ID NO 35) XLRKXLR (SEQ ID NO 36)
PD3(M N)	({LYS(MN)}{LEU}{ARG}) <sub>8</sub> {LYS}{LYS(MN)}{LEU}{ARG}) <sub>4</sub> {LYS}{LYS(MN)}{LEU}{ARG}) <sub>2</sub> {LYS}{GLY}{VAL}{CIT}{GLY}{GLY}{SER}{CYS}	XLRKXLRKXLRKGVXGGSC (SEQ ID NO 37) XLRKXLRKXLR (SEQ ID NO 38) XLRKXLR (SEQ ID NO 39)
PD3(T M)	({LYS(TM)}{LEU}{ARG}) <sub>8</sub> {LYS}{LYS(TM)}{LEU}{ARG}) <sub>4</sub> {LYS}{LYS(TM)}{LEU}{ARG}) <sub>2</sub> {LYS}{GLY}{VAL}{CIT}{GLY}{GLY}{SER}{CYS}	XLRKXLRKXLRKGVXGGSC (SEQ ID NO 40) XLRKXLRKXLR (SEQ ID NO 41) XLRKXLR (SEQ ID NO 42)
PD3(M N)*	({LYS(MN)}{LEU}{ARG}) <sub>8</sub> {LYS}{LYS(MN)}{LEU}{ARG}) <sub>4</sub> {LYS}{LYS	XLRKXLRKXLRKGVXGGSC (SEQ ID NO 43)

Пептид ный дендро н	Последовательность	Фрагменты последовательностей согласно стандарту ST.26 ВОИС в сопутствующем перечне (ID последовательностей) (X = нестандартная аминокислота)
	(MN){LEU}{ARG}) <sub>2</sub> <b>LYS</b> {GLY}{ VAL}{CIT}{GLY}{GLY}{SER}{CY S}	XLRKXLRKXLR (SEQ ID NO 44) XLRKXLR (SEQ ID NO 45)
PD3(Т М)*	({LYS(TM){LEU}{ARG}) <sub>8</sub> ( <b>LYS</b> {L YS(TM){LEU}{ARG}) <sub>4</sub> ( <b>LYS</b> {LYS (TM){LEU}{ARG}) <sub>2</sub> <b>LYS</b> {GLY}{V AL}{CIT}{GLY}{GLY}{SER}{CYS }	XLRKXLRKXLRKGVXGGSC (SEQ ID NO 46) XLRKXLRKXLR (SEQ ID NO 47) XLRKXLR (SEQ ID NO 48)

Таблица 2. Краткое описание пептидных дендронов, в которых жирным шрифтом и курсивом **LYS** выделена точка ветвления. \* указывает на то, что пептиды синтезировали непосредственно с модифицированными лизинами.

#### **Процедура а). Синтез пептидных дендронов посредством непосредственного внедрения модифицированных лизинов или гистидина**

Пептидные дендроны синтезировали с применением стандартного твердофазного пептидного синтеза с помощью конденсации фрагментов на амидной смоле Ринка. Каждый фрагмент синтезировали на 2-хлортритильной смоле (высококислотонестойчивая смола) с помощью Fmoc-химии и отделяли от смолы трифторэтанолом для сохранения всех защитных групп на боковых цепях и N-конце. Затем собирали пептидные дендроны с применением фрагментов и N $\alpha$ ,N $\epsilon$ -ди-Fmoc-L-лизина в качестве точек ветвления и впоследствии отщепляли от смолы трифторуксусной кислотой (TFA), что приводит к C-концевому амидированию. Сборка схематически показана на фигуре 1, проиллюстрированной с помощью пептидных дендронов с основной последовательностью PD3, например, PD3(M), PD3(MN) и PD3(TM). Все защитные группы удаляли во время стадии отщепления. Неочищенный пептид очищали посредством жидкостной хроматографии высокого давления (HPLC) с помощью градиента вода:ацетонитрил. Чистоту и массу подтверждали посредством HPLC и масс-спектрометрии с ионизацией распылением (ESI). Инструмент деконволюции применяли для интерпретации масс-спектров ESI, которые содержали одну и ту же частицу в форме разных зарядных состояний. Многозарядные частицы пересчитывали в его однозарядную форму и группировали вместе в соответствии со значением масса/заряд и шириной пика и

представляли в атомных единицах массы (а.е.м.). PD1: MW 4540,1 [4540,2 а.е.м.]. PD2: MW 7097,1 [7097,5 а.е.м.]. PD3: MW 7097,1 [7097,5 а.е.м.]. PD3(His): MW 7223,1 [7223,1 а.е.м.]. PD3(MN)\*: MW 9760,0 [9759,9 а.е.м.]. PD3(TM)\*: MW 8905,5 [8905,5 а.е.м.].

**Процедура б). Синтез пептидных дендронов посредством модификации  $\epsilon$ -аминов лизина в пептидах после отщепления промежуточных соединений дендронов от смолы**

2 мкмоль пептидного дендрона (PD1, PD2 или PD3) суспендировали в свежеполученном 0,1 М бикарбонате натрия, pH 8,0. Смесь подвергали воздействию ультразвука в течение 10 минут. 40 мМ NHS-функционализированных промежуточных соединений (способы 1-3) получали в DMAC и добавляли по каплям к раствору пептида (0,5 мМ) при перемешивании. NHS-функционализированные промежуточные соединения добавляли в 1,5 молярном избытке в отношении лизинов на пептиде, чтобы гарантировать 100% превращение  $\epsilon$ -амидов лизина. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 0,5 часа и непрореагировавшее промежуточное соединение впоследствии удаляли посредством ультрацентрифугирования (MWC0 3,0 кДа). Масс-спектрометрию с ионизацией электрораспылением применяли для подтверждения модификации. Инструмент деконволюции применяли для интерпретации масс-спектров ESI, которые содержали одну и ту же частицу в форме разных зарядных состояний. Многозарядные частицы пересчитывали в его однозарядную форму и группировали вместе в соответствии со значением масса/заряд и шириной пика и представляли в атомных единицах массы (а.е.м.). PD2(M): MW 9904,9 [9904,9 а.е.м.]. PD2(MN): MW 9759,9 [9808,1 а.е.м. (MW+муравьиная кислота)]. PD2(TM): MW 8905,5 [8905,5 а.е.м.]. PD3(M): MW 9904,8 [9905,0 а.е.м.]. PD3(MN): MW 9759,9 [9808,1 а.е.м. (MW+муравьиная кислота)]. PD3(TM): MW 8905,5 [8905,6 а.е.м.].

**Пример 3**

Внедрение нацеливающих фрагментов или полиэтиленгликоля (PEG) в пептидные дендроны

**а) Получение метокси-PEG- и Mal-PEG-пептидных дендронов**

Метокси-PEG (n=36), функционализированный с помощью малеимида (m-dPEG<sub>36</sub>-MAL; Quanta BioDesign, Плейн-Сити, Огайо), и бис-малеимид-PEG (n=19) (Bis-Mal-PEG<sub>19</sub> (BroadPharm, Сан-Диего, Калифорния)) (соединения №1 и №2 из таблицы 1) получали в виде 1,25 и 5 мМ раствора соответственно в 20 мМ натрий-цитратном буфере, pH 5,5. Раствор пептидных дендронов (полученный, как описано в примере 2, 1 мМ) равного объема в том же буфере смешивали с растворами PEG при 1,25- и 5-кратном молярном избытке соответственно. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в

течение 2 часов и подтверждали посредством масс-спектрометрии. Избыток PEG удаляли посредством диализа в PBS и воде или в 20 мМ цитрате натрия, pH 5,5, для конъюгатов Mal-PEG-PD. Масс-спектрометрию с ионизацией электрораспылением применяли для подтверждения модификации. MeO-PEG(36)-PD2(MN) MW 11528,2 (11528,2 а.е.м.), MeO-PEG(36)-PD3(TM): MW 10673,9 (10674,1 а.е.м.), MeO-PEG(36)-PD2(MN): MW 11528,2 (11529,2 а.е.м.), MeO-PEG(36)-PD3(TM): MW 10674,2 (10673,9 а.е.м.). Mal-PEG(19)-PD1: MW 8296,4 (8297,2 а.е.м.), Mal-PEG(19)-PD2(MN): MW 10959,3 (10960,3 а.е.м.), Mal-PEG(19)-PD3(MN): MW 10959,3 (10960,3 а.е.м.) и Mal-PEG(19)-PD2(MN): MW 10959,3 (10960,3 а.е.м.).

#### б) Получение нацеленных конъюгатов PEG-пептидный дендрон

Нацеливающие пептиды (соединения №3-№6 из таблицы 1) получали с применением стандартного твердофазного пептидного синтеза с применением Fmoc-химии. N-концевое ацетилирование проводили с помощью 10% уксусного ангидрида в DMF перед отщеплением от смолы. TFP-PEG (n=36)-малеимид (Quanta BioDesign, Плейн-Сити, Огайо) (5 мМ) и ацилированные пептиды (7,5 мМ) растворяли в свежеполученном 0,1 М натрий-бикарбонатном буфере, pH 8,0, и раствор пептида добавляли к раствору PEG в 1,25 молярном избытке. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут перед тем, как pH понижали до 5,5, и для подтверждения конъюгации применяли масс-спектрометрию. Проводили замену буфера с применением колонки Vivaspin с MWCO 3,5 кДа (Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури) на 20 мМ натрий-цитратный буфер, pH 5,5. Впоследствии очищенный продукт добавляли к пептидному дендрону (полученному, как описано в примере 2) в 2-кратном избытке в 20 мМ натрий-цитратном буфере, pH 5,5, при комнатной температуре в течение 2 ч. Для подтверждения модификации применяли масс-спектрометрию с ионизацией электрораспылением. Инструмент деконволюции применяли для интерпретации масс-спектров ESI, которые содержали одну и ту же частицу в форме разных зарядных состояний. Многочargedные частицы пересчитывали в его однозарядную форму и группировали вместе в соответствии со значением масса/заряд и шириной пика и представляли в атомных единицах массы (а.е.м.). TfR-PEG-PD3(MN)\*: 13855,0 MW (13856,7 а.е.м.). cRGD-PEG-PD3(MN)\*: 12188,5 MW (12188,2 а.е.м.). TfR-PEG-PD3(TM)\*: 13855,0 MW (13856,7 а.е.м.). cRGD-PEG-PD3(TM)\*: 12188,5 MW (12188,6 а.е.м.).

#### с) Получение конъюгатов сахар-PEG-Mal

N,N-диизопропилэтиламин (DIPEA) (0,0860 ммоль) добавляли при комнатной температуре к раствору функционализированного амином моно- или триацетилгалактозамина (GalNAc) (соединения №7 и 8 из таблицы 1; Sussex Research,

Онтарио, Канада) (0,01620 ммоль) и MAL-dPEG<sub>36</sub>-TFP сложного эфира (Quanta BioDesign, Плейн-Сити, Огайо) (0,020261 ммоль) в N,N-диметилформамиде (6 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч и подтверждали конъюгацию посредством HPLC-MS. Впоследствии продукт очищали с применением HPLC с обращенной фазой. Впоследствии очищенный продукт добавляли к пептидному дендрону (полученному, как описано в примере 2) в 2-кратном избытке в 20 mM натрий-цитратном буфере, pH 5,5, при комнатной температуре в течение 2 ч. Для подтверждения модификации применяли масс-спектрометрию с ионизацией электрораспылением. Инструмент деконволюции (Agilent Mass Hunter Quantitative Analysis) применяли для интерпретации масс-спектров ESI, которые содержали одну и ту же частицу в форме разных зарядных состояний. Многочargedные частицы пересчитывали в его однозарядную форму и группировали вместе в соответствии со значением масса/заряд и шириной пика и представляли в атомных единицах массы (а.е.м.). GalNAc-PD3(TM)\* MW 11708,6 (фрагментированный: 11506,6) [11506,6 а.е.м.]. Tri GalNAc-PD3(TM)\*: MW 12679,1 (фрагментированный: 12071,2) [11507,0 а.е.м.].

#### **Пример 4**

Самосборка наночастиц (NP) пептидный дендрон/ДНК в монодисперсные наночастицы

Катионные пептидные дендроны (PD) подвергаются самосборке с анионными нуклеиновыми кислотами в наночастицы. NP были почти сферическими и характеризовались диаметром 50-75 нм, что определили с применением стандартных методик для наночастиц, которые включали трансмиссионную электронную микроскопию и динамическое светорассеяние.

##### **а) Получение NP**

Растворы ДНК (40 мкг/мл; плаزمиды с люциферазой gWiz (6732 п.о) (Genlantis, Сан-Диего, Калифорния)) и пептидных дендронов (полученных, как описано в примере 2) равного объема получали в 20 mM HEPES, pH 7,0. Растворы пептидов получали в концентрациях, соответствующих отношению аргинин в пептидном дендроне : фосфат в ДНК (N:P), составляющему 2:1. Растворы ДНК добавляли по каплям к растворам пептидов при осторожном встряхивании, чтобы гарантировать однородность частиц. Обеспечивали образование наночастиц (NP) ДНК/пептид при комнатной температуре в течение 30 минут. Конечная концентрация ДНК в растворе NP составляла 20 мкг/мл.

##### **б) Динамическое светорассеяние**

Данные динамического светорассеяния собирали с применением Zetasizer ZS (Malvern), зеленого лазера и кварцевой кюветы ZEN2112. Гидродинамический диаметр и коэффициент полидисперсности (PDI) определяли с применением кумулятивного анализа

методом аппроксимации. Все точки данных отображают среднее значение трех или более отдельно полученных образцов, показанных в таблице 3.

с) Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЕМ)

Образцы наносили на медные сетки 400 меш с формваровой пленкой-подложкой, подвергнутые воздействию тлеющего разряда, негативно окрашивали с помощью 1% уранилацетата, высушивали на воздухе и просматривали на трансмиссионном электронном микроскопе (Теснаи Т12, Thermo Fisher Scientific) при рабочем напряжении, составляющем 80 кВ. Цифровые изображения получали с применением вмонтированной в нижней части ПЗС-камеры АМТ и программного обеспечения АМТ600. Морфологию определяли, как показано в таблице 3.

Состав	Диаметр (нм)	Строение
NP PD1	61,2 +/- 5,4	Сфера
NP PD2	69,2 +/- 7,1	Сфера
NP PD2(M)	91,0 +/- 4,3	Сфера
NP PD2(MN)	65,3 +/- 6,9	Сфера
NP PD2(TM)	78,7 +/- 8,2	Сфера
NP PD3	65,8 +/- 8,9	Сфера
NP PD3(M)	90,1 +/- 6,5	Сфера
NP PD3(MN)	62,0 +/- 5,4	Сфера
NP PD3(TM)	61,4 +/- 7,4	Сфера
NP PD3(His)	75,1 +/- 5,9	Сфера

Таблица 3. Характеристика наночастиц (NP) на основе пептидных дендримеров и ДНК.

