



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **115135** (13) **C2**
(51) МПК
C08B 37/18 (2006.01)
A61K 47/50 (2017.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2014 06638	(72) Винахідник(и):	Руссо Вінченцо (ІТ),
(22) Дата подання заявки:	21.02.2013		Лібераті Еліза (ІТ),
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.09.2017		Каццолла Нікола (ІТ)
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	12159710.8	(73) Власник(и):	АЦЬЄНДЕ КІМІКЕ РІУНІТЕ АНДЖЕЛІНІ
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	15.03.2012		ФРАНЧЕСКО А.ЧІ.Р.А.Ф. С.П.А.,
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP	(74) Представник:	Ошарова Ірина Олександрівна, реєстр. №9
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.11.2014, Бюл.№ 21	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 7144713 B1 (MCCORMICK MARK R [US]), 05.12.2006
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.09.2017, Бюл.№ 18		EP 2275085 A1 (UNIV ROSTOCK [DE]), 19.01.2011
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2013/053422, 21.02.2013		PAL S. ET AL., "Synthesis, characterization and flocculation characteristics of cationic glycogen: A novel polymeric flocculant", COLLOIDS AND SURFACES. A, PHYSICACHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 289, no. 1-3, 15.10.2006, pages 193-199

(54) КАТІОННІ ПОЛІМЕРИ НА ОСНОВІ ГЛІКОГЕНУ

(57) Реферат:

Даний винахід стосується катіонних полімерів на основі глікогену, комплексів зазначених катіонних полімерів з аніонними сполуками, фармацевтичних композицій, що містять зазначені комплекси, та застосування зазначених комплексів для доставки або трансфектування зазначених аніонних сполук у специфічну фармакологічну ціль, таку як, наприклад, орган, тканина або клітина.

UA 115135 C2

Галузь винаходу

Даний винахід відноситься до катіонних полімерів на основі глікогену, до комплексів, що включають зазначені полімери та щонайменше одну аніонну сполуку, та до застосування зазначених комплексів для доставки аніонних сполук.

5 Зокрема, катіонні полімери на основі глікогену є корисними як невірусні вектори для трансфекції нуклеїнових кислот.

Попередній рівень техніки

10 Для того, щоб знизити побічні ефекти активних речовин та максимізувати їх терапевтичну ефективність, розроблені системи контрольованого вивільнення, у яких фармацевтична форма контролює фазу вивільнення активної речовини, а також системи, здатні доставляти та скеровувати активну речовину до специфічної фармакологічної цілі.

Зокрема, доставляючі та спрямовуючі системи повинні взаємодіяти з активними речовинами таким чином, щоб отриманий комплекс був стійким у процесі зберігання та введення, але вивільнював активну речовину у правильну фармакологічну ціль.

15 Як правило, взаємодії, які мають місце між системою доставки та активною речовиною, є нековалентними, наприклад, такі як електростатичні, іонні або ван-дер-Ваальсові взаємодії, утворення водневих зв'язків та подібні.

20 Проблема розробки систем доставки та спрямовування стосується частково активних речовин з низькою молекулярною масою, та частково полімерів та молекул з високою молекулярною масою, наприклад, таких як нуклеїнові кислоти.

Зокрема, умисний процес вставки послідовностей нуклеїнових кислот та/або генетичних конструкцій у цільові клітини з метою компенсування відсутності гену, надекспресування гену, пригнічення експресування гену або введення нових функцій у зазначену клітину позначається, у галузі генної терапії, терміном "трансфекція".

25 Цей спосіб, здається, багатообіцяючим як у лікуванні генетичних захворювань, так і у розробці стратегій для лікування та профілактики хронічних захворювань.

Однак, при введенні *in vivo* у природній формі, нуклеїнові кислоти, подібно іншим поліаніонним речовинам, швидко розкладаються катіонними ферментами (наприклад, нуклеазами та протеазами) та повністю абсорбуються клітинами.

30 Генні вектори, які були досліджені та розроблені до даного часу, включають вірусні системи (ретровіруси, аденовіруси, тощо) та не-вірусні системи (ліпосоми, полімери, пептиди, тощо).

Відомо, що вірусні вектори мають вищу трансфекційну ефективність, ніж не-вірусні системи. Однак, застосування вірусних векторів *in vivo* обмежується численними недоліками, наприклад, такими як ризик реплікації, можливість спричинення імунних реакцій, той факт, що тільки підрозділені клітини є доступними як цілі, низька ємкість заряду генів великого розміру або довільна вставка ДНК фрагментів.

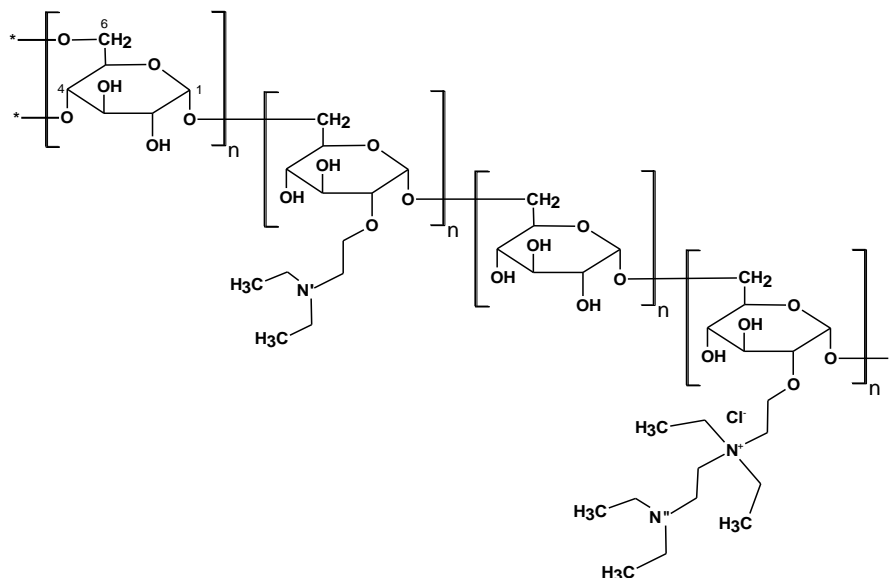
У даній галузі техніки відомо, що застосування генних терапій на основі невірусних векторів включає численні переваги, серед яких - відносна безпека та низька вартість одержання.

40 Невірусні генні вектори, наприклад, катіонний полімери, ліпосоми та синтетичні вектори, широко досліджені як альтернатива застосуванню вірусних векторів.

45 N,N-Діетиламіноетил-декстран (DEAE-декстран) був однією з перших хімічних похідних природного полімеру, призначених для застосування для контрольованого вивільнення активних речовин (наприклад, для контрольованого вивільнення у слизову оболонку, як описано, наприклад, у WO 90/09780) та, далі, як трансфекційний агент (як описано, наприклад, у EP 1 738 769).

DEAE-декстран являє собою полікатіонний полімер, отриманий шляхом введення у реакцію N,N-діетиламіноетил-хлориду та декстрану, який являє собою лінійний полімер, у якому глюкозні одиниці зв'язані за допомогою α -1,6 зв'язків, з невеликим розгалуженням, де глюкозні мономери зв'язані за допомогою α -1,4 зв'язків (нумерація показана у формулі нижче).

50 DEAE-Декстран, представлений наступною структурною формулою, має два замісники, що включають азотні залишки, у яких атоми азоту мають відмінні один від одного фізико-хімічні характеристики:



Перший замісник включає четвертинну амінну функціональну групу (показану як N') з pK_a приблизно 9,5, яка, при фізіологічному pH, знаходиться у іонізованій формі. Другий замісник, відомий як "тандем", включає четвертинну амонійну групу (N⁺), яка має постійний позитивний заряд та впливає на кислотність другої четвертинної амінної функціональної групи (показаної як N''), яка має pK_a приблизно 5,7 та тоді, при фізіологічному pH, знаходиться у не-іонізованій формі (F. Gubensek, Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry - 2 (5) 1968, 1045 - 1054).

Відомо, однак, що позитивні заряди DEAE-декстрану *in vivo* взаємодіють з аніонними біологічними структурами, що відрізняються від нуклеїнових кислот, що приводить до токсичних явищ.

Загалом, механізм утворення комплексів між катіонними полімерами та нуклеїновими кислотами та наступна доставка можуть бути підсумовані як описано нижче.

Генетичний матеріал комплексується катіонними полімерами за допомогою слабких взаємодій, наприклад, таких як електростатичні взаємодії. Утворення цього комплексу захищає нуклеїнову кислоту від нуклеазного розкладання та дозволяє доставити нуклеїнову кислоту у клітину, так як позитивні заряди, присутні на поверхні комплексу, взаємодіють з клітинною мембраною, стимулюючи ендоцитоз комплексу, шляхом утворення ендосом.

Внутрішня частина ендосом має pH приблизно 4,5-5, що є значно більш кислим, ніж pH цитоплазматичного середовища, що становить приблизно 7,3. Ця відмінність у pH підтримується АТФ-залежним протонним насосом, що знаходиться на ендосомальній мембрані, який виштовхує H⁺ іони з цитозолу у ендосому. Кисле pH промотує активність лізосомальних нуклеаз, які є ферментами, що відповідають за розкладання нуклеїнових кислот шляхом гідролізу фосфодискладноефірних зв'язків між нуклеотидними субодинаціями.

Полімери з буферною здатністю інгібують активність лізосомальних нуклеаз та, у той же час, змінюють осмолярність ендосом.

У дійсності, у той час як полімери зв'язують у комплекс H⁺ іони, інші H⁺ іони потрібні цитозолу, у той же час як Cl⁻ іони необхідні для підтримання електричної нейтральності ендосоми. Однак, потреба у H⁺ та Cl⁻ іонах приводить до збільшення концентрації іонів всередині ендосоми, що приводить до зростання осмолярності ендосоми у порівнянні з цитозолем. Зростання осмолярності потребує воду з цитозолу. Отже, ендосома набухає, поки не розірветься, вивільнюючи комплекс полімер-нуклеїнова кислота у цитоплазму.

Цей механізм, відомий як "протон-поглинальний механізм", був описаний, серед інших J-P. Behr у "The proton sponge: a trick to enter cells the viruses did not exploit" (Chimia, 1997, 51, 34-36) у відношенні поліетиленімінових (PEI) полімерів та, у більш загальному вигляді, H. Eliyahu et al. у "Polymers for DNA delivery" (Molecules, 2005, 10, 34-64).

Поліетиленіміни (PEI) являють собою лінійні або розгалужені катіонні полімери, що характеризуються високо ефективним вивільненням олігонуклеотидів та плазмід у клітини, *in vitro*, як описано, наприклад, O. Boussif et al. у "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: Polyethylenimine" (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, Vol. 92, 7297-7301) та у міжнародній патентній заявці WO 02/100435. PEI-и описані як полімери з високою щільністю заряду, що захищає нуклеїнові кислоти від розкладання нуклеазами.

Вважається, що висока буферна здатність PEI захищає нуклеїнову кислоту від розкладання у ендосомах у процесі фази всмоктування клітиною, шляхом спричинення осмотичного набухання ("протон-поглинальний" механізм) ендосоми, що робить можливим вивільнення комплексу вектор-нуклеїнова кислота у цитоплазмі.

Інший полімер, який широко вивчений як трансфекційний агент, являє собою полі(L-лізин) (PLL), який був описаний, наприклад, у міжнародній патентній заявці WO 03/063827, яка характеризується первинними амінами групами, які є іонізованими при фізіологічному pH, які взаємодіють з фосфатними групами нуклеїнових кислот, які є негативно зарядженими. Однак, токсичність та трансфекційна ефективність PLL є прямо пропорційною до його молекулярної маси: коли молекулярна маса полімеру зростає, спостерігається збільшена трансфекційна ефективність, з одного боку, та збільшена цитотоксичність, з іншого боку. Крім того, головний ланцюг PLL слабо розкладається за фізіологічних умов, та його накопичення може призвести до токсичних наслідків у кінцевому рахунку.

Як для більшості катіонних полімерів, комплекси PLL з нуклеїновими кислотами також мають фізико-хімічні недоліки. Наприклад, способи одержання забезпечують невелику можливість контролю розміру, та це може привести до присутності великих часток з обмеженою дифузійною здатністю та/або можливістю осадження у процесі фази формування або введення. Крім того, як виявлено, кислотно-основні характеристики PLL не дають можливості отримати високу трансфекційну ефективність, можливо через обмежену здатність вивільнення нуклеїнової кислоти у цитоплазматичне середовище.

Інші катіонні полімери, як природні, так і синтетичні, описані у даній галузі техніки як трансфекційні агенти для нуклеїнових кислот.

Наприклад, міжнародна патентна заявка WO 03/078576 описує хітозан як трансфекційний агент для нуклеїнових кислот.

Хітозан являє собою природний лінійний полімер, що складається з D-глюкозамінових та N-ацетил-D-глюкозамінових одиниць, які розподілені у довільному порядку у полімері, зв'язаних за допомогою β -1,4 зв'язків, та що включають амінну групу з pK_a приблизно 6,5.

Що стосується трансфекційних агентів для нуклеїнових кислот, також були проведені широкі дослідження на дендримерах, що містять групи, здатні до позитивної іонізації, наприклад, полі(амідоамін) (PAMAM) структури, макромолекули лінійної структури; метакрилові полімери (такі як N,N-диметиламіноетил-метакрилат, DMAEMA), полі(етиленімін) (PEI), та похідні цих полімерів із солюбілізуєчими, функціональними або направляючими групами, наприклад, полімерні структури, що містять полі(етиленгліколь) (PEG).

Лінійні полі(амідоаміни) (PAMAM) описані, наприклад, у міжнародній патентній заявці WO 97/25067, являють собою водорозчинні полімери, які дозволяють формувати розчинні та/або диспергуємі комплекси. Переважно, значення pK_a катіонних груп цих полімерів слід підтримувати у інтервалі між 7 та 8, так як відомо, що нижчі pK_a значення знижують здатність до утворення комплексів з нуклеїновими кислотами. Також, вивільнення комплексів, утворених з дендримерів на основі PAMAM та нуклеїнових кислот, ендосомами залучає "протон-поглинальний" ефект. Особливо, C.L. Waite et al. у "Acetylation of PAMAM dendrimers for cellular delivery of siRNA" (BMC Biotechnology, 2009, 9:38) доповідають, що часткове ацетилювання первинних аміних залишків знижує як буферну здатність дендримерів на основі PAMAM, так і вивільнення міРНК.

Також були розроблені катіонні полімери для інших застосувань, ніж трансфекційні агенти для нуклеїнових кислот.

Наприклад, у параграфі 2.2 статті Pal S. et al. (Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 289, 2006, pages 193-199) розкрито, як глікоген був катіонований шляхом включення катіонного мономеру N-(3-хлор-2-гідроксипропіл)-триметил-амонію хлориду у скелетну структуру полісахаридного глікогену. Знайдено, що зазначений катіонний полімер є ефективним як флокулюючий агент у суспензіях залізної руди.