Все измерения определяли на основе корреляционной функции интенсивности с применением кумулятивного анализа методом аппроксимации. Измерения собирали в трех повторностях и представляли как среднее значение +/- стандартное отклонение.

**Пример 5**

Самосборка наночастиц (NP) пептидный дендрон/РНК в монодисперсные наночастицы

Катионные пептидные дендроны (PD) подвергаются самосборке с анионными нуклеиновыми кислотами в наночастицы. Диаметр NP составлял приблизительно 50 нм, что определили с применением стандартных методик для наночастиц, которые включали динамическое светорассеяние.

## а) Получение NP

Растворы РНК (40 мкг/мл) и пептидов (полученные, как описано в примере 2) равного объема получали в 20 mM HEPES, pH 7,0. Конкретно, получали мРНК CleanCap, кодирующую mCherry (Trilink, Сан-Диего, Калифорния), и siRNA, нацеливающуюся на CTNNB1 (Dharmacon/Horizon Discovery, Лафайетт, Колорадо). Растворы пептидов готовили при концентрациях, соответствующих соотношению аргинин в пептидном дендроне : фосфат в мРНК (N:P), составляющему 4 : 1. Растворы РНК добавляли по каплям к растворам пептидов при осторожном вихревом перемешивании, чтобы гарантировать однородность частиц. Обеспечивали образование наночастиц РНК/пептид при комнатной температуре в течение 30 минут. Конечная концентрация РНК в растворе NP составляла 20 мкг/мл. В качестве необязательной стадии в состав добавляли Lipofectin® (DOTMA:DOPE (% вес/вес) =1) (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, Массачусетс). Lipofectin® разбавляли в 20 mM HEPES, pH 7,0, чтобы соответствовать 1-4% вес/вес относительно РНК. Раствор Lipofectin® добавляли к раствору пептидных дендронов непосредственно до добавления раствора РНК, как описано ранее. Наночастицы, содержащие Lipofectin®, отмечены как “липид”.

## б) Динамическое светорассеяние

Данные динамического светорассеяния собирали с применением Zetasizer ZS (Malvern), зеленого лазера и кварцевой кюветы ZEN2112. Гидродинамический диаметр и коэффициент полидисперсности (PDI) определяли с применением кумулятивного анализа методом аппроксимации. Все точки данных представляют собой среднее значение трех или более отдельно полученных образцов. Результаты показаны в таблице 4.

Состав	Гидродинамический диаметр (нм)	
	мРНК	siRNA
NP PD2	55,8 +/-6,1	50,5 +/- 4,8
NP PD2(M)	73,1 +/- 5,2	59,1 +/- 3,1
NP PD2(MN)	60,1 +/- 4,8	54,7 +/- 5,0
NP PD2(TM)	53,4 +/- 5,4	54,6 +/- 5,2
NP PD3	58,3 +/- 2,7	57,2 +/- 3,1
NP PD3(M)	71,2 +/-3,9	66,2 +/- 5,9
NP PD3(MN)	63,1 +/- 5,2	60,2 +/- 4,5

Состав	Гидродинамический диаметр (нм)	
	мРНК	siRNA
NP PD3(TM)	52,3 +/- 3,7	63,0 +/- 3,9
NP PEG-PD2	77,5 +/- 8,9	56,9 +/- 9,1
NP PEG-PD2(M)	85,2 +/- 5,4	65,0 +/- 5,8
NP PEG-PD2(MN)	67,2 +/- 6,9	60,1 +/- 3,3
NP PEG-PD2(TM)	71,2 +/- 5,8	65,4 +/- 5,6
NP PEG-PD3	80,0 +/- 4,9	76,6 +/- 2,8
NP PEG-PD3(M)	82,8 +/- 6,0	73,7 +/- 5,4
NP PEG-PD3(MN)	61,0 +/- 5,7	51,2 +/- 7,9
NP PD2, липид	50,9 +/- 3,2	45,0 +/- 4,5
NP PD2(M), липид	61,0 +/- 5,6	59,2 +/- 2,1
NP PD2(MN), липид	55,5 +/- 4,5	42,5 +/- 3,9
NP PD2(TM), липид	53,8 +/- 5,9	40,6 +/- 4,7
NP PD3, липид	61,1 +/- 3,0	43,9 +/- 8,4
NP PD3(M), липид	60,1 +/- 3,5	56,0 +/- 9,9
NP PD3(MN), липид	50,1 +/- 5,0	41,8 +/- 6,0
NP PD3(TM), липид	54 +/- 4,5	42,3 +/- 6,4

Таблица 4. Гидродинамический диаметр NP с РНК, полученных с использованием PD3(MN) с липидом и без него. Все измерения определяли на основе корреляционной функции интенсивности с применением кумулятивного анализа методом аппроксимации. Измерения собирали в трех повторностях и представляли как среднее значение +/- стандартное отклонение.

### Пример 6

Образование нацеленных наночастиц NP

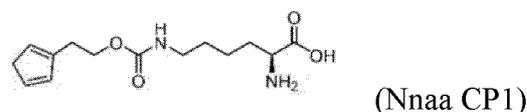
а) Получение наночастиц, содержащих смесь метокси-PEG-пептидных дендронов и нацеленных конъюгатов PEG-пептидный дендрон и ДНК или РНК

Растворы пептидов получали с разными соотношениями пептидного дендрона (полученного, как в примере 2) или метокси-PEG-дендронов (полученных, как в примере 3а) и нацеленных конъюгатов PEG-пептид (полученных, как в примере 3b) в 20 mM HEPES, pH 7,0. Растворы ДНК (люцифераза gWiz) (Genlantis, Сан-Диего, Калифорния, США) или РНК (CleanCap mCherry) (Trilink, Сан-Диего, Калифорния, США) (40 мкг/мл) в одном и том же буфере добавляли по каплям к смеси PD при вихревом перемешивании так, чтобы конечное соотношение аргинин в пептидном дендроне : фосфат в нуклеиновой кислоте (N:P) составляло 4 : 1 (ДНК) и 6 : 1 (РНК). Обеспечивали образование наночастиц нуклеиновая кислота/пептид при комнатной температуре в течение 30 минут. Конечная концентрация нуклеиновой кислоты в растворе наночастиц составляла 20 мкг/мл. В качестве необязательной стадии в состав добавляли Lipofectin® (DOTMA:DOPE (% вес/вес) =1) (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, Массачусетс). Lipofectin® разбавляли в 20 mM HEPES, pH 7,0, чтобы соответствовать 1-4% вес/вес относительно РНК. Раствор Lipofectin® добавляли к раствору пептидных дендронов непосредственно до добавления раствора РНК, как описано ранее.

б) Получение наночастиц, содержащих смесь метокси-PEG-пептидных дендронов и нацеленных конъюгатов PEG-антитело и ДНК или РНК

В случае нацеливающих лигандов на основе антитела получали наночастицы на основе mal-PEG PD и затем конъюгировали их с антителами (соединения № 5 и № 6 из таблицы 1, модифицированные в соответствии с описанным ниже). Растворы пептидов получали с разными соотношениями метокси-PEG-дендронов (пример 3а) и mal-PEG-дендронов (пример 3а) в 20 mM HEPES, pH 7,0. Растворы ДНК (люцифераза gWiz) (Genlantis, Сан-Диего, Калифорния, США) или РНК (CleanCap mCherry) (Trilink, Сан-Диего, Калифорния, США) (40 мкг/мл) в одном и том же буфере добавляли по каплям к смеси PD при вихревом перемешивании с получением конечного соотношения аргинин в пептидном дендроне : фосфат в нуклеиновой кислоте (N:P), составляющего 4 : 1 (ДНК) и 6 : 1 (РНК). Обеспечивали образование наночастиц нуклеиновая кислота/пептид при комнатной температуре в течение 30 минут. Конечная концентрация нуклеиновой кислоты в растворе наночастиц составляла 20 мкг/мл.

Fab и/или полуантитела (одна легкая цепь и одна тяжелая цепь) конструировали с помощью замещения на неприродные аминокислоты в пределах тяжелой цепи:



Неприродная аминокислота в пределах своей боковой цепи содержит циклопентадиен (Nnaa CP1), который может служить в качестве реакционноспособного конца для реакции

Дильса-Альдера. Nnaa CP1 генетически кодировали в последовательность антитела с применением клеток яичника китайского хомячка (CHO), экспрессирующих пару пирролизин-tRNA-синтетаза/tRNA (PylRS)/tRNA(Pyl) *Methanosarcina mazei*, которая доставляет Nnaa CP1 в ответ на Amber-стоп-кодон (TAG). (Amant *et al.* *Angew Chem*, 2019, 58(25):8489-93).

Сконструированные нацеливающие компоненты на основе антитела добавляли к раствору наночастиц нуклеиновая кислота/пептид в 1,25 молярном избытке относительно малеимида при комнатной температуре в течение 2 ч, как описано в примере 6.

Впоследствии смесь гасили посредством добавления N-ацетилцистеина (10-кратный молярный избыток). Избыток антитела удаляли с применением ультрацентрифугирования (MWC0 100 кДа) и реакцию подтверждали с применением соотношений поглощения при A260/A280 и динамического светорассеяния.

### с) Динамическое светорассеяние

Данные динамического светорассеяния собирали с применением Zetasizer ZS (Malvern), зеленого лазера и кварцевой кюветы ZEN2112. Гидродинамический диаметр и коэффициент полидисперсности (PDI) определяли с применением кумулятивного анализа методом аппроксимации. Все точки данных представляют собой среднее значение трех или более отдельно полученных образцов.

Нацеленный конъюгат PEG-пептидный дендрон	Молярное % соотношение нацеленные конъюгаты MeO-PEG-пептидный дендрон : MeO-PEG-PD3(MN)				
	0	12,5	25	50	100
PD3(MN)-Tfr	75,1 +/- 5,0	83,2 +/- 5,6	83,0 +/- 7,3	85,8 +/-9,1	85,4 +/-9,0
PD3(MN)-cRGD	78,3 +/- 4,3	81,2 +/- 7,3	78,2 +/- 5,1	81,8 +/-6,0	84,9 +/- 7,9
PD3(MN)-антитело к CD3	79,1 +/- 6,7	85,3 +/- 9,8	101,9 +/- 8,9	105,2 +/- 4,2	105,6 +/- 3,3
PD3(MN)-MECA32	79,1 +/- 6,7	91,0 +/- 8,7	102,1 +/- 7,6	105,8 +/- 7,1	110,1 +/- 5,9

Таблица 5. Динамическое светорассеяние нацеленных NP с ДНК. Все измерения определяли на основе корреляционной функции интенсивности с применением кумулятивного анализа методом аппроксимации. Измерения собирали в трех повторностях и представляли как среднее значение +/- стандартное отклонение.

Ненацеленные NP	Молярное % соотношение cRGD-PEG-PD3(MN) : MeO-PEG-PD3(MN)

	<b>0</b>	<b>12,5</b>	<b>33,3</b>	<b>66,6</b>	<b>100</b>
PD3(MN)	57,2 нм	56,9 нм	60,2 нм	63,1 нм	66,8 нм
PD3(MN), липид	50,5 нм	59,3 нм	55,4 нм	61,2 нм	60,4 нм
PEG-PD3(MN)	59,1 нм	61,2 нм	60,3 нм	65,3 нм	66,9 нм
PEG-PD3(MN), липид	54,7 нм	56,2 нм	60,1 нм	61,9 нм	64,9 нм

Таблица 6. Диаметр нацеленных NP с siRNA, определенный с помощью динамического светорассеяния. Все данные собирали в трех повторностях и представляли как среднее значение со стандартным отклонением для корреляционной функции интенсивности с применением кумулятивного анализа методом аппроксимации

### Пример 7

NP обеспечивали устойчивые наночастицы с высвобождением ДНК в ответ на стимулы

#### а) Анализ анионной стабильности

Растворы сульфата декстрана (DS) получали в 20 mM HEPES и добавляли к растворам NP (полученным, как описано в примере 4) так, чтобы конечная концентрация DS составила от 100 мг/мл до 1000 мг/мл, и концентрация ДНК составила 10 мкг/мл. После 15-минутного периода распада комплексов добавляли по 15 мкл каждого состава к 2% Е-гелю с этидия бромидом и прогоняли в течение 10 минут. Высвобождение рDNA рассчитывали с применением ImageJ (НИН, Бетесда, Мэриленд) и результаты показаны на фигуре 2А, где процент интактных наночастиц  $I_s$  нанесен на график в виде функции от концентрации DS.

#### б) Ферментативное высвобождение ДНК

NP получали, как описано в примере 4, но в 8 mM буфере на основе L-цистеина HCl, pH 6, при конечной концентрации ДНК, составляющей 0,1 мкг/мкл. Впоследствии добавляли исходный раствор катепсина В (60 единиц/мл). Растворы NP с Cat-B инкубировали при 37°C в течение не более 4 часов. Аликвоты извлекали в соответствующие моменты времени и анализировали посредством электрофореза в агарозном геле, чтобы визуализировать высвобожденную ДНК. В качестве контроля готовили разведения ДНК при разных концентрациях и аналогичным образом добавляли к тому же агарозному гелю для последующего количественного определения с применением программного обеспечения для анализа интенсивности от Bio-rad, и результаты показаны на фигуре 2В.

	<b>Высвобождение ДНК (%)</b>				
<b>Модификация</b>	<b>Немодифицированный</b>	<b>M</b>	<b>MN</b>	<b>TM</b>	<b>Гистидин</b>

<b>PD1</b>	0	0	0	0	-
<b>PD2</b>	0	26	0	22	-
<b>PD3</b>	0	83	98	11	5,2

Таблица 7. Запрограммированное ферментативное высвобождение pDNA. В таблице обобщен % высвобождения pDNA через 1 ч обработки катепсином В с разными составами NP.

### Пример 8

NP демонстрируют специфичность в отношении клеток при трансфекциях *in vitro*

#### а) Трансфекции *in vitro*

Линии клеток H1299, C2C12, HEK393 и HEPG2 высевали в 96-луночные планшеты с планированием 80% конфлюэнтности в пределах 24 часов. C2C12 впоследствии инкубировали в течение 7 дней в модифицированной по Дульбекко среде Игла (DMEM), дополненной 2% лошадиной сыворотки крови для дифференцировки из миобластов в мышечные трубочки. После 24-часового периода восстановления к клеткам добавляли NP (полученные, как описано в примере 2) из расчета 0,2 мкг на лунку в OPTI-MEM (разведение 1:10). После 16-часового периода дополненную NP среду удаляли и добавляли свежую питательную среду. GFP визуализировали с применением Incucyte (EssenBio), а люциферазу/жизнеспособность количественно определяли с применением стандартного протокола для люциферазного репортера ONE-Glo™+Tox (Promega).

Результаты показаны на фигурах 3А, 3В и 3С.