Відомо, що ідеальний трансфекційний агент має забезпечувати високу трансфекційну здатність, без необхідності впливати на фізіологічну ціль; він має бути нетоксичним при ефективній дозі та має бути таким, що біорозкладається, таким чином, щоб уникнути будь-яких довготривалих побічних ефектів.

Крім того, у випадку, якщо трансфекційний агент є полімером, він має утворювати частки менше, ніж мікромметр (тобто менше ніж 10^{-6} м) та має переважно утворювати наночастки, так як відомо, що розмір може обмежувати як дифузійну здатність комплексу у позаклітинному середовищі, так і ефективність ендоцитозу/фагоцитозу у клітинах.

Нарешті, полімерна структура має включати аміні групи та/або атоми азоту, що характеризуються різними pK_a значеннями. Фактично, аміні групи із pK_a значеннями вище, ніж

фізіологічне рН значення, сприяють комплексуванню нуклеїнової кислоти при фізіологічному рН; амінні групи із pK_a значеннями, що дорівнюють приблизно ендосомальним рН значенням, активують "протон-поглинальний" механізм та забезпечують вивільнення комплексу полімер-нуклеїнова кислота у цитоплазму; нарешті, четвертинні амонійні групи забезпечують

5 комплексування та вивільнюються з ендосоми незалежно від значення рН.

Короткий опис винаходу

Заявник звернувся до проблеми розробки нових полімерів, які можуть бути використані як для доставки низькомолекулярних активних речовин, так і як невірусні вектори для нуклеїнових кислот, та які можуть подолати недоліки матеріалів, відомих у даній галузі техніки.

10 Неочікувано, Заявник виявив, що глікоген може бути модифікований таким чином, щоб отримати нові катіонні похідні.

Переважно, зазначені нові катіонні похідні глікогену характеризуються низькою цитотоксичністю.

Заявник упевнений, що це має місце в основному завдяки двом причинам. По-перше, глікоген являє собою біосумісний полімер, який являє собою продукт метаболізму та зберігання цукрів у всіх тваринних організмах, де він постійно виробляється та розкладається. Крім того, Заявник упевнений, що численні відгалуження у глікогені забезпечують структуру стійкою сферичною конформацією, яка здатна селективно знижувати доступ до катіонних зарядів: розчинні молекули можуть дифундувати всередину полімерної структури та комплексуватися

20 катіонними сайтами, при тому, що, у той же час, взаємодії з більшими комплексними структурами не були б більше дозволені через сферичні причини. Ця сферична конформація могла б зробити можливим зниження токсичності катіонних зарядів, які, як правило, руйнують клітинні мембрани.

Заявник виявив, що нові катіонні похідні глікогену зберігають характеристики біосумісності природного полімеру, з якого вони одержані.

Заявник також виявив, що ці нові катіонні похідні глікогену здатні утворювати комплекси з аніонними сполуками, які мають розміри та молекулярні маси у широкому інтервалі.

Переважно, зазначені комплекси є нанометричного розміру та не показують будь-якої агрегації, коли вони знаходяться у розчині, навіть при високих концентраціях.

30 Заявник виявив, що нові катіонні похідні глікогену можуть доставляти аніонні сполуки до специфічних фізіологічних цілей (наприклад, органів, тканин та клітин).

Заявник також виявив, що катіонні похідні глікогену у відповідності з даним винаходом здатні проникати у клітини.

Отже, зазначені нові катіонні похідні глікогену можуть бути використані для доставки аніонних сполук у клітини.

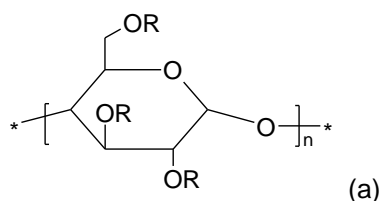
Нарешті, Заявник виявив, що катіонні похідні глікогену у відповідності з даним винаходом можуть бути використані як стабілізатори у зберіганні білків та ферментів та як співад'юванти у виробництві вакцин.

40 Переважно, нові катіонні похідні глікогену включають замісники, що несуть амінні групи, які характеризуються pK_a значеннями, які відрізняються одне від іншого, таким чином, щоб полегшувати як комплексування аніонних сполук, так і вивільнення комплексів полімер-аніонна сполука з ендосоми у цитоплазму.

Переважно, нові катіонні похідні глікогену у відповідності з даним винаходом мають низьку в'язкість та, отже, можуть бути сформульовані у фармацевтичні композиції для ін'єкційного застосування.

У першому аспекті, таким чином, даний винахід відноситься до нових катіонних полімерів на основі модифікованого глікогену, зокрема даний винахід відноситься до катіонних полімерів на основі глікогену, які включають щонайменше одну повторювану одиницю, вибрану з групи, що включає:

50 (a)



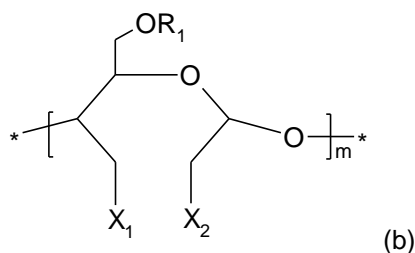
у якій

55 групи R, які можуть бути однаковими або різними, являють собою атом водню;

карбоксиметильну групу, необов'язково у формі солі з фармацевтично прийнятною органічною або неорганічною основою; або групу, що містить атом азоту, вибрану з таких як: $\text{NH}_2\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $[\text{N,N-ді(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $\text{NH}_2\text{-}\{[(\text{C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}]\text{-ді(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламоній}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $\{[\text{N,N-ді(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл-ді(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламоній}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $\text{NH}_2\text{-}[(\text{C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $\{[\text{N,N-ді(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, [три(C₁-C₆)алкіламоній]-(C₁-C₆)алкіл, азоцикл-(C₁-C₆)алкіл, у яких (C₁-C₆)алкільні ланцюги, які можуть бути однаковими або різними, є необов'язково заміщеними однією або більше гідроксильними групами; та

п являє собою ціле число, більше ніж або рівне 1; та

(b)



у якій

R_1 вибирають з атому водню; карбоксиметильної групи, необов'язково у формі солі з фармацевтично прийнятною органічною або неорганічною основою; або групи, що містить атом азоту, вибраної з таких як: $\text{NH}_2\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $[\text{N,N-ді(C}_1\text{-C}_6\text{) алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $\text{NH}_2\text{-}[(\text{C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл-ді(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламоній}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $\{[\text{N,N-ді(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл-ді(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламоній}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $\text{NH}_2\text{-}[(\text{C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $\{[\text{N,N-ді(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, [три(C₁-C₆)алкіламоній]-(C₁-C₆)алкіл, у яких (C₁-C₆)алкільні ланцюги, які можуть бути однаковими або різними, є необов'язково заміщеними однією або більше гідроксильними групами;

X_1 та X_2 , які можуть бути однаковими або різними, являють собою групу -ОН або групу, що містить атом азоту, -NHR₂, у якій R_2 вибирають з таких як: атом водню, (C₁-C₆)алкіл та Н-[NH-(C₁-C₆)алкіл]_p, де p являє собою ціле число, більше ніж або рівне 1, та (C₁-C₆)алкільні групи можуть бути однаковими або різними; та

m являє собою ціле число, більше ніж або рівне 1;

за умови, що щонайменше один з R, R_1 , X_1 та X_2 являє собою групу, що містить азот, як визначено, відповідно, для кожного з R, R_1 , X_1 та X_2 та

за умови, що зазначений катіонний полімер на основі глікогену відрізняється від продукту, отриманого реакцією глікогену з N-(3-хлор-2-гідроксипропіл)-триметил-амоній хлоридом.

Зазначений вище вираз "за умови, що щонайменше один з R, R_1 , X_1 та X_2 являє собою групу, що містить азот, як визначено, відповідно, для кожного з R, R_1 , X_1 та X_2 " означає, що, у випадку, коли R являє собою групу, що містить азот, зазначена група приймає значення, визначені у R, у випадку, коли R_1 являє собою групу, що містить азот, зазначена група приймає значення, визначені у R_1 , у випадку, коли X_1 являє собою групу, що містить азот, зазначена група приймає значення, визначені у X_1 , та у випадку, коли X_2 являє собою групу, що містить азот, зазначена група приймає значення, визначені у X_2 .

У другому аспекті, даний винахід відноситься до комплексу між катіонним полімером на основі глікогену та аніонною сполукою.

У відповідності з кращим варіантом втілення, зазначена аніонна сполука являє собою активну речовину. Переважно, зазначена аніонна сполука являє собою нуклеїнову кислоту.

У третьому аспекті, даний винахід відноситься до фармацевтичної композиції, що включає комплекс між катіонним полімером на основі глікогену та аніонною сполукою, та щонайменше один фармацевтично прийнятний наповнювач.

У четвертому аспекті, даний винахід відноситься до застосування комплексу між катіонним полімером на основі глікогену та аніонною сполукою для доставки або трансфекції зазначеної аніонної сполуки у специфічну фармакологічну ціль, наприклад, орган, тканину або клітину.

У відповідності з одним кращим варіантом втілення, зазначена аніонна сполука являє собою активну речовину. Переважно, зазначена аніонна сполука являє собою нуклеїнову кислоту.

КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

На Фігурах 1 - 8 представлені вісім агарозних гелів, отриманих у результаті електрофорезу у гелі, як описано у Прикладі 5. У всіх Фігурах 1 - 8, міРНК(*) та ДНК(*) маркери розподіляють для

одержання відповідних смуг, що використовують для порівняльних цілей, та перевірки функціонування електрофорезного методу.

На Фігурі 1 представлений агарозний гель, на якому розподілені комплекси, отримані між полімером 3 у відповідності з даним винаходом та міРНК при різних концентраціях (від 0,5% до 8% за масою). Полімер 3, що не містить нуклеїнової кислоти (0%), використовують як контрольний зразок для перевірки того, що катіонний полімер у відповідності з даним винаходом не заважає визначенню ділянки, що стосується міРНК.

На Фігурі 2 представлений агарозний гель, на якому розподіляють:

- Комплекси, отримані між полімером 3 у відповідності з даним винаходом та міРНК при концентраціях від 10% до 20% за масою;

- полімер 3, що не містить нуклеїнової кислоти (0%), як контрольний зразок для перевірки того, що катіонний полімер у відповідності з даним винаходом не заважає визначенню ділянки, що стосується міРНК; та

- полімер 50 (немодифікований глікоген Polglumyt™) як контрольний зразок для перевірки того, що глікоген, не модифікований у відповідності з даним винаходом, є нездатним до комплексування з нуклеїновими кислотами.

На Фігурі 3 представлений агарозний гель, на якому розподілені комплекси, отримані між полімером 3 у відповідності з даним винаходом та міРНК при різних концентраціях (від 30% до 800% за масою).

На Фігурі 4 представлений агарозний гель, на якому розподілені комплекси отримані між полімерами 1, 2 та 6 у відповідності з даним винаходом та міРНК при концентраціях 5% та 20% за масою по відношенню до загальної маси кожного полімеру.

На Фігурі 5 представлений агарозний гель, на якому розподілені комплекси, отримані між полімерами 10, 14 та 15 у відповідності з даним винаходом та міРНК при концентраціях 5% та 20% за масою по відношенню до загальної маси кожного полімеру.

На Фігурі 6 представлений агарозний гель, на якому розподілені комплекси, отримані між полімерами 8, 12 та 16 у відповідності з даним винаходом та міРНК при концентраціях 5% та 20% за масою по відношенню до загальної маси кожного полімеру.

На Фігурі 7 представлений агарозний гель, на якому розподілені комплекси, отримані між полімерами 21, 24 та 25 у відповідності з даним винаходом та міРНК при концентраціях 5% та 20% за масою по відношенню до загальної маси кожного полімеру.

На Фігурі 8 представлений агарозний гель, на якому розподілені комплекси, отримані між полімерами 20, 23 та 28 у відповідності з даним винаходом та міРНК при концентраціях 5% та 20% за масою по відношенню до загальної маси кожного полімеру.

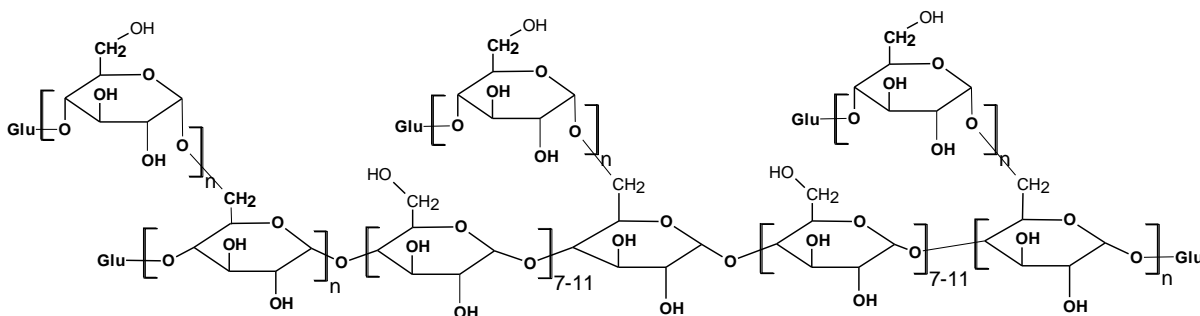
На Фігурі 9 показана титраційна крива для полімерів 2, 3 та 4 у відповідності з даним винаходом, отримана як описано у Прикладі 8.

На Фігурі 10 показана титраційна крива для полімерів 4 (у відповідності з даним винаходом) та 18 (контрольний зразок), отримана як описано у Прикладі 8.

Детальний опис даного винаходу

У даному описі та у Формулі винаходу, що слідує нижче, словосполучення "катіонний полімер" означає полімер із загальним позитивним зарядом, при фізіологічному рН.

У даному описі та у Формулі винаходу, що слідує нижче, термін "глікоген" означає, загалом, глюкозний гомополімер, що характеризується високим ступенем розгалуження, у якому глюкозні мономери зв'язані за допомогою α -(1,4) зв'язків у лінійні ланцюги, у той час як відгалуження привиті за допомогою α -(1,6) зв'язків, в основному, але без обмеження, кожні 7-11 глюкозних мономерів, як показано у наступній формулі:



Для цілей даного опису та Формули винаходу, що слідує нижче, вираз "на основі глікогену" використовують, щоб показати, що полімер включає глікогенову структуру, описану вище, яка є

частково модифікованою з одержанням катіонного полімеру у відповідності з даним винаходом.

Для цілей даного опису та Формули винаходу, що слідує нижче, вираз "повторювана одиниця" означає мономер, який присутній щонайменше один раз у катіонному полімері у відповідності з даним винаходом.

5 Для цілей даного опису та Формули винаходу, що слідує нижче, вираз "(C₁-C₆) алкіл" означає лінійну або розгалужену алкільну групу, що містить від 1 до 6 атомів вуглецю, наприклад, метил, етил, пропіл, ізопропіл, н-бутил, ізобутил, втор-бутил, трет-бутил, н-пентил, втор-пентил, 3-пентил, ізопентил, неопентил, н-гексил, втор-гексил або неогексил.

10 Для цілей даного опису та Формули винаходу, що слідує нижче, термін "азоцикліл" означає 3- - 7-членне ароматичне або аліфатичне гетероциклічне кільце, що містить щонайменше один N атом, таке як, наприклад, азиридин, пірол, піролін, піролідін, піридин або піперидин. У деяких випадках, зазначене вище гетероциклічне кільце може включати щонайменше другий гетероатом, вибраний з N, O та S, таке як, наприклад тіазол, оксазин або тіазин.

15 Для цілей даного опису та Формули винаходу, що слідує нижче, термін "комплекс" означає продукт, отриманий шляхом взаємодії катіонного полімеру на основі глікогену у відповідності з даним винаходом з щонайменше однією аніонною сполукою, за допомогою нековалентних взаємодій (наприклад, електростатичних, іонних або ван-дер-Ваальсових взаємодій, водневих зв'язків та подібного).

20 Для цілей даного опису та Формули винаходу, що слідує нижче, вираз "активна речовина" включає природні, напівсинтетичні або синтетичні молекули, які, після введення, здатні взаємодіяти з біологічними функціональними групами клітини або живого організму та, можливо, модифікуючи зазначену функціональну групу. Активні речовини, які є корисними у відповідності з даним винаходом, таким чином, являють собою молекули із загальним негативним зарядом, іншими словами аніонні молекули, які можуть бути використані для
25 терапії, профілактики або діагностування патологічного стану. Зазначені аніонні молекули можуть бути органічними або неорганічними. Наприклад, вони можуть являти собою органічні аніонні молекули та можуть мати низьку молекулярну масу (наприклад, амінокислоти, сульфаміди або вітаміни) або високу молекулярну масу (наприклад, вакцини, або глюкозаміноглікани, такі як гепарин).

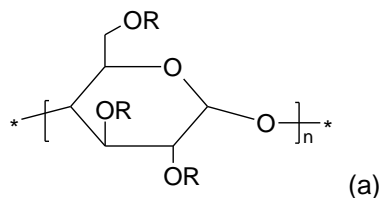
30 Для цілей даного опису та Формули винаходу, що слідує нижче, термін "нуклеїнова кислота" означає нуклеотидні макромолекули, природного або синтетичного походження, які є дво-спіральними або одно-спіральними, та які мають загальний негативний заряд. Зокрема, цей термін включає олігонуклеотиди, РНК (міРНК, длДНК, олРНК, кшРНК, мікроРНК, рРНК, гяРНК, іРНК, тРНК, мяРНК, пре-іРНК, каталітична РНК, антисмислова РНК), ДНК (кДНК, мтДНК, олДНК, длДНК, антисмислова ДНК, плазмідна ДНК).

35 Для цілей даного опису та Формули винаходу, що слідує нижче, вирази "доставка активної речовини" та "доставляння активної речовини" показують транспортування активної речовини, закомплексованої з катіонним полімером у відповідності з даним винаходом, до специфічної фізіологічної цілі, наприклад, тканини або органу.

40 Для цілей даного опису та Формули винаходу, що слідує нижче, терміни "трансфекція" та "трансфектування" означають введення послідовності нуклеїнових кислот у клітину, зокрема у цитоплазму та/або ядро.

Зокрема, даний винахід відноситься до катіонного полімеру на основі глікогену, що включає щонайменше одну повторювану одиницю, вибрану з групи, що включає:

45 (a)



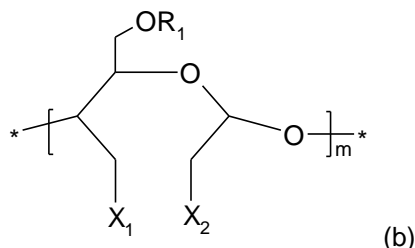
у якій

групи R, які можуть бути однаковими або різними, являють собою атом водню; карбоксиметильну групу, необов'язково у формі солі з фармацевтично прийнятною органічною
50 або неорганічною основою; або групу, що містить атом азоту, вибрану з таких як NH₂-(C₁-C₆)алкіл, [N,N-ді(C₁-C₆)алкіламіно]-(C₁-C₆)алкіл, NH₂-[(C₁-C₆)алкіл-ді(C₁-C₆)алкіламоній]-(C₁-C₆)алкіл, {[N,N-ді(C₁-C₆)алкіл-аміно]-(C₁-C₆)алкіл-ді(C₁-C₆)алкіламоній}-(C₁-C₆)алкіл, NH₂-[(C₁-C₆)алкіл аміно]-(C₁-C₆)алкіл, {[N,N-ді(C₁-C₆)алкіламіно]-(C₁-C₆)алкіламіно}-(C₁-C₆)алкіл, [три(C₁-C₆)алкіламоній]-(C₁-C₆)алкіл, азоцикліл-(C₁-C₆)алкіл, у яких ланцюги (C₁-C₆)алкілу, які можуть
55 бути однаковими або різними, є необов'язково заміщеними однією або більше гідроксильними

групами; та

n являє собою ціле число, більше ніж або рівне 1; та

(b)



у якій

R_1 вибирають з атому водню; карбоксиметильної групи, необов'язково у формі солі з фармацевтично прийнятною органічною або неорганічною основою; або групи, що містить атом азоту, вибраної з таких як: $\text{NH}_2\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $[\text{N,N-ді(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $\text{NH}_2\text{-}[(\text{C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл-ді(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламоній}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $\{[\text{N,N-ді(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл-ді(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламоній}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $\text{NH}_2\text{-}[(\text{C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $\{[\text{N,N-ді(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $[\text{три(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламоній}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, у яких $(\text{C}_1\text{-C}_6\text{)алкільні}$ ланцюги, які можуть бути однаковими або різними, є необов'язково заміщеними однією або більше гідроксильними групами;

X_1 та X_2 , які можуть бути однаковими або різними, являють собою групу -OH або групу, що містить азот, -NHR_2 , у якій R_2 вибирають з таких як: атом водню, $(\text{C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$ та $\text{H-[NH-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл]}_p\text{-}$, де p являє собою ціле число, більше ніж або рівне 1, та $(\text{C}_1\text{-C}_6\text{)алкільні}$ групи можуть бути однаковими або різними; та

m являє собою ціле число, більше ніж або рівне 1;

за умови, що щонайменше один з R , R_1 , X_1 та X_2 являє собою групу, що містить азот, як визначено, відповідно, для кожного з R , R_1 , X_1 та X_2 та

за умови, що зазначений катіонний полімер на основі глікогену відрізняється від продукту, отриманого шляхом реакції глікогену з $\text{N-(3-хлор-2-гідроксипропіл)-триметил-амоній хлоридом}$, як розкрито, зокрема, у розділі 2.2 статті Pal S et al. (Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 289, 2006, pages 193-199).

Переважно, групи R , які можуть бути однаковими або різними, являють собою атом водню; карбоксиметильну групу, необов'язково у формі солі з фармацевтично прийнятною органічною або неорганічною основою; або групу, що містить атом азоту, вибрану з таких як: $[\text{N,N-ді(C}_1\text{-C}_3\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_3\text{)алкіл}$, $\{[\text{N,N-ді(C}_1\text{-C}_3\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_3\text{)алкіл-ді(C}_1\text{-C}_3\text{)алкіламоній}]\text{-(C}_1\text{-C}_3\text{)алкіл}$, $\{[\text{N,N-ді(C}_1\text{-C}_3\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_3\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_3\text{)алкіл}$, або $[\text{три(C}_1\text{-C}_3\text{)алкіламоній}]\text{-(C}_1\text{-C}_3\text{)алкіл}$, азоцикліл- $(\text{C}_1\text{-C}_3\text{)алкіл}$, у яких $(\text{C}_1\text{-C}_3\text{)алкільні}$ ланцюги, які можуть бути однаковими або різними, є необов'язково заміщеними гідроксильною групою.

Переважно, гетероциклічне кільце, що містить щонайменше один N атом, що представляється терміном "азоцикліл", являє собою 5- або 6-членне ароматичне або аліфатичне гетероциклічне кільце, таке як, наприклад, пірол, піролін, піролідін, піридин або піперидин. Переважно, зазначене 5- або 6-членне гетероциклічне кільце включає щонайменше другий гетероатом, вибраний з N , O та S , та представлене, наприклад, діазолом, оксазином та тіазином. Переважно, зазначене гетероциклічне кільце є аліфатичним. Навіть більш переважно, зазначене гетероциклічне кільце являє собою морфолін або піперидин.

Більш переважно, групи R , які можуть бути однаковими або різними, являють собою атом водню; карбоксиметильну групу, необов'язково у формі солі з фармацевтично прийнятною органічною або неорганічною основою; або групу, що містить атом азоту, вибрану з таких як: $\text{N,N-диметиламіноетил}$, $\text{N,N-ліметиламінопропіл}$, $\text{N,N-діетиламіноетил}$, $[(\text{N,N-диметиламіноетил})\text{диметиламоній}]\text{етил}$, $[(\text{N,N-диметиламінопропіл})\text{диметил-амоній}]\text{пропіл}$, $[(\text{N,N-діетиламіноетил})\text{діетиламоній}]\text{-етил}$, $[\text{триметиламоній}]\text{-2-гідроксипропіл}$, піперидил- N-етил або морфолініл- N-етил .

Переважно, R_1 являє собою атом водню; карбоксиметильну групу, необов'язково у формі солі з фармацевтично прийнятною органічною або неорганічною основою; або групу, що містить атом азоту, вибрану з таких як: $[\text{N,N-ді(C}_1\text{-C}_3\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_3\text{)алкіл}$, $\{[\text{N,N-ді(C}_1\text{-C}_3\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_3\text{)алкіл-ді(C}_1\text{-C}_3\text{)алкіламоній}]\text{-(C}_1\text{-C}_3\text{)алкіл}$, $\{[\text{N,N-ді(C}_1\text{-C}_3\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_3\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_3\text{)алкіл}$ або $[\text{три(C}_1\text{-C}_3\text{)алкіламоній}]\text{-(C}_1\text{-C}_3\text{)алкіл}$, у яких $(\text{C}_1\text{-C}_3\text{)алкільні}$ ланцюги, які можуть бути однаковими або різними, є необов'язково заміщеними гідроксильною групою.

Більш переважно, R_1 являє собою атом водню або карбоксиметильну групу.

Переважно, X_1 та X_2 , які можуть бути однаковими або різними, являють собою групу $-NHR_2$, у якій R_2 являє собою атом водню або $H-[NH-(C_1-C_4)\text{алкіл}]_p-$, де p являє собою ціле число, більше ніж або рівне 1, та (C_1-C_4) алкільні групи можуть бути однаковими або різними.

5 Переважно, зазначена група $H-[NH-(C_1-C_4)\text{алкіл}]_p-$ являє собою поліетиленімін з молекулярною масою від 50 до 3000 дальтонів та більш переважно з молекулярною масою від 1000 до 2300 дальтонів, спермін $(H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2)$, або спермідин $(H_2N(CH_2)_4NH(CH_2)_4NH_2)$.

10 Приклади фармацевтично прийнятних органічних основ включають трометамін, лізин, аргінін, гліцин, аланін, метиламін, диметиламін, триметиламін, етиламін, діетиламін, триетиламін, пропіламін, дипропіламін, трипропіламін, етилендіамін, моноетаноламін, діетаноламін, триетаноламін, гуанідин, морфолін, піперидин, піролідин, піперазин, 1-бутилпіперидин, 1-етил-2-метилпіперидин, N-метилпіперазин, 1,4-ди-метилпіперазин, N-бензилфенетиламін, N-метилглюкозамін та тріс(гідроксиметил)амінометан.

15 Приклади фармацевтично прийнятних неорганічних основ включають гідроксиди або карбонати лужних металів або лужноземельних металів, такі як, наприклад, гідроксид натрію, гідроксид калію, гідроксид кальцію, карбонат натрію, карбонат калію та карбонат кальцію.

Переважно, зазначені повторювані одиниці (a) та (b) розташовані у довільному порядку у глікогенових ланцюгах.

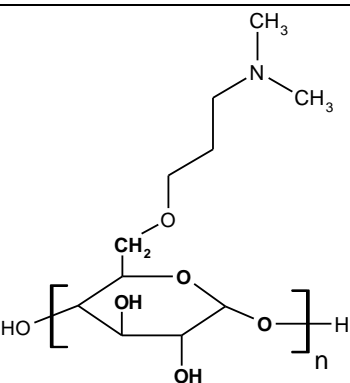
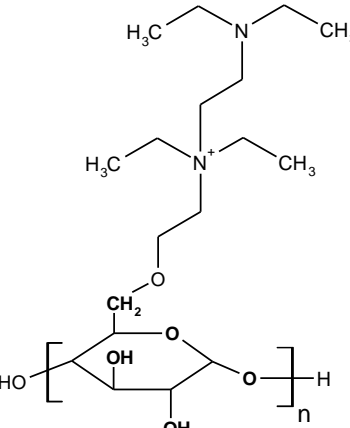
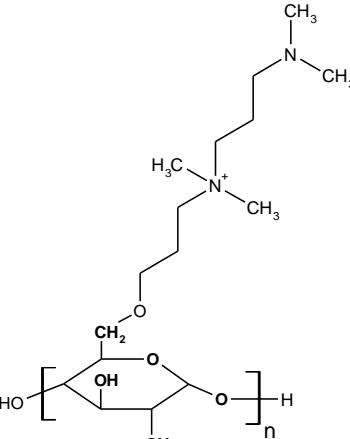
20 Приклади повторюваних одиниць (a) та (b) представлені, відповідно, у таблицях A та B нижче

Таблиця A

Приклади повторюваних одиниць (a)

Положення замісника	Замісник	Повторювана одиниця формули (a)
6	N,N-діетил-аміноетил	
6	N,N-диметил-аміноетил	

Приклади повторюваних одиниць (а)

Положення замісника	Замісник	Повторювана одиниця формули (а)
6	N,N-диметил-амінопропіл	
6	[(N,N-діетил-аміноетил)-діетил-амоній]етил	
6	[(N,N-диметил-амінопропіл)-диметиламоній]пропіл	

Приклади повторюваних одиниць (а)