### Пример 9

Внутримышечные трансфекции NP с ДНК *in vivo*

#### а) Внутримышечная доставка

Мышей BALB/C обрабатывали с помощью 5 мкг pDNA (люцифераза gWiz) (Genlantis, Сан-Диего, Калифорния) в комплексе с MeO-PEG-PD(MN) (полученных, как описано в примере 5) на конечность. Экспрессию оценивали еженедельно с применением IVIS (Perkin Elmer). Данные люминесценции собирали в четырех повторностях и представляли как среднее значение +/- стандартное отклонение. Результаты показаны на фигуре 4.

### Пример 10

Экспрессия терапевтических средств с применением NP с ДНК

#### а) Получение MEDI8852 и STK11, кодируемых наночастицами на основе PD

Наночастицы получали, как описано в примере 4, с использованием PD3(MN) и плазмид, которые кодируют терапевтические средства MEDI8852 и STK11. Для экспрессии MEDI8852 NP также получали с помощью TfR-PEG-PD3(MN) и MeO-PD3(MN) (соотношение аргинин в пептидном дендроне : фосфат в нуклеиновой кислоте N:P 4:1),

где 25% пептида составлял TfR-PEG-PD3(MN). Растворы ДНК (40 мкг/мл; плазида MEDI8852 (получена аналогично минимальной плазмиде экспрессии на основе CMV от Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури) или плазмиде STK11 (Origene, Роквилл, Мэриленд)) и пептидных дендронов получали в 20 мМ HEPES, pH 7,0. Растворы пептидных дендронов готовили при концентрациях, соответствующих соотношению аргинин в пептидном дендроне : фосфат в нуклеиновой кислоте (N:P), составляющему 4 : 1. Растворы ДНК добавляли по каплям к растворам пептидов при осторожном встряхивании, чтобы гарантировать однородность частиц. Обеспечивали образование наночастиц ДНК/пептид при комнатной температуре в течение 30 минут. Конечная концентрация ДНК в растворе NP составляла 20 мкг/мл. В качестве контроля плазмиду MEDI8852 также получали с липофектамино-2000 (ThermoFisher, Уолтем, Массачусетс) с применением протокола изготовителя.

б) Исследования трансфекции *in vitro* с терапевтическими средствами, кодируемыми наночастицами

H1299 (6600 клеток/лунка), HEPG2 (50000 клеток/лунка) и C2C12 (12000 клеток/лунка) высевали в 96-луночные планшеты в среду RPMI или в DMEM, дополненную 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 1% пенициллина-стрептомицина (P/S) соответственно. После 24 ч периода восстановления клетки дважды промывали с помощью 100 мкл PBS и один раз культуральной средой. Затем к клеткам добавляли наночастицы из расчета 0,2 мкг (H1299) или 0,5 мкг (HEPG2 и C2C12) на лунку в культуральной среде. После 16-часового периода дополненную наночастицами среду удаляли и добавляли свежую культуральную среду. Экспрессию MEDI8852 количественно определяли с применением ELISA, как описано ниже (с), а экспрессию STK11 определяли с помощью вестерн-блоттинга, как описано ниже (d). Результаты показаны на фигуре 5A и 5B соответственно.

с) ELISA для MEDI8852

96-луночные микропланшеты NUNCTM MaxiSorpTM покрывали с помощью антитела к MEDI8852 в количестве 100 мкл/лунка (Ali, S et al. Antimicrob Agents Chemother. 2018 Nov; 62(11): e00694-18) при 1 мкг/мл в бикарбонатном буфере. Планшеты инкубировали на протяжении ночи при 4°C, затем промывали трижды с помощью 300 мкл PBS-T (забуференный фосфатом солевой раствор (PBS) + 0,1% Tween 20) следующим утром. Все стандарты, образцы контроля качества и тестовые образцы разбавляли 1:250 в 0,5% бычьим сывороточном альбумине (BSA) в PBS + 0,1% Tween 20. 100 мкл разбавленного образца загружали в каждую лунку и инкубировали в течение 2 часов. После инкубации планшеты промывали трижды с помощью 300 мкл PBS-T. Вторичное антитело,

биотинилированное антитело к MEDI8852 (Ali, S et al. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018 Nov; 62(11): e00694-18.), разбавляли до 2 мкг/мл в PBS-T и 100 мкл добавляли в каждую лунку и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Затем планшет промывали четыре раза с помощью PBS-T и добавляли 100 мкл комплекса стрептавидин-HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., код 016-030-084) при разведении, составляющем 1:40. Планшет промывали четыре раза с помощью PBS-T и во все лунки добавляли 100 мкл уравновешенного при комнатной температуре субстрата SureBlue TMB (Thermo Fischer Scientific). Через 15 минут в темноте для гашения реакции применяли 100 мкл стоп-раствора TMB (Thermo Fischer Scientific). Значения оптической плотности (OD) каждой лунки считывали при 450 нм с применением микропланшет-ридера BMG Labtech PHERAstar FSX. Результаты показаны на фигуре 5А.

#### е) Вестерн-блоттинг STK11

Клетки лизировали с применением буфера для лизиса RIPA (Teknova, кат. № R3792), дополненного ингибитором протеаз и фосфатаз (Pierce, № 78442), после трансфекции и центрифугировали при 12000 x g в течение 5 мин. Супернатант собирали и количественно определяли с применением анализа BCA (Thermo, № продукта 23227). Затем 10 мкг экстрагированного белка на образец разделяли с применением SDS-полиакриламидного электрофореза с током 200 мА в течение 90 минут, затем переносили на мембраны из PVDF с помощью системы iBlot. Впоследствии мембраны блокировали с помощью TBS-T (20 mM Tris-HCl, pH 7,6), дополненного с помощью 5% BSA. Первичные антитела кролика к STK11 (Cell Signaling, кат. № D60C5) и к GAPDH (Cell Signalling, кат. № 14C10) гибридизировали на протяжении ночи при разведении 1:10000. Мембраны промывали в течение 30 мин, затем гибридизировали с конъюгированным с HRP антителом козы к IgG кролика в течение 30 мин. После инкубации мембраны промывали для устранения какого-либо неспецифического связывания и инкубировали с реагентами для хемилюминесценции Pierce SuperSignal West Pico (Pierce, кат. №. 34579). Полоски определяли с применением Image Quant LAS 4000. Результаты показаны на фигуре 5В.

### **Пример 11**

Трансфекции нацеленных NP с ДНК *in vitro*

#### а) Трансфекции *in vitro*

H1299 (6600 клеток/лунка), CT26 (10 000 клеток/лунка) и C2C12 (12000 клеток/лунка) высевали в 96-луночные планшеты в среду RPMI или в DMEM, дополненную 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 1% пенициллина-стрептомицина (P/S) соответственно. Перед трансфекцией обеспечивали период восстановления клеток H1299 и CT26 длительностью 24 ч, тогда как миобласты C2C12 дифференцировали в мышечные

трубочки путем инкубации в DMEM, дополненной 2% лошадиной сыворотки крови в течение минимум 7 дней. Впоследствии клетки промывали дважды с помощью 100 мкл PBS и один раз культуральной средой. Нацеленные и ненацеленные наночастицы получали с помощью плазмиды с люциферазой gWiz (Genlantis, Сан-Диего, Калифорния), как описано в примере 6. NP, нацеленные на TfR и cRGD, получали с помощью смеси MeO-PEG-PD(MN):TfR-PEG-PD(MN) или cRGD-PEG-PD(MN) (материалы получены в примере 3 а) и б)), где использовали 0, 10 и 50% TfR-PEG-PD(MN) и 0, 5, 10, 20 и 30% cRGD-PEG-PD(MN). NP добавляли к клеткам из расчета 0,2 мкг на лунку в культуральной среде (разведение 1:10). После 16-часового периода дополненную наночастицами среду удаляли и добавляли свежую культуральную среду. Экспрессию GFP визуализировали с применением Incucyte (Essen BioScience, Анн-Арбор, Мичиган), а люциферазу/жизнеспособность количественно оценивали с применением стандартного протокола для люциферазного репортера ONE-Glo™ + Tox (Promega, Мэдисон, Висконсин) и инструмента PHERAstarFSX (BMG Lab Tech, Кэри, Северная Каролина). Результаты показаны на фигурах 6А-С.

### **Пример 12**

#### **а) Получение наночастиц**

Нацеленные на PV1 MECA32 конструировали и экспрессировали в виде полуантитела (одна легкая цепь и одна тяжелая цепь) с замещением на неприродную аминокислоту в пределах тяжелой цепи, как описано в примере 6. NP получали с использованием конъюгатов PD3(MN) PEG (полученных, как описано в примере 6) и плазмиды с люциферазой gWiz (Genlantis, Сан-Диего, Калифорния) в 5% трегалозном буфере при соотношении аргинин в пептидном дендроне : фосфат в нуклеиновой кислоте (N:P), составляющем 4:1 (75% MeO-PEG-PD3(MN): 25% Mal-PEG-PD3(MN)), с применением протокола, описанного в примере 6. CP1-MECA32 (Gabriela M. Marchetti, et al. *Commun Biol.* 2019; 2: 92; опубликована онлайн 7 марта 2019 г. doi: 10.1038/s42003-019-0337-2) добавляли в 1,25-кратном молярном избытке на основе количества молей малеимида и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. Реакционную смесь гасили посредством добавления N-ацетилцистеина (10-кратный молярный избыток) и избыток антитела удаляли с применением ультрацентрифугирования (MWCO 100 кДа).

#### **б) Целевая доставка в легкие мышей**

Мышей BALB/C обрабатывали внутривенно с использованием 20 мкг pDNA люциферазы gWiz в комплексе с PD(MN). 10% pDNA было помечено с помощью Cy-5 (12 меток/плазида). Экспрессию и биораспределение оценивали в день 1, 3 и 8 с применением IVIS (Perkin Elmer). Каждую обработку проводили в четырех повторностях

и количественные данные представлены как среднее значение +/- стандартное отклонение. Результаты показаны на фигуре 7.

### **Пример 13**

Трансфекция NP с мРНК *in vitro*

а) Получение NP с ДНК и мРНК

Раствор пептидных дендронов получали из PD3(MN) (полученного, как описано в примере 4 и 5) в 20 mM HEPES, pH 7,0. ДНК (Origene, Роквилл, Мэриленд) или мРНК (Trilink, Сан-Диего, Калифорния), кодирующую mCherry, разбавляли в одном и том же буфере (40 мкг/мл) и добавляли по каплям к смеси PD при вихревом перемешивании так, чтобы конечное соотношение аргинин в пептидном дендроне : фосфат в нуклеиновой кислоте (N:P) составляло 2: 1 (ДНК) или 4 : 1 (мРНК). Обеспечивали образование наночастиц нуклеиновая кислота/пептид при комнатной температуре в течение 15 минут. Конечная концентрация нуклеиновой кислоты в растворе наночастиц составляла 20 мкг/мл. NP характеризовали с применением DLS, как описано в примере 4 (ДНК) и 5 (мРНК).

б) Трансфекции *in vitro*

H1299 высевали в 96-луночные планшеты с планированием 80% конfluence в пределах 24 часов. После 24-часового периода восстановления NP добавляли к клеткам из расчета 0,2 мкг на лунку в культуральной среде (разведение 1:10). После 4-часового периода дополненную NP среду удаляли и добавляли свежую культуральную среду. mCherry визуализировали с применением Incucyte (EssenBio) Результаты показаны на фигуре 8.

### **Пример 14**

Трансфекция pDNA и мРНК *in vivo*

Внутримышечная доставка

NP получали с помощью MeO PEG-PD3(MN), как описано в примерах 4 и 5. Мышей BALB/C обрабатывали с помощью 5 мкг объединенных в комплекс мРНК CleanCap (Trilink, Сан-Диего, Калифорния) или ДНК gWiz (Genlantis, Сан-Диего, Калифорния), кодирующих люциферазу, на конечность. Экспрессию оценивали еженедельно с применением IVIS (Perkin Elmer). Данные люминесценции собирали в четырех повторностях и представляли как среднее значение +/- стандартное отклонение. Результаты показаны на фигуре 9.

### **Пример 15**

Экспрессия терапевтических средств за счет мРНК *in vivo*

Внутривенная доставка

NP получали с помощью MeO-PD3(MN) и мРНК, кодирующей MED18852, как описано в примере 5. Мышам BALB/C вводили NP внутривенно посредством инъекции в хвостовую вену (20 мкг на мышь). Экспрессию оценивали еженедельно с применением IVIS (Perkin Elmer). Данные люминесценции собирали в четырех повторностях и представляли как среднее значение +/- стандартное отклонение. Результаты показаны на фигуре 10.

### **Пример 16**

Нацеленная трансфекция первичных Т-клеток с помощью мРНК

Получение и характеристика NP, нацеленных на Т-клетки

Трансфекции *in vitro*

Свежие первичные Т-клетки (подобные клеткам, которые можно получить от Cellero, Лоуэлл, Массачусетс, но свежие, а не замороженные) высевали в 24-луночные планшеты (Заб/лунка) в среде RPMI1640 (Sigma). После 24-часового периода восстановления к клеткам добавляли NP из расчета 100 мкМ на лунку в OPTI-MEM. NP получали, как описано в примере 6, с использованием мРНК CleanCap, кодирующей mCherry (Trilink, Сан-Диего, Калифорния), и смеси PD3(MN) и Mal-PEG-PD3(MN). NP получали с использованием 0, 25, 50 и 100% Mal-PEG-PD3(MN) и впоследствии конъюгировали с Fab к CD3, как описано в примере 6. После 4-часового периода дополненную NP среду удаляли и добавляли свежую культуральную среду. RFP визуализировали с применением Incucyte (EssenBio) и количественно определяли с применением проточной цитометрии. Результаты показаны на фигуре 11, где на А) представлена средняя интенсивность mCherry, В) процент трансфицированных клеток и С) поверхностная экспрессия CD3.

### **Пример 17**

Исследование с трансфекциями siRNA *in vitro*

а) Культура клеток

Линии клеток Colo205 и SW480 получали из ATTC (Манассас, Вирджиния). Культуры поддерживали в среде для роста Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Gibco), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS), при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Линии клеток Colo205 и SW480 CTNNB1 shRNA создавали посредством лентивирусной трансдукции доксициклин-индуцируемой shRNA для CTNNB1 человека (Dharmacon/Horizon Discovery, Лафайетт, Колорадо).

б) Репортерный анализ с TopFlash CTNNB1 и вестерн-блоттинг

Опухолевые клетки SW480 (ATCC, Манассас, Вирджиния) стабильно трансдуцировали с помощью люциферазного репортера TCF1 TopFlash (EMD Millipore, Берлингтон, Массачусетс). Клетки SW480 TopFlash высевали при плотности, составляющей 2,0 x 10<sup>5</sup>

клеток на лунку, в 6-луночные чашки и обрабатывали конъюгированной с холестерином siRNA (siRNA Accell) или NP с siRNA, описанными выше, в течение 48-72 часов.