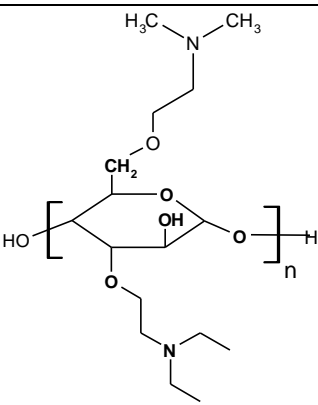
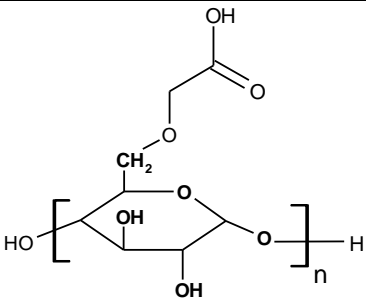
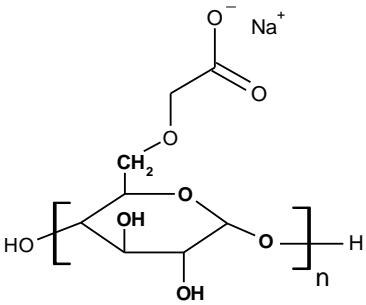
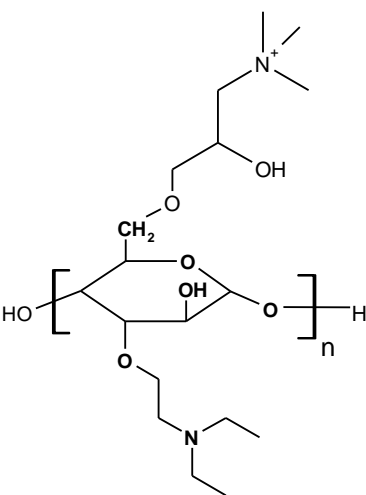
Положення замісника	Замісник	Повторювана одиниця формули (а)
6	[(N,N-диметил-аміноетил)-диметиламоній]етил	
6	[триметил-амоній]-2-гідроксипропіл	
2	[триметил-амоній]-2-гідроксипропіл	

Таблиця А

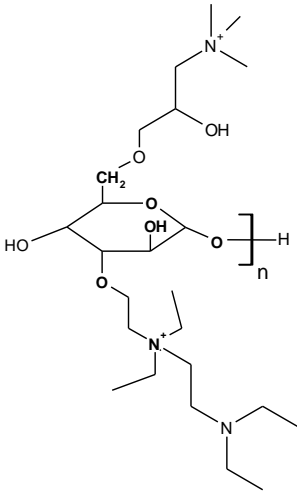
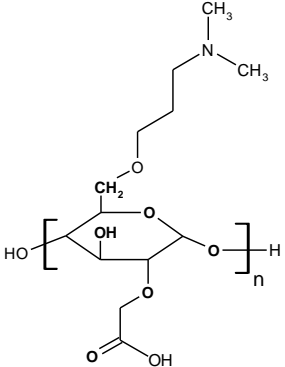
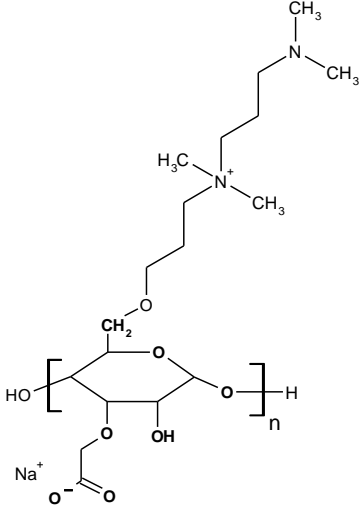
Приклади повторюваних одиниць (а)

Положення замісника	Замісник	Повторювана одиниця формули (а)
6	[(N,N-диметил-амінопропіл)-диметил-амоній]пропіл	
2	N,N-диметил-амінопропіл	
6	[(N,N-діетил-аміноетил)-діетиламоній]-етил	
2,3	N,N-діетил-аміноетил	
3	N,N-диметил-аміноетил	

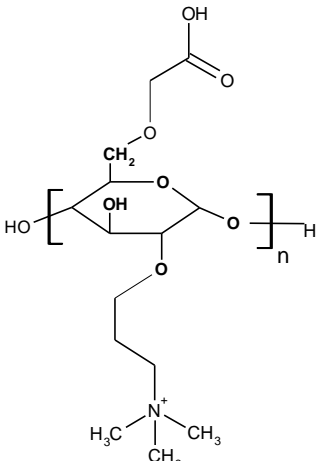
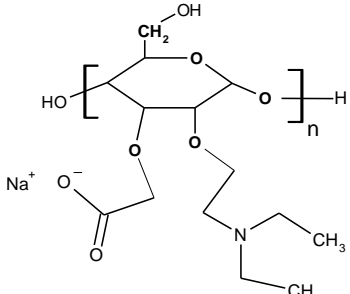
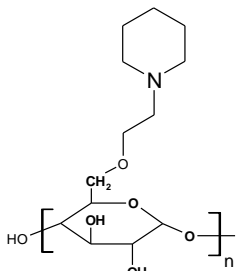
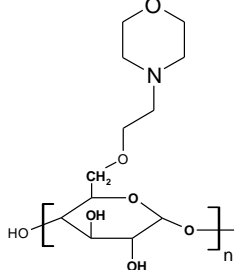
Приклади повторюваних одиниць (а)

Положення замісника	Замісник	Повторювана одиниця формули (а)
6 3	N,N-диметил-аміноетил N,N-діетил-аміноетил	
6	карбоксиметил	
6	карбоксиметил- натрієва сіль	
6 3	триметиламоній-2-гідроксипропіл N,N-діетил-аміноетил	

Приклади повторюваних одиниць (а)

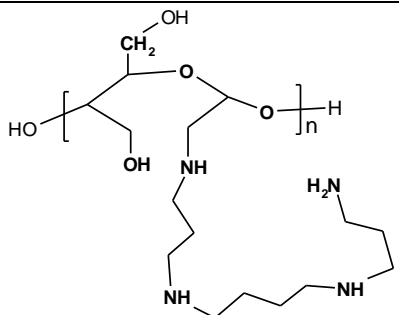
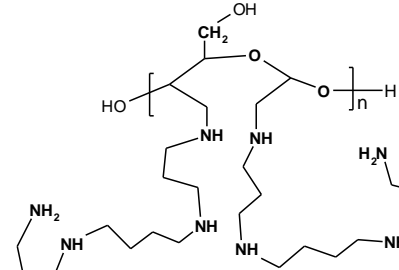
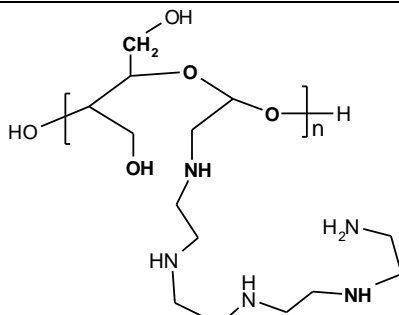
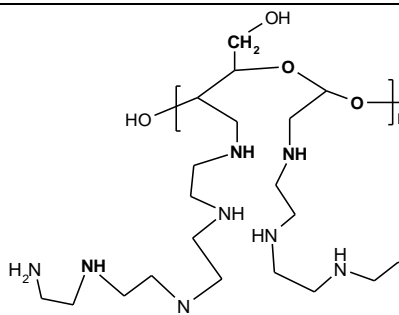
Положення замісника	Замісник	Повторювана одиниця формули (а)
6	[триметил-амоній]-2-гідроксипропіл	
3	[(N,N-діетил-аміноетил)-діетиламоній]-етил	
6	N,N-диметил-амінопропіл	
2	карбоксиметил	
6	[(N,N-диметил-амінопропіл)-диметиламоній]пропіл	
3	карбоксиметил натрієва сіль	

Приклади повторюваних одиниць (а)

Положення замісника	Замісник	Повторювана одиниця формули (а)
6	карбоксиметил	
2	[триметил-амоній]пропіл	
2	N,N-діетил-аміноетил	
3	карбоксиметил натрієва сіль	
6	N-етилпіперидил	
6	N-етил-морфолініл	

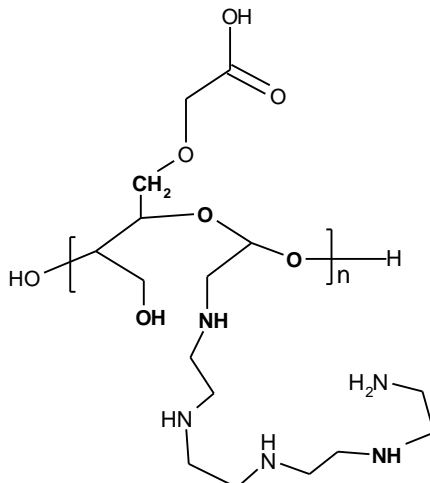
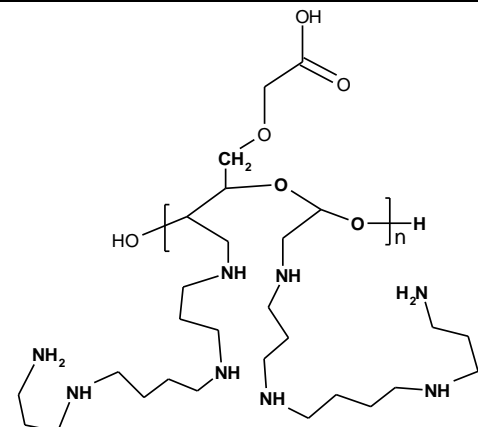
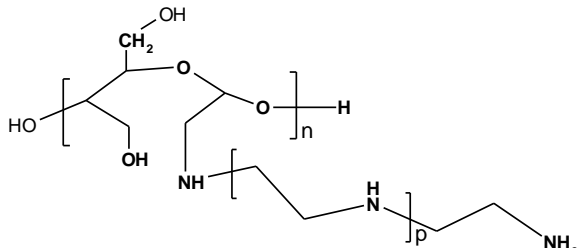
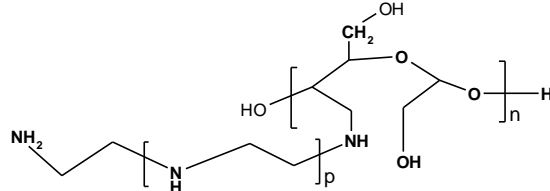
Таблиця В

Приклади повторюваних одиниць (b)

Положення замісника	Замісник	Повторювана одиниця формули (b)
2	Спермін	
2,3	Спермін	
2	тетраетилен-пентамін	
2,3	тетраетилен-пентамін	

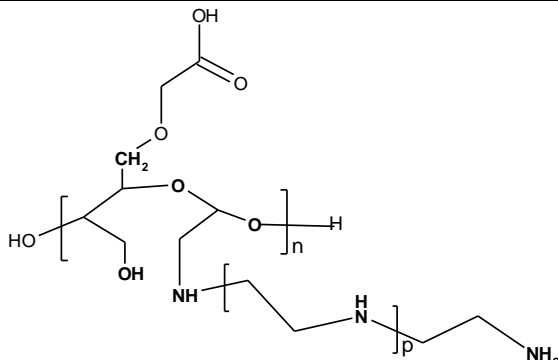
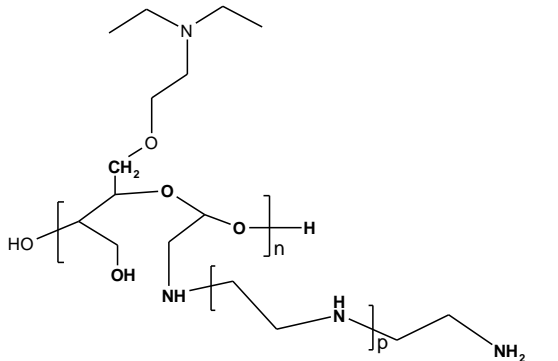
Таблиця В

Приклади повторюваних одиниць (b)

Положення замісника	Замісник	Повторювана одиниця формули (b)
6 2	Карбоксиметил тетраетилен-пентамін	 <p>The structure shows a polymer backbone with a carboxymethyl group (-CH₂COOH) and a tetraethylenepentamine substituent (-NH(CH₂)₄NH₂) attached to the repeat unit.</p>
6 2,3	Карбоксиметил Спермін	 <p>The structure shows a polymer backbone with a carboxymethyl group (-CH₂COOH) and a spermine substituent (-NH(CH₂)₃NH(CH₂)₃NH(CH₂)₃NH₂) attached to the repeat unit.</p>
2	Поліетилен-імін (ММ = 1300 Да)	 <p>The structure shows a polymer backbone with a polyethyleneimine substituent (-NH(CH₂)₄NH₂) attached to the repeat unit.</p>
3	Поліетилен-імін (ММ = 2000 Да)	 <p>The structure shows a polymer backbone with a polyethyleneimine substituent (-NH(CH₂)₄NH₂) attached to the repeat unit.</p>

Таблиця В

Приклади повторюваних одиниць (b)

Положення замісника	Замісник	Повторювана одиниця формули (b)
2	Поліетилен-імін	
6	Карбоксиметил	
2	Поліетилен-імін	
6	N,N-Діетил-аміноетил	

У відповідності з кращим варіантом втілення, зазначені повторювані одиниці (a) та (b) включають щонайменше одну групу, що містить азот, яка є здатною до іонізації при фізіологічному рН, та яка сприяє комплексуванню зазначеної аніонної сполуки, та щонайменше одну групу, що містить азот, яка є здатною до іонізації при рН нижче фізіологічного рН, та яка сприяє вивільненню комплексу з ендосом.

Переважно, зазначені групи, що містять азот, які є здатними до іонізації при фізіологічному рН, присутні у числовому відсотковому виразі від 1% до 30% по відношенню до загальної кількості гідроксильних груп у глікогені, що використовують для одержання катіонних полімерів у відповідності з даним винаходом.

Переважно, зазначені групи, що містять азот, які є здатними до іонізації при рН нижче фізіологічного рН, присутні у числовому відсотковому виразі від 0,1% до 10% по відношенню до загальної кількості гідроксильних груп у глікогені, що використовують для одержання катіонних полімерів у відповідності з даним винаходом.

Для цілей даного винаходу, зазначені групи, що містять азот, які є здатними до іонізації при фізіологічному рН, включають $\text{NH}_2-(\text{C}_1-\text{C}_6)\text{алкіл}$, $[\text{N},\text{N}-\text{ді}(\text{C}_1-\text{C}_6)\text{алкіламіно}](\text{C}_1-\text{C}_6)\text{алкіл}$, $\text{NH}_2-[(\text{C}_1-\text{C}_6)\text{алкіламіно}](\text{C}_1-\text{C}_6)\text{алкіл}$, $\{[\text{N},\text{N}-\text{ді}(\text{C}_1-\text{C}_6)\text{алкіламіно}](\text{C}_1-\text{C}_6)\text{алкіламіно}-(\text{C}_1-\text{C}_6)\text{алкіл}$ та азоцикліл- $(\text{C}_1-\text{C}_6)\text{алкіл}$.

Переважно, зазначені групи, що містять азот, які є здатними до іонізації при рН нижче фізіологічного рН, включають $\text{NH}_2-[(\text{C}_1-\text{C}_3)\text{алкіл}-\text{ді}(\text{C}_1-\text{C}_6)\text{алкіламоній}](\text{C}_1-\text{C}_6)\text{алкіл}$ та $\{[\text{N},\text{N}-\text{ді}(\text{C}_1-\text{C}_6)\text{алкіламіно}](\text{C}_1-\text{C}_3)\text{алкіл}-\text{ді}(\text{C}_1-\text{C}_6)\text{алкіл-амоній}-(\text{C}_1-\text{C}_6)\text{алкіл}$.

Переважно, нові катіонні похідні глікогену у відповідності з даним винаходом мають низьку в'язкість та, отже, можуть бути сформульовані у фармацевтичні композиції для ін'єкційного застосування. Зокрема, нові катіонні похідні глікогену у відповідності з даним винаходом мають в'язкість, менше ніж 10 мПз та переважно менше ніж 5 мПз, що вимірюють при концентрації 1% у PBS за допомогою роторного віскозиметру.

Глікоген, що використовують для одержання катіонних полімерів у відповідності з даним винаходом, може бути отриманий у відповідності з одним зі способів, відомих у даній галузі техніки.

Переважно, глікоген отримують як описано у міжнародній патентній заявці WO 94/03502.

Переважно, зазначений глікоген отримують з видів *Mytilus edulis* та *Mytilus galloprovincialis*.

Інші джерела глікогену, які можуть бути використані для цілей даного винаходу, включають молюсків, таких як устриці та *Crepidula fornicata*, та багаті на глікоген органи хребетних тварин, такі як печінка та м'язи.

Переважно, зазначений глікоген є по суті вільним від сполук, що містять азот та редукуючі цукри. Як використано у даному описі та у Формулі винаходу, що слідує нижче, вираз "по суті вільні від сполук, що містять азот та редукуючі цукри" означає, що вміст азоту становить менше, ніж 60 ppm, що вимірюють за допомогою методу Кієдаля (Kjeldahl method), та вміст редукуючих цукрів становить менше, ніж 0,25%, що вимірюють за допомогою методу F.D. Snell та Snell ("Colorimetric Methods of Analysis", New York, 1954, vol. III, p. 204).

Переважно, глікоген, що використовують у відповідності з даним винаходом, також характеризується вмістом вуглецю від приблизно 44% до приблизно 45%, молекулярною масою приблизно $(2,5 \pm 0,1) \times 10^6$ дальтонів та обертанням площини поляризації $(\alpha)_D^{20} 197 \pm 2,0$ (с = 1, у воді).

Більш переважно, глікоген, що використовують у відповідності з даним винаходом, являє собою глікоген PolglumytTM, вироблений Aziende Chimiche Riunite Angelini Francesco A.C.R.A.F. S.p.A.

Спеціаліст, кваліфікований у даній галузі техніки, легко зрозуміє, що даний винахід не стосується нових класів сполук з терапевтичною ефективністю per se. Скоріше даний винахід відноситься до застосування катіонного полімеру на основі глікогену, як описано вище, для утворення комплексу з щонайменше однією аніонною сполукою.

У другому аспекті, даний винахід відноситься до комплексу між катіонним полімером на основі глікогену та аніонною сполукою, у якому зазначений катіонний полімер на основі глікогену включає щонайменше одну повторювану одиницю, вибрану з групи, що складається з (a) та (b), описаних вище.

Переважно, зазначена аніонна сполука є органічною або неорганічною, з низькою молекулярною масою або високою молекулярною масою.

Більш переважно, зазначена аніонна сполука являє собою активну речовину, що належить, наприклад, до одного з наступних класів: протиінфекційні агенти, наприклад, антибіотики та противірусні агенти; анагетичні засоби; анорексигенні засоби; протигельмінтні засоби; протиастматичні засоби; протисудомні засоби; антидепресанти; антидіабетичні засоби; протидіарейні засоби; антигістамінні засоби; протизапальні засоби; антигемікранійні агенти; протиблювотні агенти; протипухлинні засоби; антипаркінсонічні засоби; протисверблячі агенти; антипсихотичні засоби; жарознижувальні засоби; антиспазмолітичні засоби; антихолінергічні агенти; симпатоміметичні засоби; ксантинові похідні; лікарські засоби для серцево-судинної системи, наприклад, калій, блокатори кальцієвих каналів, бета блокатори, альфа блокатори та антиаритмічні засоби; антигіпертензивні засоби; діуретики та антидіуретичні засоби; центральні та периферичні вазодилататори; стимулятори центральної нервової системи; судинозвужуючі засоби; антигусисивні агенти; протизастійні засоби; гормони; снотворні засоби; імунодепресанти; м'язові релаксанти; парасимпатолітичні агенти; психостимулюючі агенти; заспокійливі засоби; транквілізатори.

У відповідності з кращим варіантом втілення, зазначена аніонна сполука являє собою нуклеїнову кислоту.

Переважно, зазначену нуклеїнову кислоту вибирають з таких як: олігонуклеотиди, РНК (міРНК, длДНК, олРНК, кшРНК, мікроРНК, рРНК, гяРНК, іРНК, тРНК, мяРНК, pre-iРНК, каталітична РНК, антисмислова РНК) та ДНК (кДНК, мтДНК, олДНК, длДНК, антисмислова ДНК, плазмідна ДНК).

Заявник виявив, що зазначений комплекс здатний утворювати на наномерні частинки із середнім діаметром (Z) від 1 до 200 нм, переважно від 20 до 100 нм та більш переважно від 30 до 50 нм.

У відповідності з кращим варіантом втілення, зазначений комплекс включає кількість зазначеної аніонної сполуки від 5% до 60% за масою по відношенню до маси зазначеного катіонного полімеру на основі глікогену.

Переважно, зазначений комплекс включає кількість зазначеної аніонної сполуки від 10% до 50% за масою по відношенню до маси зазначеного катіонного полімеру на основі глікогену.

Більш переважно, зазначений комплекс включає кількість зазначеної аніонної сполуки від 10% до 30% за масою по відношенню до маси зазначеного катіонного полімеру на основі глікогену.

Комплекс між катіонним полімером на основі глікогену та аніонною сполукою переважно

може бути одержаний у вигляді фармацевтичної композиції.

У третьому аспекті, даний винахід відноситься до фармацевтичної композиції, що включає комплекс між катіонним полімером на основі глікогену та аніонною сполукою та щонайменше один фармацевтично прийнятний наповнювач, у якій зазначений катіонний полімер на основі глікогену включає щонайменше одну повторювану одиницю, вибрану з групи, що складається з (a) та (b), описаних вище.

У одному переважному варіанті втілення, зазначена аніонна сполука являє собою нуклеїнову кислоту.

Термін "наповнювач" означає будь-який агент, відомий у даній галузі техніки, який підходить для одержання фармацевтичної форми.

Приклади наповнювачів, які є підходящими у відповідності з даним винаходом, включають: консерванти, стабілізатори, поверхнево-активні речовини, солі для регулювання осмотичного тиску, емульгатори, підсолоджувачі, ароматизатори, барвники та подібні.

Зазначена фармацевтична композиція може бути одержана у одиничній лікарській формі у відповідності із способами, відомими у даній галузі техніки.

Переважно, зазначена фармацевтична композиція призначена для ін'єкційного застосування, така як, наприклад, водний розчин, суспензія або емульсія, або може бути у формі порошку, який необхідно відновити для одержання водного розчину, суспензії або емульсії для внутрішньовенного, внутрішньом'язового, підшкірного, крізьшкірного або внутрішньочеревинного введення.

Альтернативно, зазначена фармацевтична композиція може бути, наприклад, у формі таблетки, капсули, покритих таблеток, гранул, розчинів та сиропів для перорального введення; медичних пластирів, розчинів, паст, кремів або помад для крізьшкірного введення; супозиторіїв для ректального введення; стерильного розчину для аерозольного введення; для негайного та уповільненого вивільнення.

У четвертому аспекті, даний винахід відноситься до застосування комплексу між катіонним полімером на основі глікогену та аніонною сполукою, для доставки або переносу зазначеної аніонної сполуки до специфічної фармакологічної цілі, наприклад, органу, тканини або клітини, де зазначений катіонний полімер на основі глікогену включає щонайменше одну повторювану одиницю, вибрану з групи, що складається з (a) та (b), описаних вище.

У відповідності з кращим варіантом втілення, зазначена аніонна сполука являє собою активну речовину. Переважно, зазначена аніонна сполука являє собою нуклеїнову кислоту. Переважно, зазначена фармакологічна ціль являє собою клітину.

У кращому варіанті втілення, катіонний полімер на основі глікогену у відповідності з даним винаходом може бути кон'югований, безпосередньо або через спейсер, із спрямовуючою групою, яка здатна зв'язувати високо специфічним способом ціль, що знаходиться на поверхні клітини, та сприяти абсорбції комплексу у специфічну клітину (наприклад, пухлинні клітини, печінкові клітини, гематопоетичні клітини та подібні).

Спрямовуюча група також може бути використана для спрямування катіонного полімеру у певну частину клітини (наприклад, ядро, мітохондрія та подібні).

Спрямовуючі групи можуть бути вибрані, наприклад, з фолієвої кислоти, моносахаридів, алігосахаридів, пептидів, білків та олігомерів гіалуронової кислоти.

Наступні приклади призначені для ілюстрації даного винаходу, однак, не обмежуючи його будь-яким шляхом.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1

Одержання катіонних полімерів на основі глікогену, що включають одиницю (a)

(i) Синтез катіонних полімерів на основі глікогену, що включають групи, які містять азот

10 г глікогену Polglumyl™ (61,73 ммоль глюкози) розчиняють у 124 мл 1н. NaOH (для синтезу продуктів 1-7, 9-11 та 13-15) або 2н. NaOH (для синтезу продуктів 8, 12 та 16) у двогорлій круглодонній колбі, оснащений магнітною мішалкою та зворотним холодильником. Коли розчинення завершується, суміш нагрівають до 70 °C та перемішують впродовж 2 годин.

В залежності від бажаного продукту, додають один з наступних реагентів (I) - (VI) у кількостях (що виражають як ммоль реагенту), представлених у Таблиці 1:

(I) 2-хлор-N,N-діетилетиламіну гідрохлорид;

(II) 3-хлор-N,N-диметилпропіламіну гідрохлорид;

(III) 2-хлор-N,N-диметилетиламіну гідрохлорид;

(IV) розчин 3-хлор-2-гідроксипропілтриметиламонію хлориду при 60% за масою у H₂O;

(V) 1-(2-хлоретил)піперидин; та

(VI) 4-(2-хлоретил)морфолін.

Суміш перемішують при 70 °С впродовж ночі.

На наступний день, нагрівання зупиняють та суміші дають охолонути до кімнатної температури. Сирий реакційний продукт потім повільно виливають у 400 мл ацетону. Після завершення додавання, отриману суспензію перемішують впродовж приблизно 30 хвилин.

Після зупинення перемішування, суміш залишають осісти до відділення надосадової рідини та одержання осаду.

Надосадову рідину відкидають та отриманий осад промивають двічі ацетоном (200 мл). Отриману таким чином тверду речовину відфільтровують, розчиняють у 200 мл дистильованої води, доводять до нейтрального рН за допомогою 1н. HCl розчину та нарешті піддають діалізу у пробірках з регенованою целюлозою (граничне значення 15000) проти дистильованої води, поки провідність не стане сталою (рівна приблизно 2-3 мкСм, де См - сіменс). Отриманий розчин фільтрують через 0,45 мкм фільтр, концентрують у вакуумі та нарешті сушать сублімацією.

Виходи синтезу зібрані у Таблиці 1 нижче.

Таблиця 1

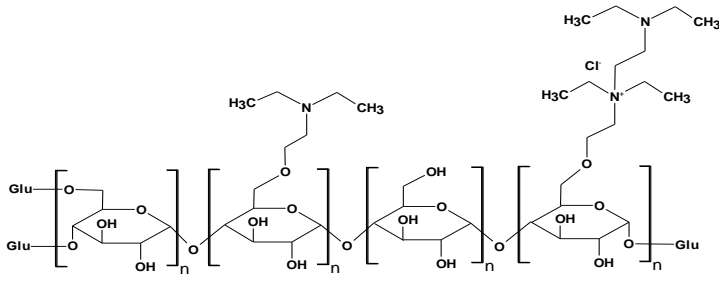
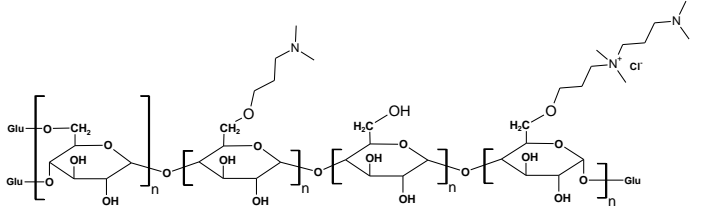
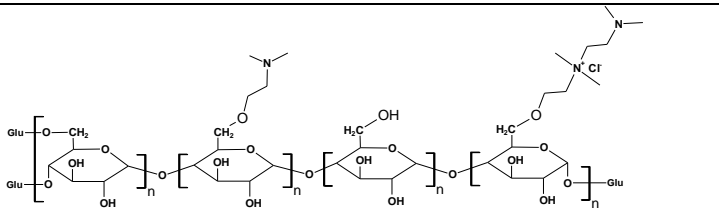
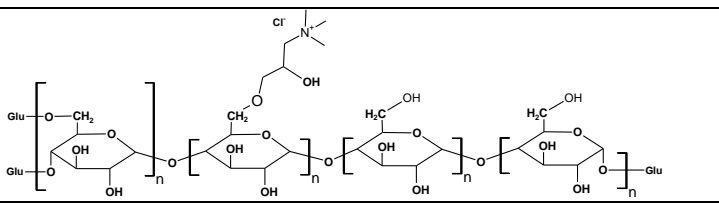
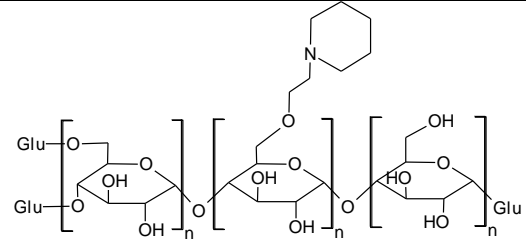
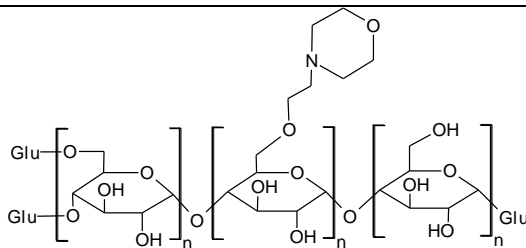
Клас	Полімер №	Реагент	ммоль реагенту	Вихід % (М/М)
Діетиламіноетил (DEAE) глікоген	1	(I)	2,65	82
	2	(I)	15,43	80
	3	(I)	30,87	80
	4	(I)	61,73	82
Диметил-амінопропіл (DMAP) глікоген	5	(II)	15,43	82
	6	(II)	30,87	83
	7	(II)	61,73	80
	8	(II)	123,46	82
Диметил-аміноетил (DMAE) глікоген	9	(III)	15,43	81
	10	(III)	30,87	80
	11	(III)	61,73	83
	12	(III)	123,46	80
2-Гідроксипропіл-триметиламоній (2-ОН-PTMA) глікоген	13	(IV)	15,43	83
	14	(IV)	30,87	84
	15	(IV)	61,73	82
	16	(IV)	123,46	84
гетероциклічна похідна глікогену	40	(V)	30,87	83
	41	(VI)	30,87	80

За допомогою описаного способу отримують катіонні полімери 1-16 та 40-41, що мають структури, проілюстровані у Таблиці 2 нижче.