Наночастицы получали, как описано в примере 5, с использованием смеси PD3(MN) или MeO-PEG-PD(MN) и cRGD-PEG-PD(MN) с 0, 33, 66 или 100% нацеливанием на cRGD.

Клетки лизировали и обрабатывали с применением реагента BrightGlo (Promega, Мэдисон, Висконсин), переносили в 96-луночный планшет и измеряли активность люциферазного репортера с применением Envision X (Perkin Elmer, Уолтем, Массачусетс). Результаты TopFlash для PD3(MN): cRGD-PEG-PD3(MN) показаны на фигуре 12. Результаты TopFlash для MeO-PEG-PD3(MN): cRGD-PEG-PD3(MN) показаны на фигуре 13А. Клеточный лизат также оценивали через 5 дней после экспрессии CTNNB1 с применением стандартных протоколов вестерн-блоттинга, как показано на фигуре 13В.

### с) Вестерн-блоттинг CTNNB1 и анализ пролиферации клеток

Клетки Colo205 высевали при плотности, составляющей  $2,0 \times 10^5$  клеток на лунку, в 6-луночные планшеты. В качестве контроля для обработки клеток применяли конъюгированные с холестерином siRNA. В частности, к клеткам на лунку добавляли 500 нМ контрольной ненацеленной siRNA Accell и siRNA CTNNB1 Accell в 1 мл среды для трансфекции Accell, приобретенной от Dharmacon/Horizon Discovery (Лафайетт, Колорадо). Конъюгация с холестерином способствует доставке siRNA при высоких концентрациях. Через 48 часов после трансфекции в лунку добавляли по 2 мл RPMI + 10% FBS. Для экспериментов, в которых клетки Colo205 обрабатывали с использованием NP, инкапсулирующих siRNA CTNNB1, клетки высевали при плотности, составляющей  $2,0 \times 10^5$  клеток на лунку, в 6-луночные планшеты. Наночастицы получали, как описано в примере 5, с использованием смесей MeO-PEG-PD(MN) и cRGD-PEG-PD(MN) с 0 или 66% cRGD-PD и 1% (вес/вес siRNA) липофектина. Среду для роста заменяли на 900 мкл оптимальной минимальной необходимой среды (OPTIMEM) и в лунку добавляли по 100 мкл состава на основе NP (100 мкМ мРНК на лунку). Через 16 часов после трансфекции в лунку добавляли по 2 мл RPMI + 10% FBS. Для анализа клеточной пролиферации клетки собирали и подсчитывали через 72-96 часов после трансфекции с применением счетчика клеток ViCell XR, как показано на фигуре 13С.

## Пример 18

Исследование трансфекций с применением нацеленных siRNA *in vivo*

### а) Анализы подавления роста опухоли *in vivo*

Семинедельным самкам безтимусных мышей вводили инъекцией  $5,0 \times 10^6$  клеток Colo205 подкожно в 200 мкл PBS. Когда средний объем опухоли достигал примерно  $100 \text{ мм}^3$ , мышей рандомизировали в группы обработки и они получали внутривенные

инъекции NP (0, 33 и 66% cRGD PD (MN):PEG-PD(MN), полученные, как описано в примере б), три дня подряд с последующими инъекциями два дня подряд через неделю. Измерения опухоли и значения веса тела мыши регистрировали два или три раза в неделю на всем протяжении эксперимента. Мышей подвергали эвтаназии, когда опухоли достигали размера, составляющего 2000 мм<sup>3</sup>, или на них появлялось изъязвление, охватывающее более 50% поверхности опухоли. Результаты показаны на фигуре 14.

### Пример 19

Самосборка наночастиц (NP) на основе пептидных дендронов с гибридной РНК/ДНК

#### а) Получение NP

мРНК CleanCap, кодирующую mCherry (Trilink, Сан-Диего, Калифорния), и ДНК gWiz™, кодирующую GFP (Aldevron, Фарго, Северная Дакота), получали при массовом соотношении 1:1 в 20 mM HEPES, pH 7,0, с получением конечной концентрации, составляющей 40 мкг/мл. Раствор PD3(MN) (полученных, как описано в примере 2) готовили в 20 mM HEPES, pH 7,0, при концентрациях, соответствующих конечному соотношению аргинин в пептидном дендроне : фосфат в нуклеиновой кислоте (N:P), составляющему 4 : 1. Растворы нуклеиновых кислот добавляли к растворам PD3(MN) при объемном соотношении 1:1 и тщательно перемешивали с помощью пипетирования. Обеспечивали образование NP при комнатной температуре в течение 30 минут. Конечная концентрация нуклеиновой кислоты в растворе NP составляла 20 мкг/мл (10 мкг/мл мРНК и мкг/мл ДНК). Контрольные NP получали с использованием ДНК и мРНК по отдельности при конечной концентрации нуклеиновой кислоты, составляющей 20 мкг/мл.

#### б) Динамическое светорассеяние

Данные динамического светорассеяния (DLS) собирали с применением Zetasizer ZS (Malvern), зеленого лазера и кварцевой кюветы ZEN2112. Гидродинамический диаметр и коэффициент полидисперсности (PDI) определяли с применением кумулятивного анализа методом аппроксимации. Все точки данных представляют собой среднее значение трех или более отдельно полученных образцов. Результаты показаны в таблице 8.

Генетический материал	Гидродинамический диаметр (нм)	Коэффициент полидисперсности
NP с ДНК	56 ± 2	0,177 ± 0,005
NP с мРНК	33 ± 2	0,190 ± 0,008
NP с ДНК и мРНК	49 ± 2	0,187 ± 0,003

Таблица 8. Гидродинамический диаметр NP, полученных с использованием PD3(MN) и ДНК, мРНК или ДНК и мРНК при отношении 1:1, как описано в примере 19. Все

измерения собирали в трех повторностях и представляли как среднее значение +/- стандартное отклонение.

с) Оценка совместной инкапсуляции с помощью резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET)

ДНК gWiz™, кодирующую GFP (Aldevron, Фарго, Северная Дакота) метили с помощью Cy5, и мРНК CleanCap, кодирующую mCherry (Trilink, Сан-Диего, Калифорния), метили с помощью Cy3 с применением наборов для мечения нуклеиновых кислот Label IT® (Mirus Bio, Мэдисон, Висконсин). Следующие наночастицы составляли с использованием PD3(MN), как описано выше, при конечной концентрации нуклеиновой кислоты, составляющей 20 мкг/мл:

1. NP, содержащие совместно инкапсулированные Cy5-ДНК + немеченую ДНК (1:1)
2. NP, содержащие совместно инкапсулированные Cy3-мРНК + немеченую мРНК (1:1)
3. NP, содержащие Cy5-ДНК, + NP, содержащие Cy3-мРНК, с инкапсулированными по отдельности нуклеиновыми кислотами (1:1).
4. NP, содержащие совместно инкапсулированные Cy5-ДНК + Cy3-мРНК (1:1)

Обеспечивали образование NP в течение 10 минут перед флуоресцентным анализом. NP из перечисленного выше пункта 3 составляли по отдельности, обеспечивали образование комплекса в течение 10 минут, затем объединяли при соотношении 1:1 непосредственно перед флуоресцентным анализом. Флуоресцентный анализ проводили с применением флуоресцентного спектрометра NanoDrop™ 3300 (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). 2 мкл образца NP загружали на подставку и возбуждали образец с применением голубого LED. Испускание флуоресценции (относительные единицы флуоресценции, RFU) измеряли при длине волны от 450 до 750 нм. Спектры флуоресценции для этих образцов NP показаны на фигуре 15.

d) Экспрессия мРНК и ДНК в клетках H1299

NP составляли с использованием PD3(MN), как описано в а), с ДНК GFP и мРНК mCherry при весовом соотношении 1:1 для получения конечной концентрации нуклеиновой кислоты, составляющей 20 мкг/мл. Клетки H1299 высевали в 96-луночный планшет, обработанный для выращивания тканевых культур, из расчета 10000 клеток/лунка за 24 ч перед обработкой. Непосредственно перед обработкой среду для роста удаляли и заменяли на 100 мкл среды Opti-MEM™ I с пониженным использованием сыворотки (ThermoFisher, Уолтем, Массачусетс). В каждую лунку добавляли 10 мкл раствора наночастиц (доза нуклеиновой кислоты 200 нг/лунка). Наночастицы инкубировали с клетками в течение 4 часов, затем Opti-MEM и наночастицы удаляли и

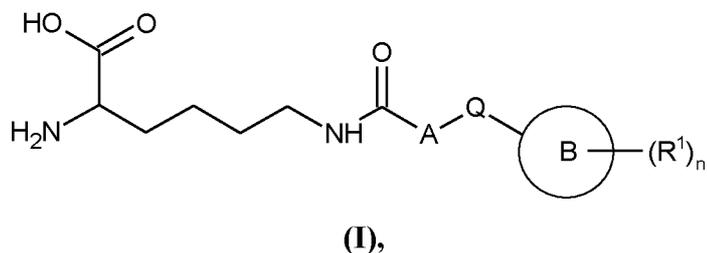
заменяли на среду для роста. Экспрессию белков GFP и mCherry отслеживали с применением системы для анализа живых клеток Incucyte (Sartorius, Геттинген, Германия), которая захватывает изображения флуоресценции клеток через каждые 4 часа. Изображения анализировали с применением программного обеспечения Incucyte для определения области флуоресценции в зеленом (GFP) и красном (mCherry) каналах, а также области перекрывания красного и зеленого сигнала. Сигнал нормализовали относительно максимальной области сигнала для отслеживания кинетики экспрессии. Результаты показаны на фигуре 16.

е) Экспрессия мРНК и ДНК в клетках C2C12

Клетки C2C12 высевали в 96-луночный планшет, обработанный для выращивания тканевых культур, из расчета 20000 клеток/лунка. Ростовую среду заменяли на среду для дифференцировки с низким содержанием сыворотки крови (DMEM + 2% лошадиной сыворотки крови) и культивировали в течение 7 дней, пока не сформировались слитые удлиненные мышечные трубочки. Наночастицы составляли с использованием PD3(MN), как описано в а), с ДНК GFP и мРНК mCherry при весовом соотношении 1:1 для получения конечной концентрации нуклеиновой кислоты, составляющей 50 мкг/мл. В состав добавляли Lipofectin® (DOTMA:DOPE (% вес/вес) =1) (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, Массачусетс). Lipofectin® разбавляли в 20 мМ HPES, pH 7,0, чтобы соответствовать 1% вес/вес нуклеиновой кислоты. Раствор Lipofectin® добавляли раствору PD3(MN) непосредственно перед добавлением раствора РНК, как описано ранее. Непосредственно перед обработкой среду удаляли и заменяли на 100 мкл среды Opti-MEM™ I с пониженным использованием сыворотки (ThermoFisher, Уолтем, Массачусетс). В каждую лунку добавляли 10 мкл раствора наночастиц (доза нуклеиновой кислоты 200 нг/лунка). Наночастицы инкубировали с клетками в течение 4 часов, затем Opti-MEM и наночастицы удаляли и заменяли на среду для роста. Экспрессию белков GFP и mCherry отслеживали с применением описанного анализа живых клеток Incucyte. Результаты показаны на фигуре 17.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептидный дендрон, содержащий один или несколько остатков, полученных из модифицированного лизина формулы (I):



где

**A** представляет собой связь,  $C_{1-6}$ -алкилен, карбоциклил или гетероциклил, при этом указанный карбоциклил или гетероциклил может быть необязательно замещен при атоме углерода одним или несколькими  $R^2$ , и при этом, если указанный гетероциклил содержит фрагмент -NH-, то атом азота может быть необязательно замещен группой, выбранной из  $R^A$ ;

**Q** представляет собой связь, карбоциклил или гетероциклил; при этом указанный карбоциклил или гетероциклил может быть необязательно замещен при атоме углерода одним или несколькими  $R^3$ , и при этом, если указанный гетероциклил содержит фрагмент -NH-, то атом азота может быть необязательно замещен группой, выбранной из  $R^B$ ;

**кольцо B** представляет собой морфолинил или тиоморфолинил, при этом, если указанный морфолинил или тиоморфолинил содержит фрагмент -NH-, то атом азота может быть необязательно замещен группой, выбранной из  $R^C$ ;

каждый из  $R^1$ ,  $R^2$  и  $R^3$  независимо выбран из галогена, нитро, циано, гидроксид, трифторметокси, трифторметила, амино, карбокси, карбамоила, меркапто, сульфамойла, метила, этила, метокси, этокси, ацетила, ацетокси, метиламино, этиламино, диметиламино, диэтиламино, N-метил-N-этиламино, ацетиламино, N-метилкарбамоила, N-этилкарбамоила, N,N-диметилкарбамоила, N,N-диэтилкарбамоила, N-метил-N-этилкарбамоила, метилтио, этилтио, метилсульфинила, этилсульфинила, мезила, этилсульфонила, метоксикарбонила, этоксикарбонила, N-метилсульфамойла, N-этилсульфамойла, N,N-диметилсульфамойла, N,N-диэтилсульфамойла и N-метил-N-этилсульфамойла;

**n** составляет 0-4;

$R^A$ ,  $R^B$  и  $R^C$  независимо выбраны из метила, этила, пропила, изопропила, ацетила, мезила, этилсульфонила, метоксикарбонила, этоксикарбонила, пропоксикарбонила, бутоксикарбонила, карбамоила, N-метилкарбамоила, N-этилкарбамоила, N,N-диметилкарбамоила, N,N-диэтилкарбамоила и N-метил-N-этилкарбамоила.

2. Пептидный дендрон по п. 1, где **A** представляет собой связь, C<sub>1-6</sub>-алкилен или гетероцикл.

3. Пептидный дендрон по п. 1 или п. 2, где **Q** представляет собой связь.

4. Пептидный дендрон по любому из пп. 1-3, где **n** равняется 0.

5. Пептидный дендрон по любому из пп. 1-4, где **кольцо В** представляет собой морфолинил.

6. Пептидный дендрон по любому из пп. 1-4, где **кольцо В** представляет собой тиоморфолинил.

7. Пептидный дендрон по любому из пп. 1-4, где

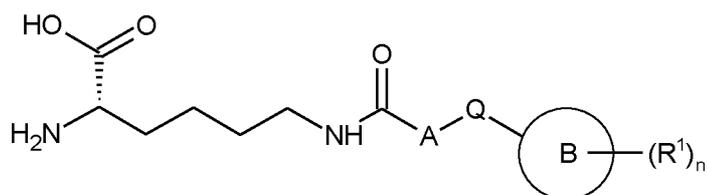
**A** представляет собой связь, метилен или пиридил;

**Q** представляет собой связь;

**кольцо В** представляет собой морфолинил или тиоморфолинил, и

**n** составляет 0.

8. Пептидный дендрон по любому из пп. 1-7, где остаток, полученный из модифицированного лизина, характеризуется формулой **(IB)**:



**(IB).**

9. Пептидный дендрон по любому из пп. 1-4, п. 7 или п. 8, где остаток, полученный из модифицированного лизина, представляет собой:

(S)-2-амино-6-{{6-(морфолин-4-ил)пиридин-3-карбонил}амино}гексановую кислоту;

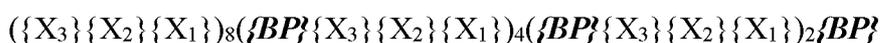
(S)-2-амино-6-{{(тиоморфолин-3-карбонил)амино}гексановую кислоту и

(S)-2-амино-6-{{2-(морфолин-4-ил)ацетиламино}гексановую кислоту.

10. Пептидный дендрон по любому из предыдущих пунктов, где дендрон содержит менее шести поколений.

11. Пептидный дендрон по любому из предыдущих пунктов, где пептидный дендрон содержит точки ветвления, поколение 0 и последующие поколения, и где точки ветвления, поколение 0 и последующие поколения вместе содержат менее 100 аминокислотных остатков.

12. Пептидный дендрон по любому из предыдущих пунктов, где пептидный дендрон предусматривает пептидный дендрон формулы **(II)**:



**(II),**

где

один из  $X_1$ ,  $X_2$  или  $X_3$  представляет собой основной аминокислотный остаток;  
другой из  $X_1$ ,  $X_2$  или  $X_3$  представляет собой гидрофобный аминокислотный остаток;  
оставшийся из  $X_1$ ,  $X_2$  или  $X_3$  представляет собой остаток, полученный из модифицированного лизина, определенного в любом из пп. 1-9, и

**BP** представляет собой аминокислотный остаток в точке ветвления.

13. Пептидный дендрон по п. 12, где основной аминокислотный остаток выбран из аргинина.

14. Пептидный дендрон по п. 12 или п. 13, где гидрофобный аминокислотный остаток выбран из лейцина.

15. Пептидный дендрон по любому из пп. 12-14, где BP представляет собой лизин.

16. Пептидный дендрон по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащий последовательность аминокислотных остатков поколения 0, присоединенную к аминокислоте в 1-й точке ветвления пептидного дендрона.

17. Пептидный дендрон по п. 16, где последовательность поколения 0 состоит из GLY-VAL-CIT-GLY-GLY-SER-CYS (SEQ ID NO: 5), где концевая карбоксильная группа CYS была амидирована с образованием группы  $C(O)NH_2$ .

18. Пептидный дендрон по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащий полиэтиленгликолевую группу, состоящую из повторяющихся субъединиц -  $(OCH_2CH_2)_n$ -, где n составляет более 3.

19. Пептидный дендрон по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащий нацеливающую группу, выбранную из пептида, антитела, сахаров или низкомолекулярной нацеливающей группы.

20. Пептидный дендрон по любому из предыдущих пунктов для применения в доставке фармацевтически активного средства в клетку.

21. Фармацевтическая композиция, которая содержит один или несколько пептидных дендронов по любому из предыдущих пунктов и фармацевтически активное средство.

22. Применение или фармацевтическая композиция по п. 20 или п. 21, где фармацевтически активное средство представляет собой генетический материал.

23. Применение или фармацевтическая композиция по п. 22, где генетический материал представляет собой ДНК.

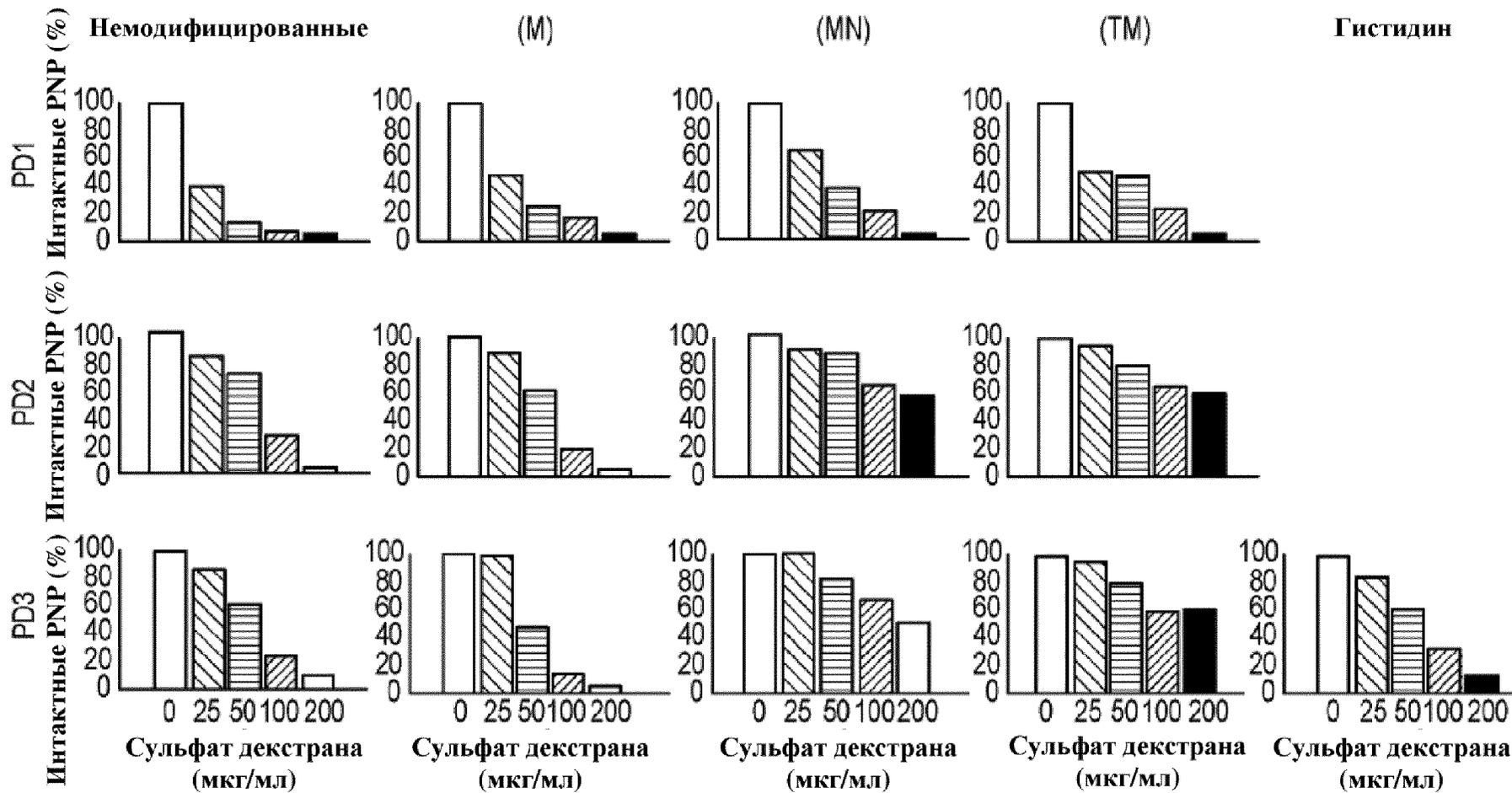
24. Применение или фармацевтическая композиция по п. 22, где генетический материал представляет собой РНК.

25. Применение или фармацевтическая композиция по п. 22, где генетический материал представляет собой ДНК и РНК.

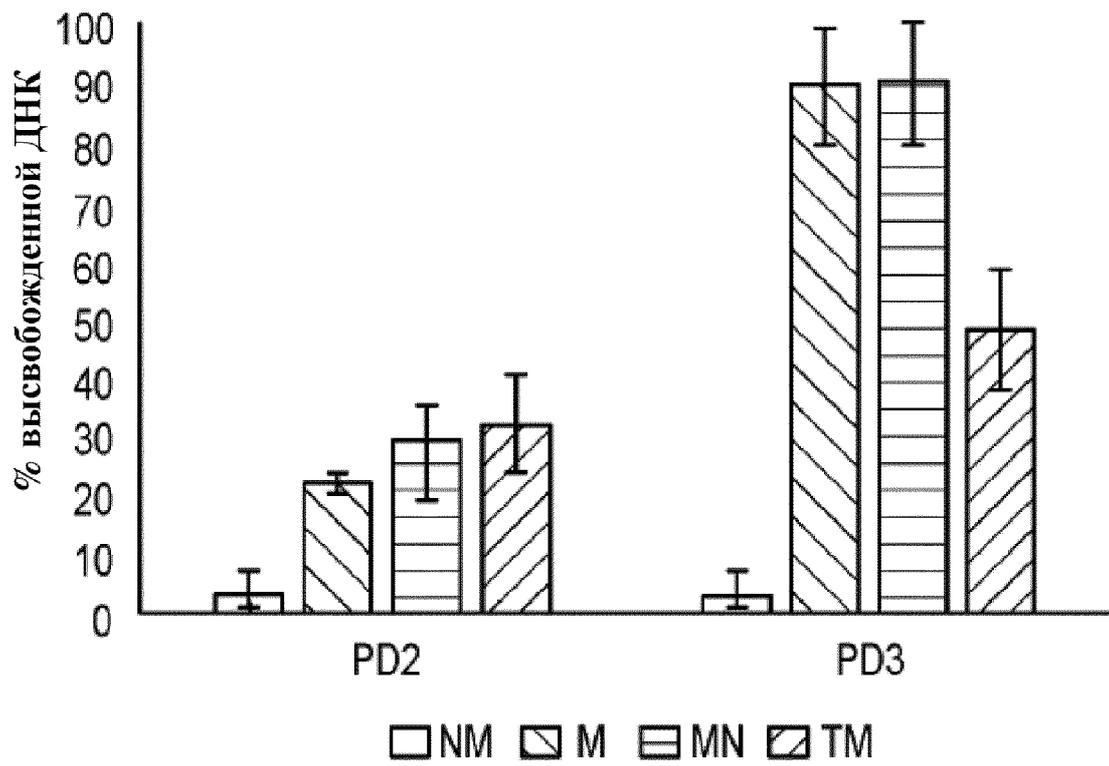
26. Применение или фармацевтическая композиция по любому из пп. 20-25, дополнительно содержащая липид.

27. Способ генной терапии, который включает введение указанному животному эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 21-26.