У представлених структурах, аббревіатура "Glu" означає, що полімерний ланцюг може продовжуватися повторюваними одиницями немодифікованої глюкози або повторюваними одиницями у відповідності з даним винаходом. Крім того, для полегшення візуалізації, відгалуження не представлені та замісники показані тільки у положенні 6 та на різних повторюваних одиницях.

Спеціаліст, кваліфікований у даній галузі техніки, легко зрозуміє, що та сама повторювана одиниця може містити від одного до трьох замісників, які можуть бути однаковими або різними, та що ці замісники можуть бути незалежно присутніми у положеннях 2, 3 та/або 6.

Таблиця 2

Клас	Структурна формула	Полі- мер №	¹ H-ЯМР
(DEAE) Глікоген		1	δ ppm: 1.45-1.75 (CH ₃ мультиплет), 3.2-4.6 (мультиплет), 5.2-6.1 (мультиплет)
		2	δ ppm: 1.25-1.75 (CH ₃ мультиплет), 2.8-4.6 (мультиплет), 5.2-6.1 (мультиплет)
		3	
		4	
(DMAP) Глікоген		5	δ ppm: 2.2-4.5 (мультиплет), 5.2-6.1 (мультиплет Н аномерний)
		7	
		6	δ ppm: 2.2-4.4 (мультиплет), 5.2-6.1 (мультиплет Н аномерний)
		8	
(DMAE) Глікоген		9	δ ppm: 2.5-4.6 (мультиплет), 5.2-6.2 (мультиплет Н аномерний)
		10	
		11	
		12	
(2-ОН-РТМА) Глікоген		13	δ ppm: 3.45-4.5 (мультиплет), 5.25-6.1 (мультиплет Н аномерний)
		14	
		15	
		16	
Гетеро-цикліч-на похідна гліко-гену		40	δ ppm 1.65-2.35 (мультиплет), 2.6-3.15 (мультиплет), 3.55-4.45 (мультиплет), 5.2-6.15 (мультиплет Н аномерний)
		41	δ ppm 2.8-3.1 (мультиплет), 3.6-4.45 (мультиплет), 5.2-6.1 (мультиплет Н аномерний)

(ii) Синтез катіонних полімерів на основі глікогену, що включають групи, які містять азот та карбоксиметильні групи

5 Глікоген Polglumyt™, що містить щонайменше одну карбоксиметильну групу (Глікоген-СМ), був синтезований як описано нижче.

9,57 г (59,07 ммоль глюкози) безводного глікогену Polglumyt™, завчасно висушеного у печі

при 60 °C у вакуумі до сталої маси, поміщають у двогорлу круглодонну колбу, оснащену магнітною мішалкою та під струменем азоту, та розчиняють у 200 мл безводного диметилсульфоксиду. Коли розчинення завершується, гідрид натрію додають у кількостях, показаних у Таблиці 3, та цю суміш перемішують впродовж 1 години при кімнатній температурі. Далі, хлорацетат натрію додають у кількостях, показаних у Таблиці 3, та цю суміш перемішують впродовж ночі при кімнатній температурі.

На наступний день, суміш повільно виливають у ацетон (800 мл) та отриману суспензію перемішують впродовж приблизно 30 хвилин. Отриману тверду речовину відфільтровують, промивають двічі ацетоном (400 мл), знову відфільтровують та розчиняють у дистильованій воді (200 мл). Отриманий розчин піддають діалізу у пробірках з регенованою целюлозою (граничне значення 15000) проти дистильованої води, поки провідність не стане сталою (рівна приблизно 2-3 мкСм). Отриманий розчин фільтрують через 0,45 мкм фільтр, концентрують у вакуумі та нарешті сушать сублімацією.

Ступінь дериватизації (DD), що розуміють як кількість глюкозних молекул, дериватизованих карбоксиметильною групою, на 100 глюкозних мономерів, визначають за допомогою ІЧ спектроскопії, шляхом створення калібрувальної кривої з сумішами, що містять відомий титр глікогену Polglumyl™ та ацетат натрію.

Таблиця 3

Глікоген-СМ	ммоль NaH	ммоль ClCH ₂ COONa	Вихід % (М/М)	DD
100	5,91	6,50	83	1
101	11,82	13,00	80	14
102	17,72	19,49	78	22
103	23,63	25,99	75	32
104	29,54	32,49	74	39

Отриманий таким чином глікоген-СМ використовують у наступних синтезах для одержання катіонних полімерів, що містять азотні групи.

Глікоген-СМ, що містить діетиламіноетильні (DEAE-глікоген-СМ) та 2-гідроксипропілтриметиламонійні (2-ОН-PTMA-глікоген-СМ) групи, синтезують таким чином.

DEAE-глікоген-СМ

1 г продукту 103 розчиняють у 10,8 мл 1н. NaOH у двогорлій круглодонній колбі, оснащений магнітною мішалкою та зворотним холодильником, та нагрівають при 70 °C впродовж 2 годин.

0,929 г 2-хлор-N,N-діетилетиламіну гідрохлориду (5,4 ммоль) додають та цю суміш перемішують впродовж ночі при 70 °C.

На наступний день, нагрівання припиняють та цю суміш залишають охолонути до кімнатної температури. Сирий реакційний продукт потім повільно виливають у 100 мл ацетону. Після закінчення додавання, отриману суспензію перемішують впродовж 30 хвилин.

Отриману тверду речовину відфільтровують, промивають двічі ацетоном (100 мл), розчиняють у 50 мл дистильованої води, доводять до рН 6,5-7 за допомогою 1н. соляної кислоти, та нарешті піддають діалізу у пробірках з регенованою целюлозою (граничне значення 15000) проти дистильованої води поки провідність не стане сталою (рівна приблизно 2-3 мкСм). Отриманий розчин фільтрують через 0,45 мкм фільтр, концентрують у вакуумі та нарешті сушать сублімацією.

Отриманий розчин фільтрують через 0,45 мкм фільтр, концентрують у вакуумі та нарешті сушать сублімацією.

2-ОН-PTMA-глікоген-СМ

2,5 г продукту 103 розчиняють у 27 мл 1н. NaOH у двогорлій круглодонній колбі, оснащений магнітною мішалкою та зворотним холодильником, та нагрівають при 70 °C впродовж 2 годин.

Далі додають розчин 3-хлор-2-гідроксипропілтриметиламоній хлориду (60% за масою у H₂O, = 8,1 ммоль) та цю суміш перемішують при 70 °C впродовж ночі.

На наступний день, нагрівання припиняють та цю суміш залишають охолонути до кімнатної температури. Сирий реакційний продукт потім повільно виливають у 80 мл ацетону.

Отриману тверду речовину відфільтровують, промивають двічі ацетоном (80 мл), розчиняють у 50 мл дистильованої води та піддають діалізу у пробірках з регенованою целюлозою (граничне значення 15000) проти дистильованої води, поки провідність не стане сталою (рівна приблизно 2-3 мкСм). Отриманий розчин фільтрують через 0,45 мкм фільтр, концентрують у вакуумі та нарешті сушать сублімацією.

Катіонні полімери 17 та 19, отримані за допомогою описаних способів, показані у Таблиці 4 нижче.

Для полегшення візуалізації, відгалуження не показані, та замісники показані тільки у положенні 6 та на різних повторюваних одиницях. У представлених структурах, аббревіатура "Glu" означає, що полімерний ланцюг може продовжуватися повторюваними одиницями немодифікованої глюкози або повторюваними одиницями у відповідності з даним винаходом.

Спеціаліст, кваліфікований у даній галузі техніки, легко зрозуміє, що та сама повторювана одиниця може мати від одного до трьох замісників, які можуть бути однаковими або різними, та що ці замісники можуть бути незалежно присутніми у положеннях 2, 3 та/або 6 тієї ж повторюваної одиниці.

Таблиця 4

Клас	Структурна формула	Полімер №	¹ H-ЯМР
DEAE-Глікоген-СМ		17	δ ppm: 1,25-1,75 (мультиплет), 3-4,65 (мультиплет), 5,5-6,15 (мультиплет Н аномерний)
2-ОН-РТМА-Глікоген-СМ		19	δ ppm: 3,4-4,65 (мультиплет), 5,25-6,20 (мультиплет Н аномерний)

Приклад 2

Одержання катіонних полімерів на основі глікогену, що містять одиницю (b)

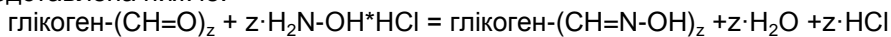
Глікоген Polglumyt™ окислюють перйодатом калію у відповідності з наступним способом.

20 г глікогену Polglumyt™ (123,46 ммоль глюкози) розчиняють у 400 мл дистильованої води у пляшці з темного скла. Перйодат калію додають у кількостях, представлених у Таблиці 5 (виражені у ммоль реагенту) та цю суміш перемішують впродовж 30 хвилин при кімнатній температурі.

Реакцію зупиняють шляхом додавання надлишку етилен-гліколю (26 мл) з безперервним перемішуванням впродовж 2 годин при кімнатній температурі.

Цю суміш піддають діалізу у пробірках з регенованою целюлозою (граничне значення 15000) проти дистильованої води, поки провідність не стане сталою (рівна приблизно 2-3 мкСм). Цю суміш потім фільтрують через 0,45 мкм фільтр та сушать сублімацією.

Далі, ступінь окислення (% окислених глюкозних мономерів) визначають шляхом титрування з 0,1н. NaOH соляної кислоти, що вивільнюється у процесі реакції між гідроксиламіну гідрохлоридом та вільними альдегідними групами, що присутні на різних карбогідратах. Реакція представлена нижче:



Відсоток окислених мономерів визначають за допомогою наступної формули:

$$\text{DD} = \frac{V \times N \times 0.5}{W / 162} \times 100,$$

у якій

V = мл NaOH;

N = нормальність NaOH;

W = мг безводного зразку;

162 = молекулярна маса глюкозної повторюваної одиниці.

Таблиця 5

Окислений глікоген	ммоль KIO ₄	% вихід (М/М)	DD
а. 200	6,17	88	5
201	12,35	87	10
202	24,69	88	18

Окислений глікоген Polglumyt™, отриманий таким чином, вводять у реакцію з одним з реагентів (VII) - (X) нижче, у кількостях (виражених у ммоль реагенту), представлених у Таблиці 6:

(VII) спермін (Fluka, ідентифікаційний номер 85590);

(VIII) тетраетилпентамін (Fluka, ідентифікаційний номер 15652843);

(IX) розчин поліетиленіміну MM 1300 при 50% за масою у воді (Aldrich, ідентифікаційний номер 482595);

(X) розчин поліетиленіміну MM 2000 при 50% за масою у воді (Aldrich, 408700).

Ці похідні синтезують у відповідності з наступним загальним способом.

2 г окисленого глікогену Polglumyt™ розчиняють у 200 мл боратного буферу при pH 8,5 у тригорлій круглодонній колбі, оснащений механічною мішалкою (IKA Labortechnik model). Амін розчиняють у 40 мл боратного буферу, додають повільно до реакційної колби, та цю суміш перемішують механічно при кімнатній температурі.

Через 4 години додають боргідрид натрію (473 мг; 12,5 ммоль) та цю суміш перемішують механічно впродовж ночі при кімнатній температурі.

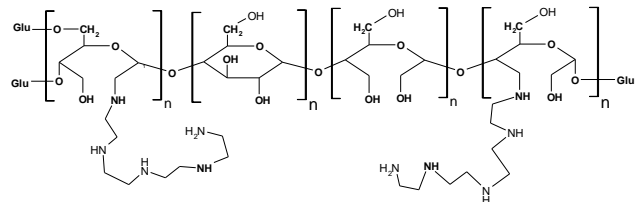
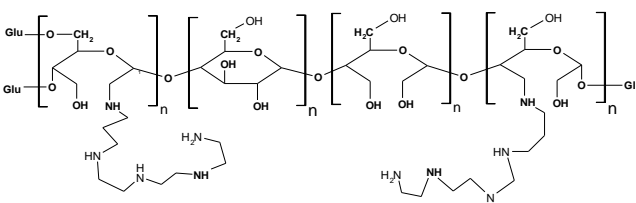
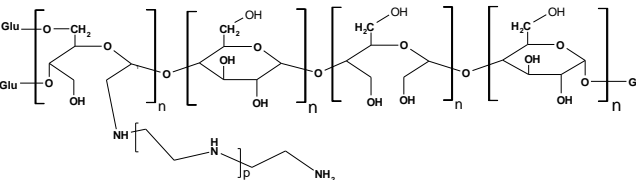
На наступний день, сирий реакційний продукт повільно виливають у 400 мл ацетону та отриману суспензію перемішують впродовж 30 хвилин. Отриману тверду речовину відфільтровують, промивають двічі ацетоном (400 мл), знову відфільтровують та розчиняють у дистильованій воді (100 мл). Цей розчин нейтралізують за допомогою 1н. HCl та піддають діалізу у пробірках з регенованою целюлозою (граничне значення 15000) проти дистильованої води, поки провідність не стане сталою (рівна приблизно 2-3 мкСм). Отриманий розчин фільтрують через 0,45 мкм фільтр та нарешті сушать сублімацією.

Таблиця 6

№	Вихідний окислений глікоген	реагент	ммоль реагенту	% вихід (М/М)
20	200	VII	0,60	69
21	200	IX	0,48	84
22	200	X	0,31	70
23	201	VII	0,60	65
24	201	VIII	0,41	70
25	201	VIII	0,83	44
26	201	IX	0,48	83
27	201	X	0,31	87
28	202	VII	1,20	24
29	202	IX	0,48	95
30	202	IX	0,96	98

Катіонні полімери 20-30, отримані за допомогою описаних способів, показані у Таблиці 7 нижче. У показаних структурах, аббревіатура "Glu" означає, що полімерний ланцюг може продовжуватися повторюваними одиницями немодифікованої глюкози або повторюваними одиницями у відповідності з даним винаходом. Для полегшення візуалізації, відгалуження не показані, та замісники показані на різних повторюваних одиницях.