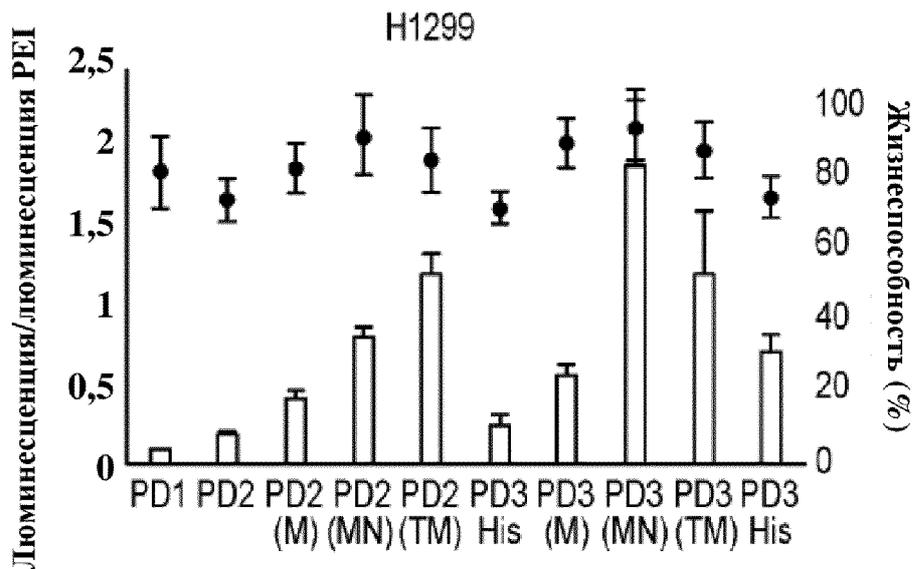




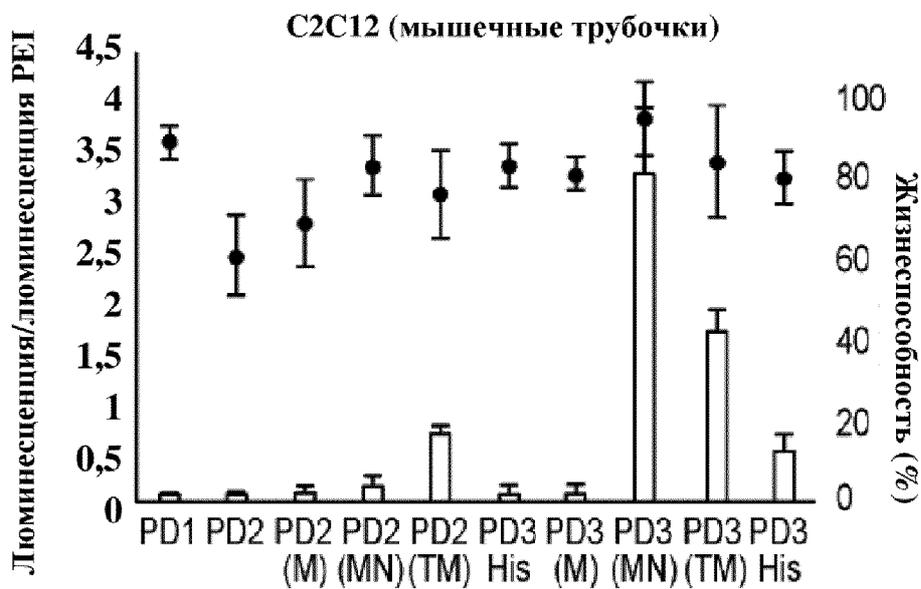
**Фигура 2А**



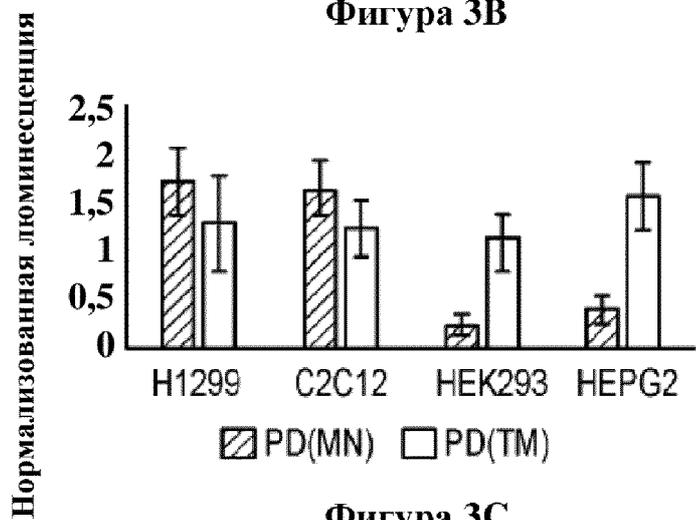
Фигура 2В



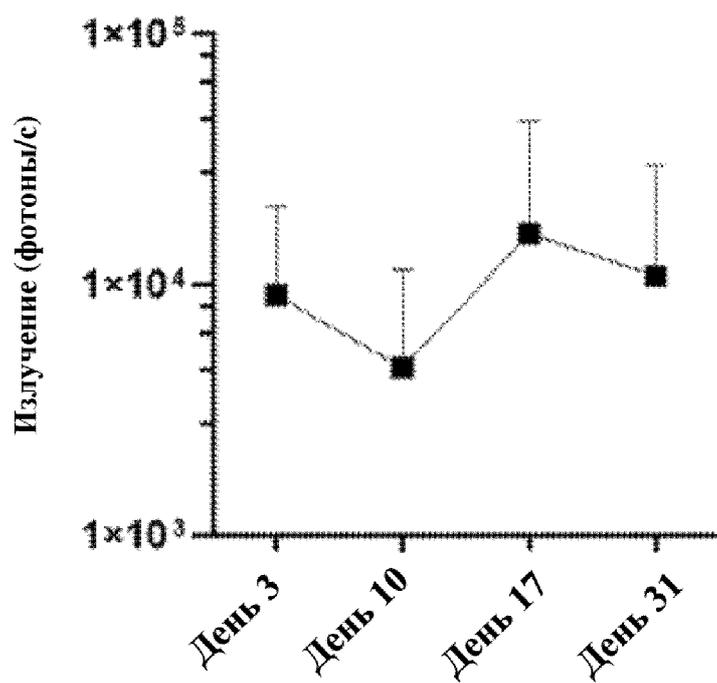
**Фигура 3А**



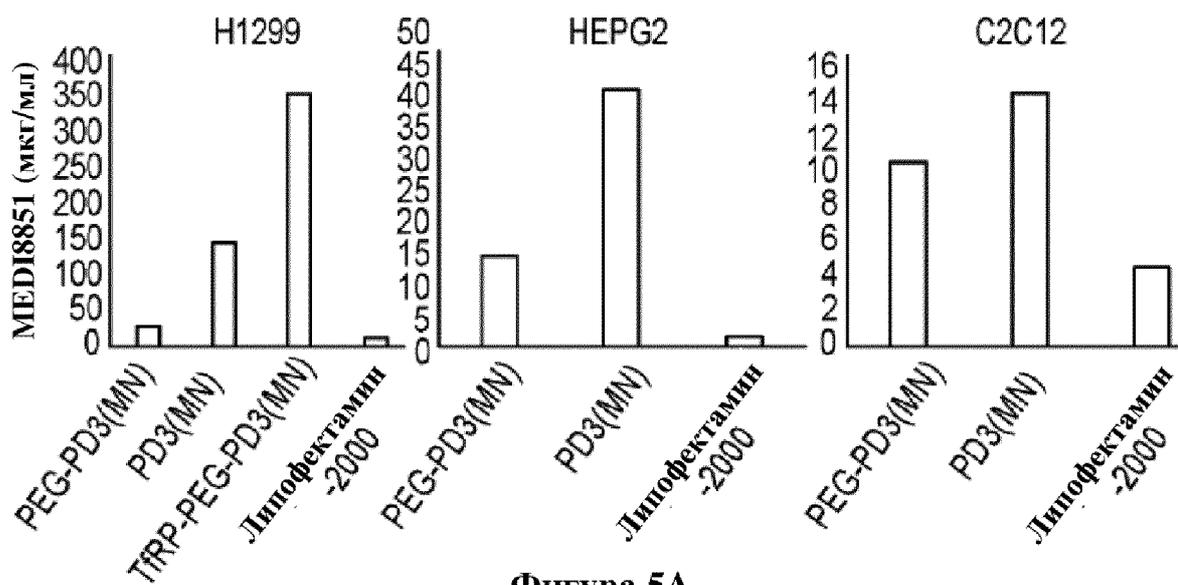
**Фигура 3В**



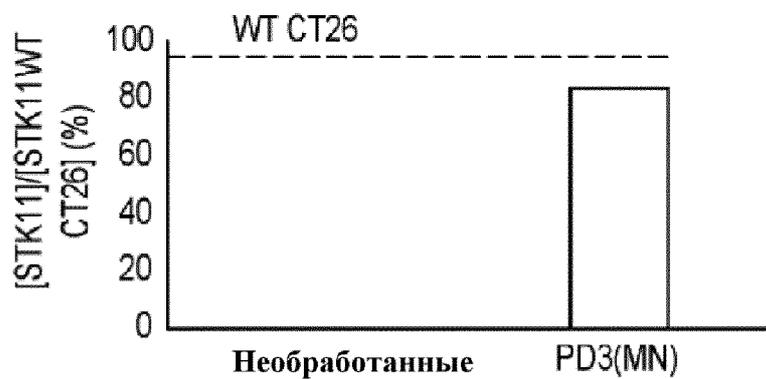
**Фигура 3С**



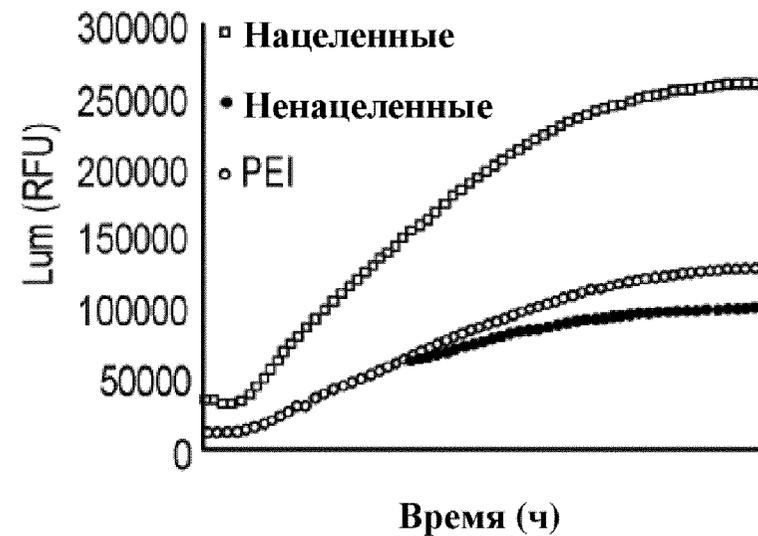
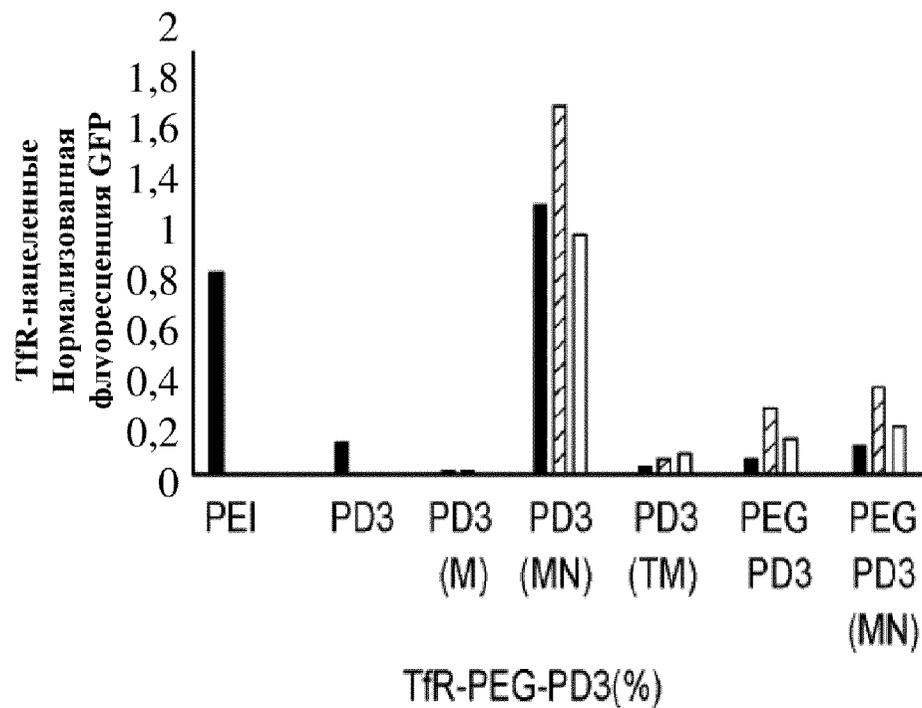
Фигура 4



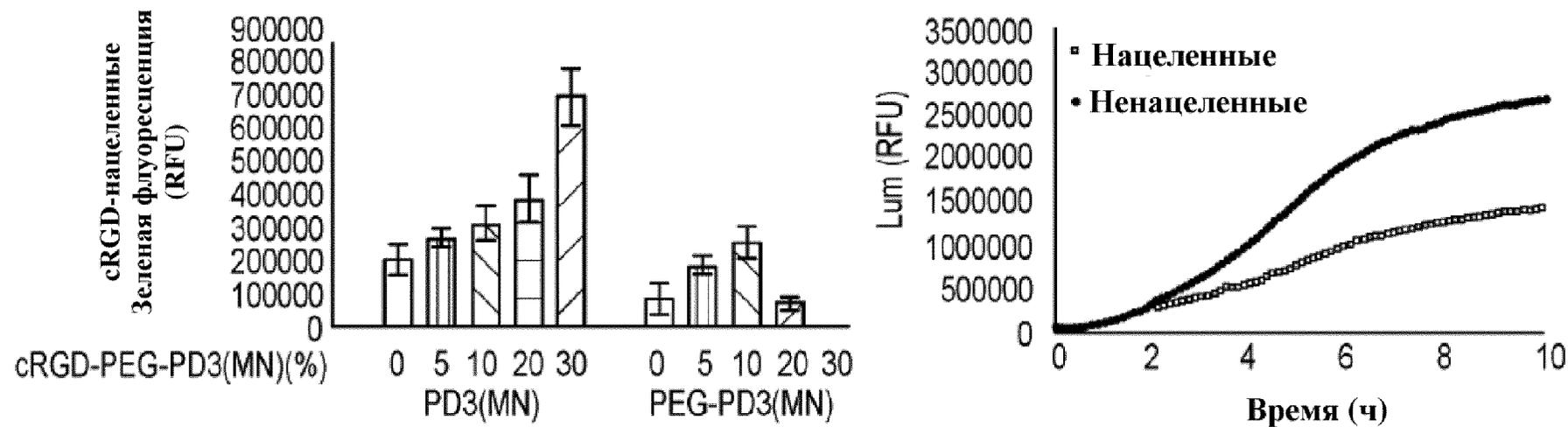
Фигура 5А



Фигура 5В



Фигура 6А

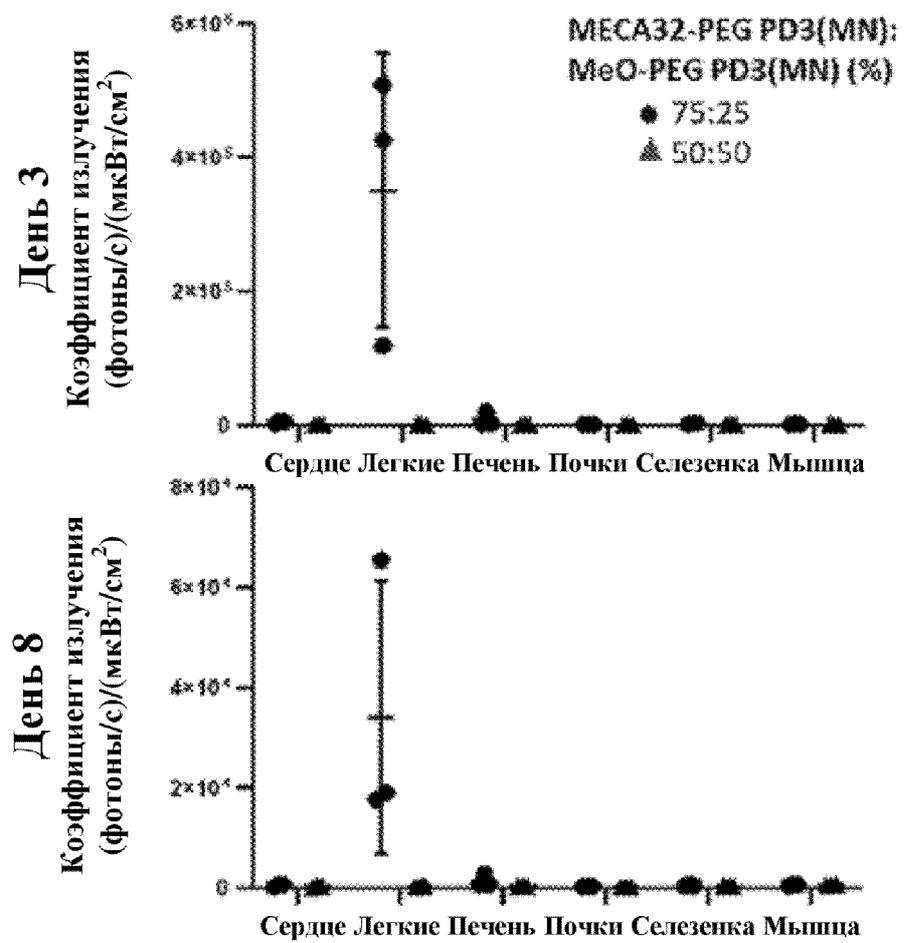


**Фигура 6В**

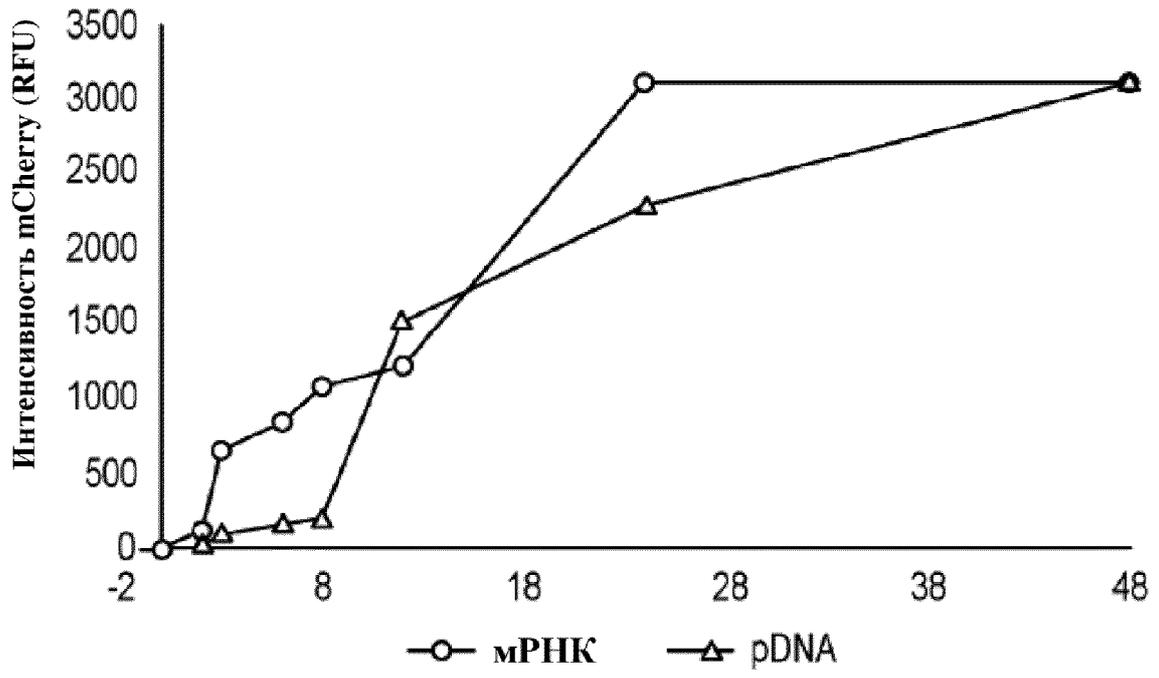
**Кратность улучшения относительно ненацеленных с PEG-PD(MN)**

Мишень	H1299	C2C12	CT26 STK11 KO
Пептид TfR	2,64	3,54	N/A
cRGD	1,56	2,10	3,1

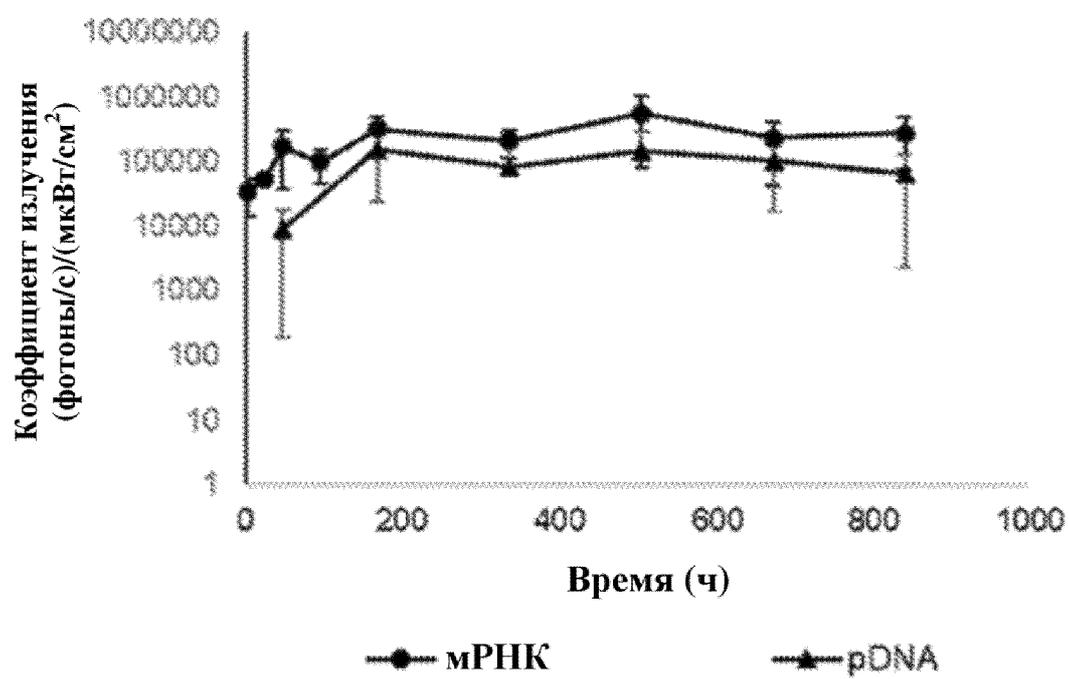
**Фигура 6С**



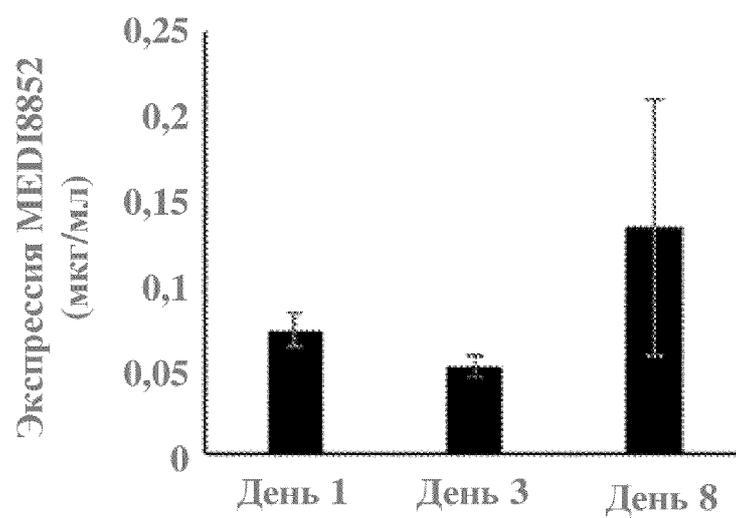
Фигура 7



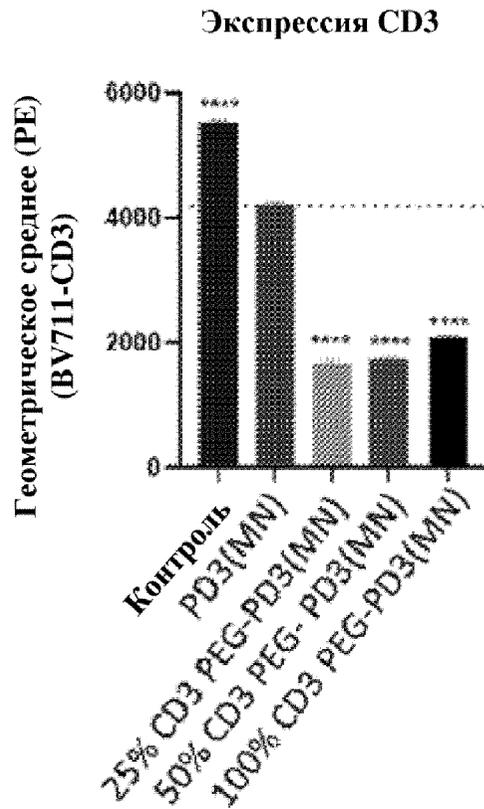
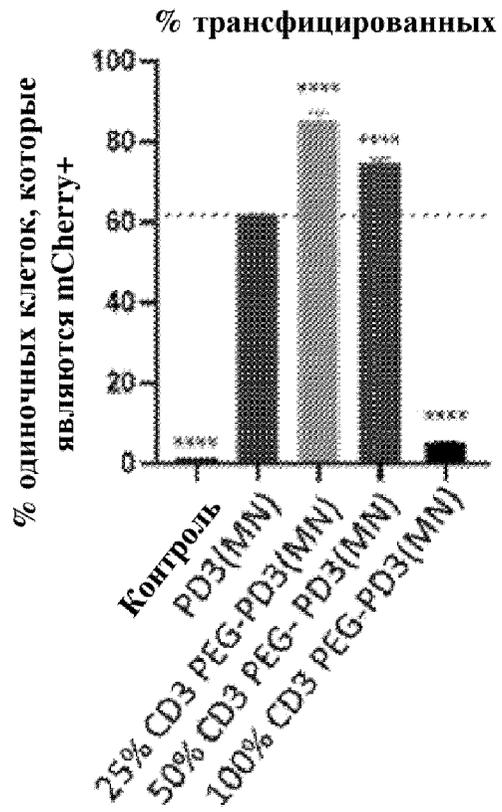
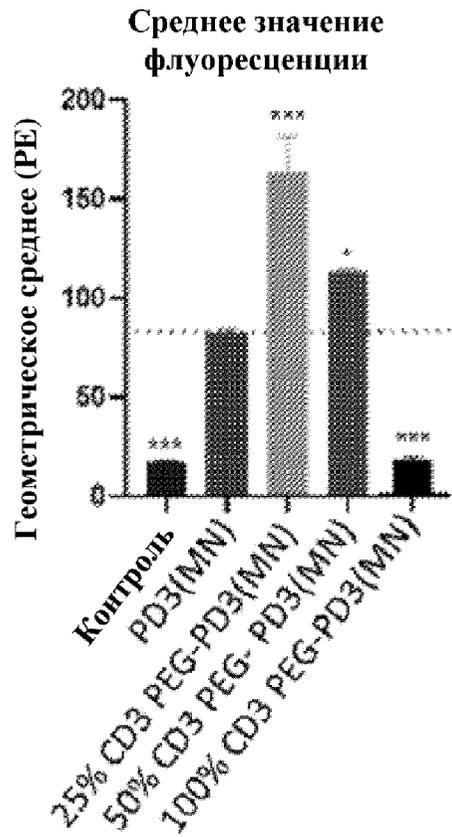
Фигура 8