Таблиця 7

Клас	Структурна формула	Полі- мер №	ІЧ
Окислений глікоген		24	3293 (M), 2926 (W), 1638 (W), 1409 (W), 1359 (W), 1240 (W), 1148 (M), 1078 (M), 1016 (VS), 999 (VS), 930 (M), 848 (M), 759 (M)
		25	3308 (M), 2924 (W), 1639 (W), 1411 (W), 1358 (W), 1243 (W), 1149 (M), 1078 (S), 1016 (VS), 999 (VS), 930 (M), 848 (M), 759 (M)
Окислений глікоген		20	3306 (M), 2925 (W), 1639 (W), 1411 (W), 1361 (W), 1241 (W), 1148 (M), 1078 (S), 995 (VS), 927 (M), 847 (M), 757 (M)
		23	3293 (M), 2926 (W), 1638 (W), 1412 (W), 1359 (W), 1241 (W), 1148 (M), 1078 (S), 1015 (VS), 929 (M), 848 (M), 759 (M)
		28	3292 (M), 2928 (W), 1639 (W), 1415 (W), 1355 (W), 1243 (W), 1148 (M), 1078 (S), 1015 (VS), 929 (M), 848 (M), 758 (M)
Окислений глікоген		21	3228 (M), 2924 (W), 1640 (M), 1412 (W), 1361 (W), 1148 (M), 1079 (S), 1015 (VS), 999 (VS), 930 (M), 848 (M), 759 (M)
		26	3298 (M), 2925 (W), 1638 (W), 1411 (W), 1359 (W), 1148 (M), 1079 (S), 1016 (VS), 999 (VS), 930 (M), 848 (M), 759 (M)
		22	3292 (M), 2921 (W), 1643 (W), 1411 (W), 1360 (W), 1148 (M), 1078 (S), 1015 (VS), 998 (VS), 930 (M), 848 (M), 759 (M)
		27	3299 (M), 2924 (W), 1635 (W), 1412 (W), 1358 (W), 1148 (M), 1079 (S), 1016 (VS), 1000 (VS), 930 (M), 847 (M), 759 (M)
		29	3289 (W), 2924 (W), 2840 (W), 1635 (W), 1411 (W), 1336 (W), 1147 (M), 1079 (S), 1016 (VS), 1000 (VS), 930 (M), 848 (M), 758 (M)

Таблиця 7

Клас	Структурна формула	Полімер №	ІЧ
		30	3276 (M), 2924 (W), 2843 (W), 1634 (W), 1453 (W), 1333 (M), 1146 (M), 1079 (S), 1019 (VS), 1000 (VS), 930 (M), 848 (M), 758 (M)

Приклад 3

Визначення ступеню дериватизації (DD) катіонних полімерів, що містять повторювані одиниці типу (а)

- 5 Ступінь дериватизації, що відноситься до кількості груп, що містять азот, присутній у полімерах, що містять повторювані одиниці (а), розраховують шляхом перетворення амінних груп у відповідний гідрохлорид та шляхом визначення кількості іонів галогену, присутніх або на амінних групах або на четвертинних амонієвих групах.

- 10 Таку ж саму процедуру застосовують до DEAE-декстрану гідрохлориду (комерційний продукт DEAE-декстрану гідрохлорид, Sigma, ідентифікаційний номер D9885), що використовують як порівняльний продукт.

Кількість іонів галогену визначають на сухій масі полімеру, отриманій шляхом вирахування вмісту води, визначеного за допомогою методу Карла Фішера.

- 15 1 г аміної похідної розчиняють у 10 мл дистильованої води. Коли розчинення завершується, додають 10 мл 1н. соляної кислоти та цю суміш перемішують впродовж 30 хвилин. Після завершення перемішування, цю суміш виливають у ацетон (100 мл). Отриману тверду речовину відфільтровують, промивають двічі ацетоном (100 мл) та сушать у печі при 60 °C у вакуумі.

- 20 Кількість іонів галогену виражають як масовий відсоток, тобто як масу іонів галогену на 100 г катіонного полімеру.

Для цілей визначення, кожен атом азоту вважається незалежно заміщеним.

Ступінь дериватизації розраховують у відповідності з рівнянням, представленим нижче.

$$DD = \left[\frac{H.I. \text{ (гідратована маса)} * 100 * MM(\text{гідрохлоридний мономер})}{100 - \%H_2O} \right] / 35,45$$

25

DD = ступінь дериватизації

H.I. = грами атомів галогену на 100 г гідратованого зразку

MM = молекулярна маса мономеру, заміщеного однією алкіламін-гідрохлоридною групою

35,45 = молекулярна маса хлору

- 30 Отримані результати представлені у Таблиці 8 нижче.

Таблиця 8

Полімер №	DD
1	1
2	6
3	12
4	22
5	5
6	6
7	12
8	19
9	4
10	7
11	12
12	14
13	3
14	5

Таблиця 8

Полімер №	DD
15	13
16	15
18(*)	20

(*) порівняльний продукт: DEAE-декстран

Вплив ступеню дериватизації та функціональної групи дослідили як функцію двох оперативних параметрів: (i) тенденція до агрегації, яка повинна бути мінімізована; та (ii) зарядна ємність, яка має бути максимізована.

5 Приклад 4

Вимірювання за методом динамічного розсіювання світла (DLS)

Дослідження за методом динамічного розсіювання світла використовували для вивчення тенденції до агрегації катіонних полімерів.

10 Дослідження за методом динамічного розсіювання світла проводять як описано нижче на катіонних полімерах на основі глікогену Polglumyt™, отриманого як описано у Прикладі 1, та на відповідних комплексах з міРНК (Invitrogen, ідентифікаційний номер постачальника 1299001), отриманих при різних масових відсоткових співвідношеннях міРНК/полімер.

Для досліджень розсіювання світла готують наступні розчини:

- розчин 1: вихідний розчин міРНК 0,1 мг/мл, у PBS, що не містить РНази;
- 15 - розчин 2: вихідний розчин різних катіонних полімерів при концентрації 0,2 мг/мл, у PBS, що не містить РНази, фільтрованому через стерильні 0,22 мкм фільтри;
- розчин 3: розчин PBS, що не містить РНази, фільтрований через стерильні 0,22 мкм фільтри.

20 Абревіатура PBS (фосфат-забуферений сольовий розчин) являє собою стандартний фосфат-забуферений сольовий розчин при рН 7,4, що включає водний сольовий розчин хлориду натрію 8 г/л, фосфату натрію 1,78 г/л, хлориду калію 0,2 г/л та фосфату калію 0,27 г/л.

Зразки, які аналізують, одержують шляхом змішування розчинів 1, 2 та 3 у відповідності із співвідношеннями, представленими у Таблиці 9. Ці зразки потім обробляють впродовж 30 секунд шляхом перемішування та залишають стояти впродовж 30 хвилин, двічі. Після наступної обробки шляхом перемішування впродовж 30 секунд та стояння впродовж 1 години, зразки аналізують за допомогою DLS Zetasizer Nano Malvern, при цьому необхідно приділити увагу обробці розчинів перемішуванням впродовж 5 хвилин перед аналізом.

30 Вимірювання проводять, використовуючи гелієво-неоновий лазер ($\lambda = 632,8$ нм) при 25 °C та при куті розсіювання 173°. Результати обробляють, використовуючи програмне забезпечення Zetasizer.

Таблиця 9

міРНК мг/мл	Полімер мг/мл	Композиція		
		мл розчину 1	мл розчину 2	мл розчину 3
-	0,1	-	0,5	0,5
0,050	0,1	0,5	0,5	-
0,03	0,1	0,3	0,5	0,2
0,02	0,1	0,2	0,5	0,3
0,015	0,1	0,15	0,5	0,35
0,010	0,1	0,10	0,5	0,4
0,005	0,1	0,05	0,5	0,45

Це дослідження забезпечує визначення наступних параметрів:

- 35 1. середній діаметр (Z) катіонних похідних глікогену Polglumyt™, що не містить міРНК (результати зібрані у Таблиці 10);
- 2. аспектне співвідношення наночасток (результати зібрані у Таблиці 10); та
- 3. максимальне масове відсоткове співвідношення міРНК по відношенню до маси полімеру, для якого не спостерігається ніяких явищ агрегації (результати зібрані у Таблиці 10).

Таблиця 10

Полімер №	(1) Середній діаметр (Z) (нм)	(2) Аспектне співвідношення	(3) Співвідношення % міРНК/полімер (мас./мас.) без утворення агрегатів
1	37	1,2	10
2	37	0,8	50
3	38	0,9	15
4	41	0,8	20
5	35	0,9	50
6	36	0,8	10
7	38	0,9	10
8	38	0,9	15
9	35	1,1	50
10	36	0,8	50
11	37	0,8	50
12	40	0,9	15
13	36	0,8	50
14	37	0,9	50
15	41	0,8	10
16	41	0,9	15
17	35	1,0	50
18(*)	76	4,5	20

(*)порівняльний продукт: DEAE-декстран

(1) Середній діаметр (Z)

Як може бути видно з Таблиці 10, усі похідні мають середній діаметр (Z) менше, ніж 100 нм.

5 Переважно, та на відміну від DEAE-декстрану, катіонні похідні у відповідності з даним винаходом утворюють наночастки із середнім діаметром (Z) менше, ніж 70 нм.

(2) Аспектне співвідношення

Аспектне співвідношення являє собою ширину на середній висоті піку розподілу розмірів часток, що нормалізують середнім діаметром та, таким чином, описує форму піку розподілу розмірів.

10 Як може бути видно, усі катіонні полімери у відповідності з даним винаходом мають розподіли розмірів із аспектним співвідношенням від 0,8 до 1,1, на відміну від DEAE-декстрану, який показав розподіл розмірів із аспектним співвідношенням рівний 4,5.

15 Це показує, що, використовуючи той же метод синтезу, катіонні полімери на основі глікогену у відповідності з даним винаходом дають можливість одержати наночастки контрольованих розмірів у межах інтервалу розмірів, близького до середнього значення.

(3) Максимальне масове відсоткове співвідношення міРНК/полімер, для якого не спостерігається ніякої агрегації

20 Результати показують, що катіонні полімери, що включають усі замісники у відповідності з даним винаходом, утворюють комплекси без агрегатів аж до 50 % за масою міРНК, як функція ступеню дериватизації.

Полімер 18 (DEAE-декстран) утворює комплекси без агрегатів тільки до 20 % за масою міРНК.

Приклад 5

Визначення ємкості заряду

25 Ємкість заряду визначають для серій похідних, що містять повторювані одиниці (а) та (b), шляхом електрофорезу у гелі.

Комплекси одержують у відповідності з наступним способом.

30 Комплекси між міРНК та різними полімерними похідними одержують, використовуючи різні співвідношення міРНК/полімер (мас. %).

35 Полімерні розчини при різних концентраціях, описані у Таблицях 11 та 12, змішують у PBS, що не містить РНази, профільтованому через 0,2 мкм фільтр, з розчином міРНК (Invitrogen, ідентифікаційний номер 1299001) при 0,340 мг/мл у воді, що не містить РНази. Далі, ці суміші обробляють шляхом перемішування впродовж приблизно 30 секунд, залишають стояти впродовж 15 хвилин при кімнатній температурі, обробляють знову шляхом перемішування впродовж 30 секунд, та, після стояння впродовж приблизно 30 хвилин, піддають електрофорезу

у гелі.

Гелі обробляють шляхом завантаження 10 мкл розчину кожного комплексу на 4 % агарозний гель, що має 1:200 000 співвідношення Green Gel Plus™ Nucleic Acid Stain 20000X, отриманий у MOPS-EDTA-натрій ацетатному буфері.

5 Агарозні гелі піддають електрофорезу впродовж однієї години при постійній напрузі 80 В. Зображення отримують за допомогою системи ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

Отримані гелі показані на Фігурах 1-8.

10 Комплекси між полімером 3 (DEAE-глікоген) та міРНК отримують, використовуючи полімерні розчини та міРНК, з кількостями, даними у Таблиці 11 нижче. Полімер 3 завантажують 0,5 % до 800 % за масою міРНК.

Гелі, на яких комплекси між полімером 3 та міРНК розподіляють та які далі піддають електрофорезу, показані на фігурах, представлених Таблиці 11.

Таблиця 11

мг/мл полімеру	мг/мл міРНК	% міРНК (мас./мас.)	Фігура
20	0,1	0,5	1
10	0,1	1	1
5	0,1	2	1
2,5	0,1	4	1
1,25	0,1	8	1
1	0,1	10	2
0,66	0,1	15	2
0,5	0,1	20	2
0,333	0,1	30	3
0,2	0,1	50	3
0,1	0,1	100	3
0,05	0,1	200	3
0,025	0,1	400	3
0,0125	0,1	800	3

15 Немодифікований глікоген Polglumyt™ (50*) використовують як порівняльний:

Полімер	мг/мл полімеру	мг/мл міРНК	% міРНК (мас./мас.)	Фігура
50 (*)	1	0,1	10	2
	0,0125	0,1	800	2

20 На Фігурі 1 може бути видно, у стовпчиках полімеру 3, закомплексованого з міРНК при відсотковому вмісті від 0,5 % до 8 % за масою, біла смуга, що відповідає тільки міРНК, не присутня. Відсутність смуги показує, що полімер 3 здатен повністю комплексувати міРНК від 0,5 % до 8 % за масою по відношенню до маси полімеру.

25 На Фігурі 2, відсутність смуги, що відповідає міРНК, у стовпчиках полімеру 3, закомплексованого з міРНК, показує, що полімер 3 здатен повністю закомплексувати міРНК у відсотковому вмісті від 10 % до 20 % за масою по відношенню до маси полімеру. Присутність смуги, що відповідає міРНК, у стовпчиках полімеру 50 (немодифікований глікоген Polglumyt™) показує, що немодифікований глікоген Polglumyt™ є нездатним закомплексувати міРНК навіть при відсотковому вмісті, рівному 10 % за масою по відношенню до маси полімеру.

30 На Фігурі 3, відсутність смуги, що відповідає міРНК, у стовпчиках полімеру 3, закомплексованого з 30 % міРНК, показує, що полімер 3 здатен повністю закомплексувати 30 % за масою міРНК по відношенню до загальної маси полімеру. Навпаки, присутність смуги, що відповідає міРНК, при відсотковому вмісті від 50 % до 800 %, показує, що полімер 3 є нездатним закомплексувати 50 % за масою міРНК по відношенню до загальної маси полімеру.

35 Ці дослідження, таким чином, демонструють, що максимальна завантажувальна ємкість полімеру 3 становить 30 % за масою міРНК. Навпаки, немодифікований глікоген Polglumyt™ (полімер 50) є нездатним закомплексувати міРНК.

Крім того, комплекси полімер-міРНК одержують, використовуючи наступні полімери:

- № 1, 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, що містять повторювану одиницю (a);

- № 20, 21, 23, 24, 25, 28, що містять повторювану одиницю (b);

40 Використовують два міРНК завантажувальні відсоткові вмісти: 5 % та 20 % по відношенню до маси полімеру. Використовувані розчини зібрані у Таблиці 12 нижче.