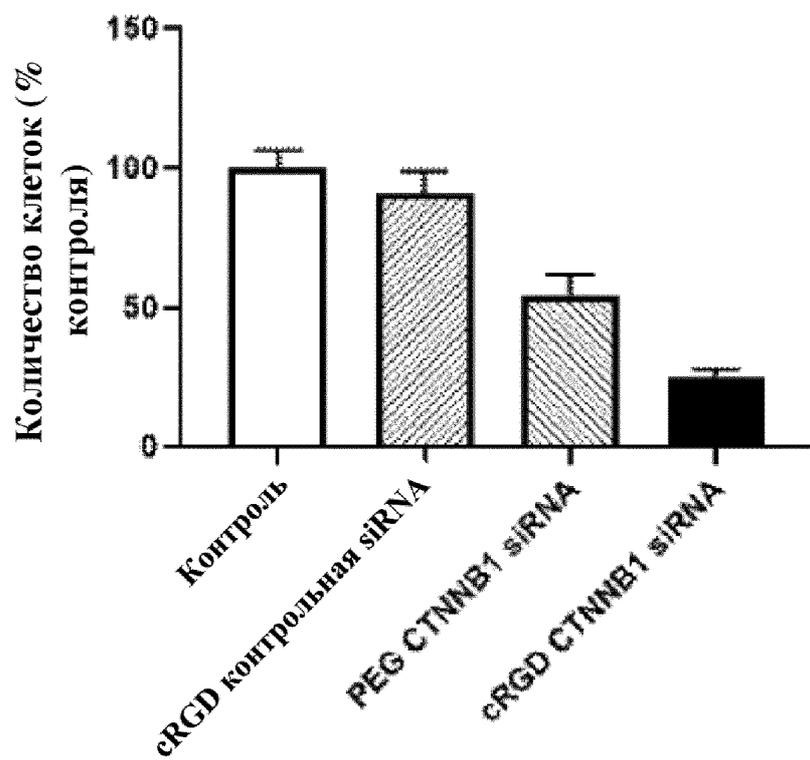
Фигура 9

**Фигура 10**

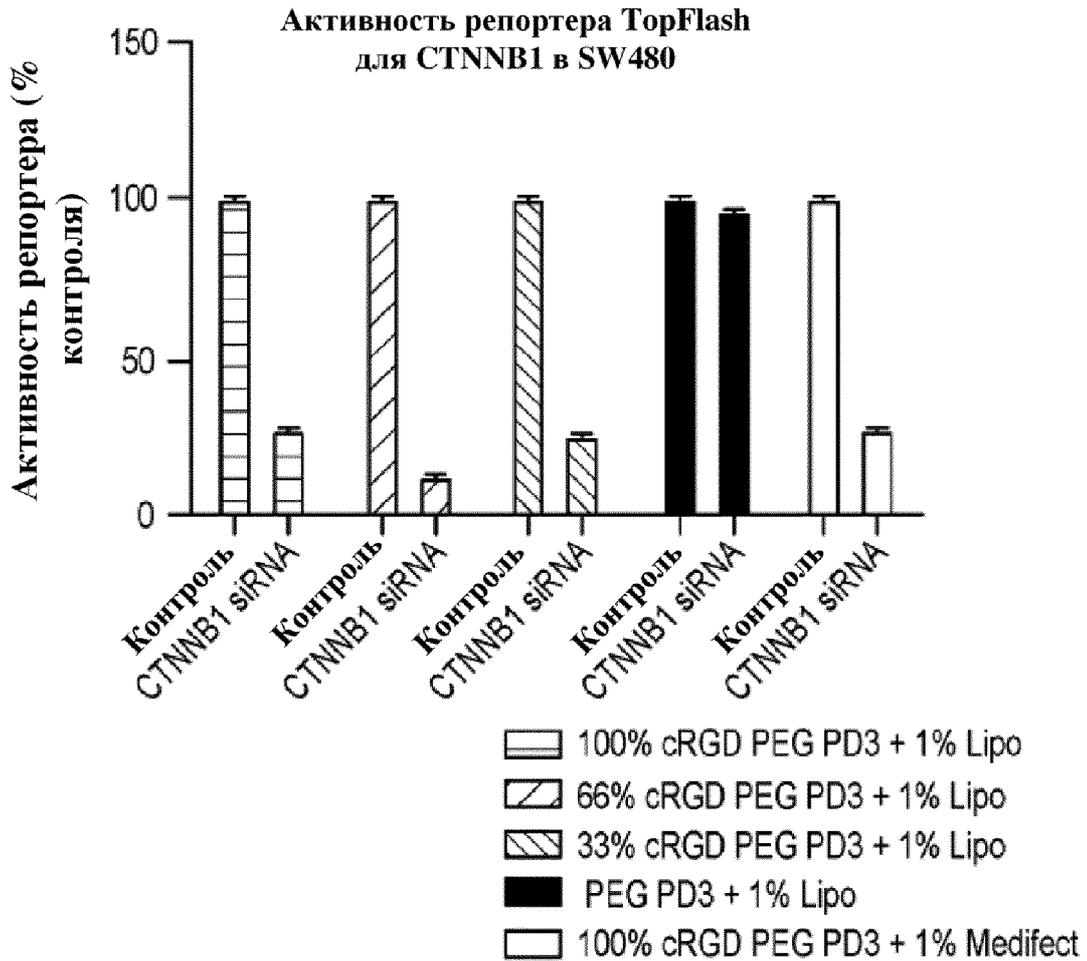
Фигура 11



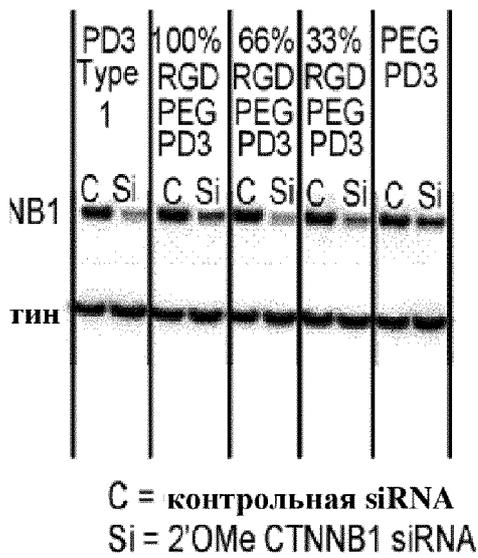
## Пролиферация Colo205



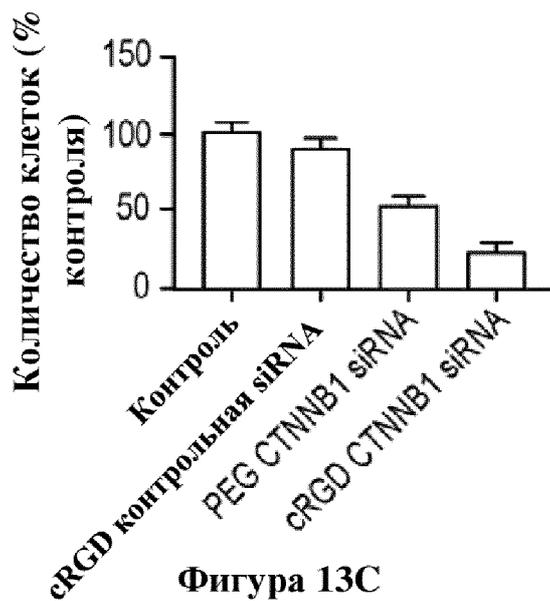
Фигура 12



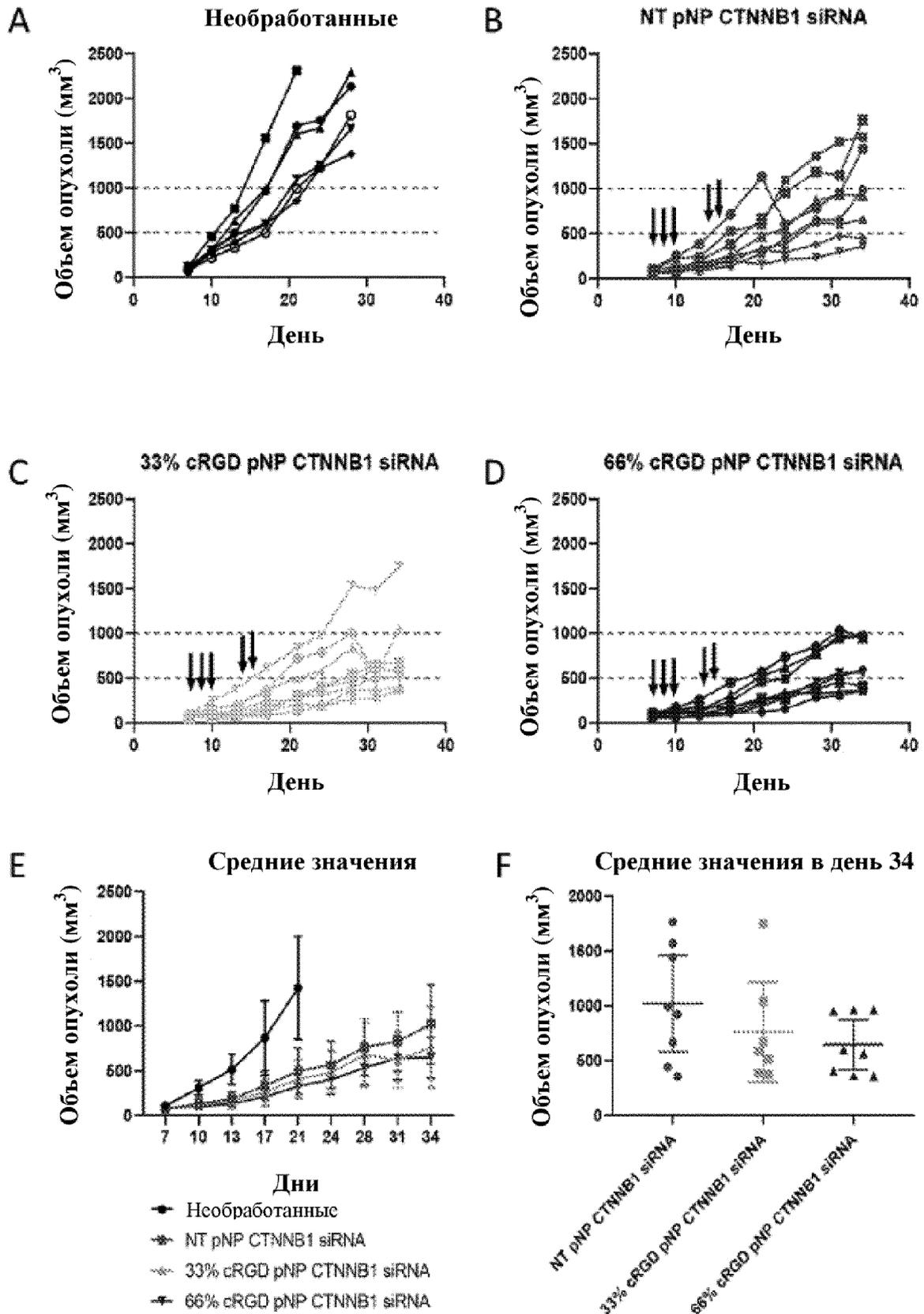
Фигура 13А



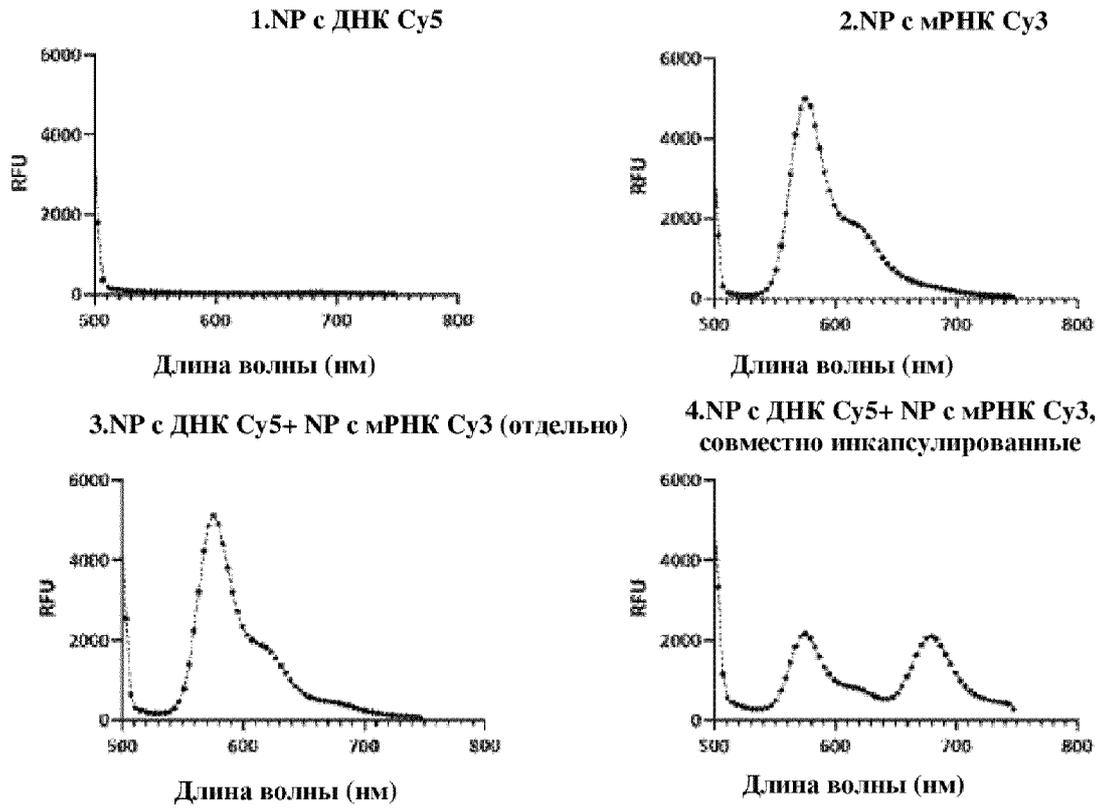
Фигура 13В



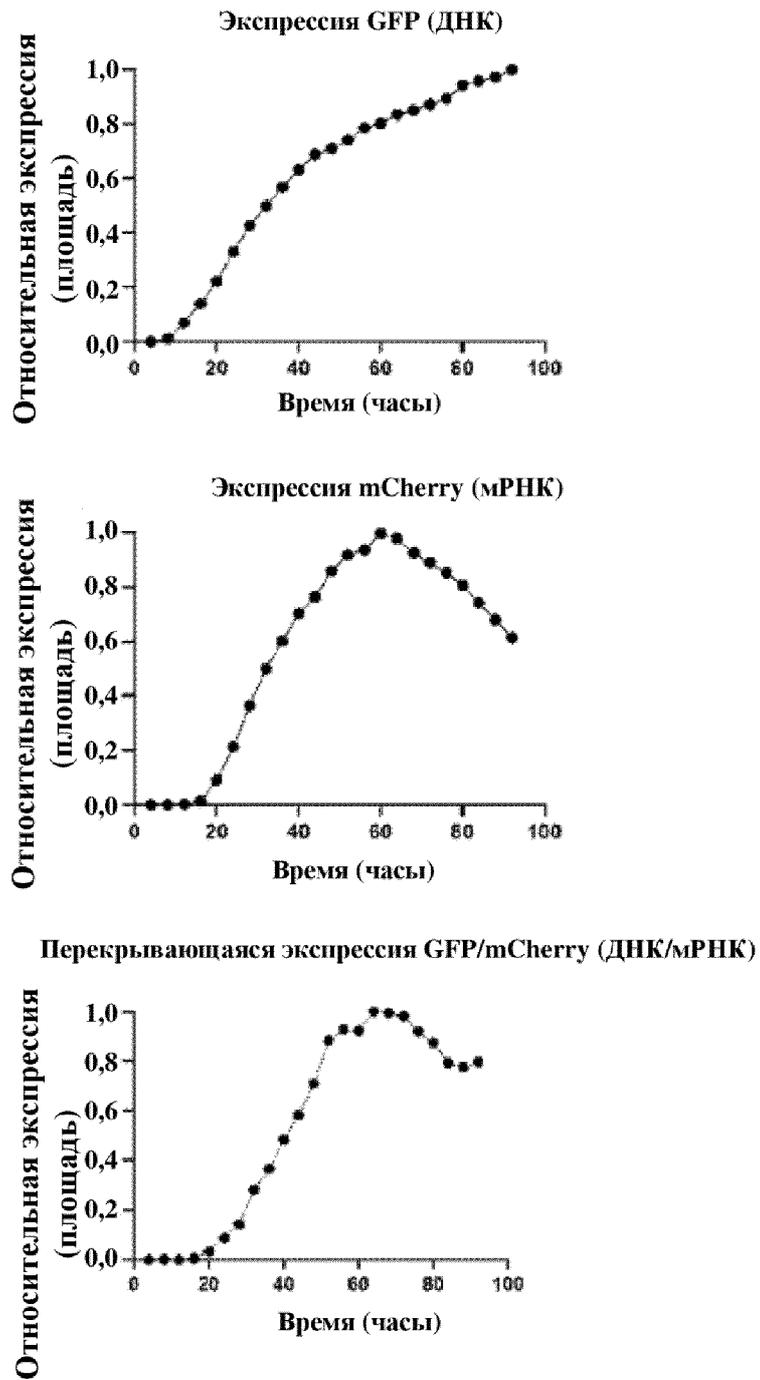
Фигура 13С



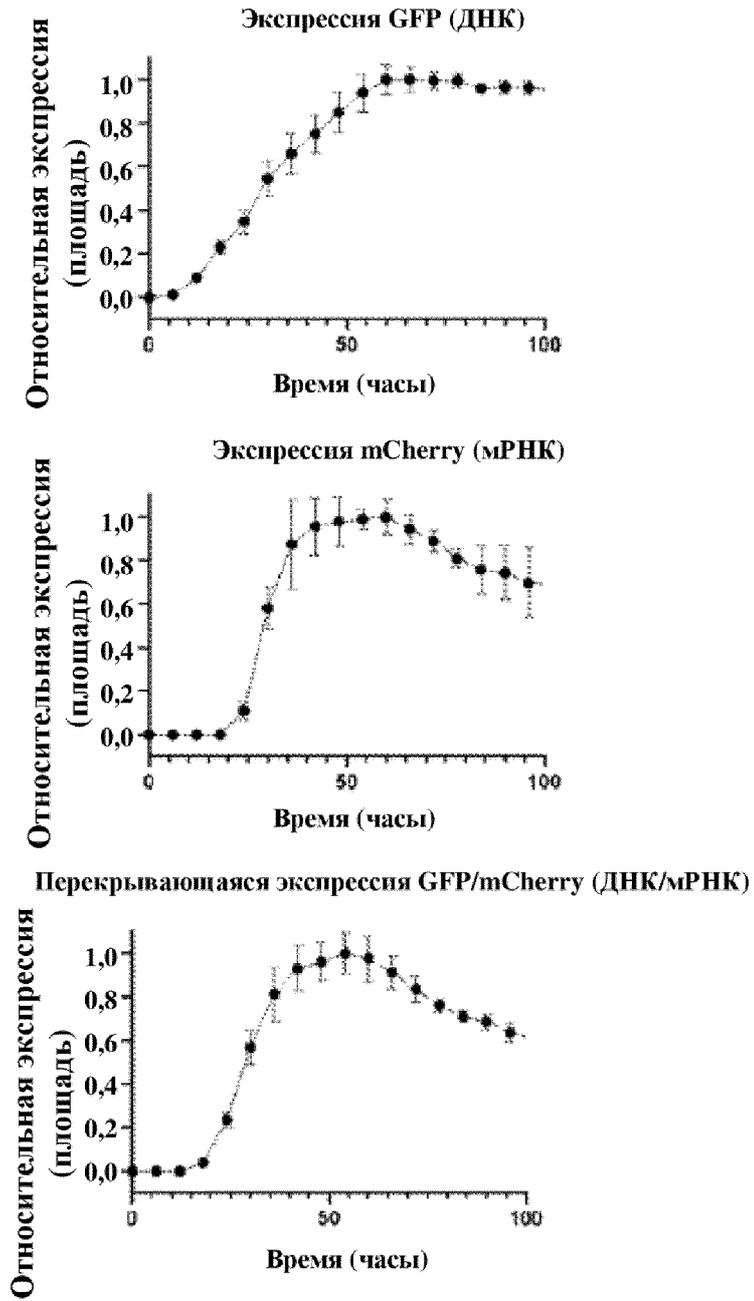
Фигура 14



Фигура 15



Фигура 16



Фигура 17