Таблиця 12

Полімер	мг/мл полімеру	мг/мл міРНК	Фігура
1	2	0,1	4
	0,5	0,1	4
2	2	0,1	4
	0,5	0,1	4
6	2	0,1	4
	0,5	0,1	4
8	2	0,1	6
	0,5	0,1	6
10	2	0,1	5
	0,5	0,1	5
12	2	0,1	6
	0,5	0,1	6
14	2	0,1	5
	0,5	0,1	5
16	2	0,1	6
	0,5	0,1	6
20	2	0,1	8
	0,5	0,1	8
21	2	0,1	7
	0,5	0,1	7
23	2	0,1	8
	0,5	0,1	8
24	2	0,1	7
	0,5	0,1	7
25	2	0,1	7
	0,5	0,1	7
28	2	0,1	8
	0,5	0,1	8

На Фігурі 4 присутність смуги, що відповідає міРНК у стовпчиках полімеру 1, закомплексованого, відповідно, з 5 % та 20 % за масою міРНК, показує, що полімер 1 (DEAE-Polglumyt з низьким ступенем дериватизації) є нездатним закомплексувати міРНК. Полімер 2 здатен закомплексувати міРНК при відсотковому вмісті 5 % за масою по відношенню до загальної маси полімеру, та полімер 6 також здатен закомплексувати 20 % за масою міРНК по відношенню до загальної маси полімеру.

На Фігурі 5 присутність смуги, що відповідає міРНК, у стовпчиках полімерів 10 та 14, закомплексованих з 20 % за масою міРНК, показує, що ці полімери здатні закомплексувати 5 % за масою міРНК. Навпаки, полімер 15 здатен закомплексувати 20 % за масою міРНК.

На Фігурі 6 відсутність смуги, що відповідає міРНК, показує, що полімери 8, 12 та 16 здатні закомплексувати 20 % за масою міРНК.

На Фігурі 7 присутність смуги, що відповідає міРНК, у стовпчиках полімерів 24 та 25 показує, що ці полімери є нездатними закомплексувати 5 % міРНК. Навпаки, полімер 21 також закомплексував 20 % міРНК.

На Фігурі 8 присутність смуги, що відповідає міРНК, у стовпчиках полімерів 23 та 20, закомплексованих з 20 % міРНК, показує, що ці полімери закомплексували 5 % міРНК. Навпаки, полімер 28 комплексував 20 % міРНК.

Загалом, таким чином, ці дослідження дають можливість показати, що тільки полімери 1 (DEAE-глікоген з найнижчим ступенем дериватизації), 24 та 25 здатні закомплексувати менше, ніж 5 % за масою міРНК.

Усі інші похідні здатні закомплексувати 20 % міРНК, як порівняльний полімер 18 (DEAE-декстран). Навпаки, полімер 50 (немодифікований глікоген Polglumyt™) є нездатним утворювати комплекси з міРНК.

Приклад 6

Дослідження цитотоксичності з катіонними похідними глікогену Polglumyt™

Дослідження цитотоксичності проводили на (DEAE)-глікогені (полімери 1-4), (DMAP)-

глікогені (полімери 5-8), (DMAE)-глікогені (полімери 9-12), (2-OH-PTMA)-глікогені (полімери 13-16), на немодифікованому глікогені Polglumyt™ (полімер 50), на DEAE-декстрану гідрохлориді (полімер 18) та на іншому стандартному полімері, який був широко досліджений щодо доставки нуклеїнових кислот, розгалуженого поліетиленіміну (PEI) (Aldrich, ідентифікаційний № 40872-7) (полімер 60).

(а) Дослідження на катіонних полімерах у відповідності з даним винаходом

- Одержання катіонних полімерів

Катіонні полімери розчиняють у воді та відповідним чином розбавляють у клітинному культуральному середовищі з одержанням кінцевих концентрацій $10 \cdot 10^{-5}$ мг/мл, що через 24, 48 та 72 год використовують для оцінювання цитотоксичності на двох клітинних лініях: MonoMac-6 та HT29.

- MonoMac-6 клітинна лінія

Людська моноцит/макрофаг клітинна лінія MonoMac-6 люб'язно надана Prof. Mantovani (Humanitas, Italy).

Клітини тримають у інкубаторі при 37 °C з 5 % CO₂, у RPMI 1640 середовищі, доповненому 10 % фетальною телячою сироваткою (FCS), 2 % L-глутаміном, 1 % розчину пеніцилін/стрептоміцин, 1 % неесенціальних амінокислот, 1 % 100 мМ пірувату натрію та 1 % щавлево-оцтової кислоти.

Клітини, які ростуть у суспензії, підтримують у культурі шляхом пересіювань, що проводять із щотижневою частотою, шляхом 1:4 розведень клітинної культури у новому свіжому повному середовищі.

- HT-29 клітинна лінія

Людські клітини аденокарциноми кишечника HT-29, отримані з Американської колекції клітинних культур (ATCC Maryland, USA), підтримують у модифікованому Дульбекко середовищі Ігла (DMEM високо глюкозне pH 7,4), доповненому 10 % фетальною телячою сироваткою (FCS), 2 % L-глутаміну, 1 % розчину пеніцилін/стрептоміцин, 1 % неесенціальних амінокислот, 1 % 100 мМ пірувату натрію та 2 % 1M HEPES розчину.

Клітини, які ростуть у суспензії, підтримують у культурі шляхом проведення пересіювань із щотижневою частотою, висіюючи 300000 клітин на колбу, перед обробкою сумішшю трипсин/EDTA для відділення клітин від моношару.

- Дослідження цитотоксичності

Mono Mac-6 та HT-29 клітини, що розміщують у 96-лункових планшетах (10000 клітин/лунку) за 24 год до експерименту, інкубують з катіонними похідними при різних концентраціях впродовж 24, 48 та 72 год.

Наприкінці обробки тестовими сполуками, життєздатність клітин визначають як функцію вироблення аденозин трифосфату (АТФ), використовуючи набір ATPlite (Perkin-Elmer).

ATPlite дослідження основане на виробленні флуоресценції, що утворюється в результаті реакції АТФ, присутнього у клітинах, з люциферазою та d-люцеферином, що додають до лунок перед зчитуванням. Інтенсивність флуоресценції, що виробляється, прямо пропорційна концентрації АТФ, присутнього у зразку, та вимірюється, використовуючи люмінометр (VICTOR-3 Wallac).

Перед проведенням люмінометричного вимірювання, 50 мкл лізисного розчину (Triton X-100 0,5 % у 0,2н. NaOH) у 100 мкл культурального середовища додають до кожної лунки. Через 5 хвилин інкубування при кімнатній температурі та з перемішуванням при 700 об./хвил., 50 мкл набору ATPlite додають до кожної лунки та, після перемішування впродовж 5 хвилин, планшет інкубують впродовж додаткових 10 хвилин у темноті, перед проведенням люмінометричного вимірювання.

Для кожної похідної експерименти проводять у двох повторях.

Відсоток життєздатності клітин визначають, беручи середнє значень флуоресценції для оброблених клітин та середнє значень флуоресценції для необроблених контрольних клітин.

Відсоток життєздатності клітин (% CV) для кожної похідної виражають як середній відсоток відносно контролю у відповідності до наступного рівняння:

$$\text{Життєздатність (\%)} = \frac{\text{Середня інтенсивність флуоресценції оброблених клітин}}{\text{Середня інтенсивність флуоресценції необроблених клітин}} \times 100$$

Сполука вважається цитотоксичною, якщо відсоток життєздатних клітин становить менше ніж 50 %.

Таблиця 13

Концентрація катіонних полімерів 0,01 мг/мл

Полімер №	МоноМас-6 клітинна лінія (у суспензії)			HT29 клітинна лінія (адгезивна)		
	CV (%)			CV (%)		
	24 год	48 год	72 год	24 год	48 год	72 год
1	111	97	114	115	78	143
2	112	61	136	136	107	136
3	115	208	65	96	131	160
4	108	217	60	86	118	140
5	100	176	56	113	107	165
6	109	132	124	111	138	158
7	104	80	105	317	92	95
8	-	-	-	103	61	92
9	111	143	129	101	120	156
10	110	144	80	103	143	162
11	125	110	129	323	101	97
12	-	-	-	127	72	86
13	135	121	136	301	95	90
14	108	71	81	305	92	91
15	126	115	161	227	92	68
16	-	-	-	131	83	79
17	107	137	134	106	123	131
18(*)	97	74	109	97	73	105
50(*)	105	105	120	97	128	158
60(*)	-	-	-	93	114	52

(*) полімери, використовувані для порівняння:

18=DEAE декстран;

50 = немодифікований глікоген Polglumyt™;

60 = поліетиленімін (PEI).

Результати у Таблиці 13 дають можливість показати, що катіонні полімери у відповідності з даним винаходом є нетоксичними при концентрації 0,01 мг/мл.

Таблиця 14

Концентрація катіонних полімерів 0,1 мг/мл

Полімер №	МоноМас-6 клітинна лінія (у суспензії)			HT29 клітинна лінія (адгезивна)		
	CV (%)			CV (%)		
	24 год	48 год	72 год	24 год	48 год	72 год
1	108	86	61	101	96	132
2	105	152	167	116	110	169
3	107	182	100	102	127	140
4	105	165	66	104	122	131
5	107	182	87	85	147	152
6	102	151	107	102	110	147
7	99	54	95	342	81	102
8	-	-	-	114	149	92
9	109	182	128	106	118	168
10	111	152	82	95	156	150
11	107	82	142	367	105	110
12	-	-	-	131	91	92
13	121	123	121	346	92	104
14	106	81	123	381	114	114
15	125	109	149	326	113	98

Таблиця 14

Концентрація катіонних полімерів 0,1 мг/мл

Полімер №	МоноМас-6 клітинна лінія (у суспензії)			HT29 клітинна лінія (адгезивна)		
	CV (%)			CV (%)		
	24 год	48 год	72 год	24 год	48 год	72 год
16	-	-	-	131	159	150
17	110	124	138	109	120	152
18(*)	10	24	16	60	41	45
50(*)	105	167	108	97	125	158
60(*)	-	-	-	7	6	3

(*) полімери, використовували для порівняння:

18=DEAE декстран;

50 = Немодифікований глікоген Polglumyt™;

60=PEI.

Результати у Таблиці 14 дають можливість показати, що катіонні полімери у відповідності з даним винаходом є нетоксичними при концентрації 0,1 мг/мл, на відміну від DEAE-декстрану та PEI.

5

Таблиця 15

Концентрація катіонних полімерів 1,0 мг/мл

Полімер №	МоноМас-6 клітинна лінія (у суспензії)			HT29 клітинна лінія (адгезивна)		
	CV (%)			CV (%)		
	24 год	48 год	72 год	24 год	48 год	72 год
1	91	70	76	89	133	109
2	117	118	153	95	121	145
3	88	115	32	112	126	133
4	55	81	50	84	115	108
5	88	175	45	79	127	159
6	102	132	89	103	130	149
7	41	16	12	280	82	84
8	-	-	-	74	113	86
9	115	132	103	99	127	163
10	99	136	55	131	143	155
11	113	78	136	371	110	111
12	-	-	-	108	169	135
13	97	169	63	329	111	99
14	107	75	131	373	104	112
15	140	101	105	333	110	100
16	-	-	-	107	165	125
17	98	138	138	95	134	128
18(*)	13	14	12	49	29	18
50(*)	98	158	69	98	115	157
60(*)	-	-	-	3	6	2

(*) полімери, використовували для порівняння:

18=DEAE декстран;

50 = Немодифікований глікоген Polglumyt™;

60=PEI

Результати у Таблиці 15 дають можливість показати, що катіонні полімери у відповідності з даним винаходом, за винятком полімеру 7, є нетоксичними при концентрації 1 мг/мл, на відміну від DEAE-декстрану та PEI. Доведено, що похідна 7 є токсичною тільки на клітинній культурі у суспензії.

10

Таблиця 16

Концентрація катіонних полімерів 10,0 мг/мл

Полімер №	HT29 клітинна лінія (адгезивна)		
	CV (%)		
	24 години	48 годин	72 години
1	112	156	164
2	97	130	177
3	78	104	128
4	63	82	71
5	106	130	174
6	101	132	170
7	277	76	83
8	43	77	56
9	104	135	165
10	52	120	172
11	362	116	108
12	93	166	115
13	379	116	113
14	361	123	108
15	308	110	92
16	79	146	95
17	97	129	176
18(*)	49	27	28
50(*)	89	135	151
60(*)	2	2	1

(*) полімери, використовувані для порівняння:

18=DEAE декстран;

50 = Немодифікований глікоген Polglumyt™;

60=PEI.

Результати у Таблиці 16 дають можливість показати, що катіонні полімери у відповідності з даним винаходом є нетоксичними при концентрації 10 мг/мл, на відміну від DEAE-декстрану та PEI.

(b) Дослідження на флуоресцентних похідних катіонних полімерів у відповідності з даним винаходом

Дослідження цитотоксичності також проводять, використовуючи флуоресцентні похідні катіонних полімерів у відповідності з даним винаходом, з метою визначення найвищої нецитотоксичної концентрації, при якій необхідно проводити дослідження поглинання клітиною певних речовин.

Флуоресцентні похідні катіонних полімерів у відповідності з даним винаходом синтезують за наступним способом.

500 мг одного з катіонних полімерів у відповідності з даним винаходом розчиняють, за відсутності світла, у 10 мл дистильованої води у двогорлій круглдонній колбі, оснащений магнітною мішалкою. Додають 2 мл 1н. NaOH та цю суміш перемішують при кімнатній температурі впродовж 1,5 год. Далі, додають 36 мг флуоресцин-ізотіоціанату (FITC), розчиненого у приблизно 0,3 мл ДМСО. Цю суміш перемішують при кімнатній температурі впродовж ночі.

На наступний день, 20 мл ацетону виливають у реакційну колбу та, після перемішування впродовж приблизно 30 хвилин, полімер залишають осаджуватися. Надосадову рідину відкидають та осад промивають двічі за допомогою приблизно 20 мл ацетону.

Потім осад розчиняють у приблизно 10 мл дистильованої води та цей розчин піддають діалізу у пробірках з регенованою целюлозою (граничне значення 15000) проти дистильованої води, за відсутності світла. Після закінчення діалізу, розчин фільтрують через 0,45 мкм фільтр та сушать сублімацією.

Ці дослідження проводять на HT29 адгезивних клітинах, отриманих як описано вище.

Результати підсумовані у Таблиці 17 нижче, де флуоресцентні похідні катіонних полімерів у відповідності з даним винаходом представлені з тією ж нумерацією, що і у Таблиці 2, з додаванням "f".

Таблиця 17

	Конц. 0,01 мг/мл			Конц. 0,1 мг/мл			Конц. 1 мг/мл			Конц. 10 мг/мл		
№	24год	48год	72год	24год	48год	72год	24год	48год	72год	24год	48год	72год
1f	119	142	115	111	116	125	106	108	131	97	116	125
2f	102	159	133	101	112	83	100	115	119	77	100	89
3f	92	123	102	71	84	107	75	90	105	53	74	61
4f	69	86	94	79	59	78	56	31	71	36	32	34
5f	114	100	133	98	94	134	107	106	116	105	78	106
6f	105	90	118	101	154	91	98	92	116	98	72	75
7f	94	128	114	102	120	112	73	72	88	59	52	40
8f	103	61	92	114	149	92	74	113	86	43	77	56
9f	92	67	69	89	83	37	72	71	36	77	57	33
10f	95	151	114	93	119	82	94	120	75	56	79	35
11f	111	105	147	100	90	144	75	75	123	81	50	94
12f	127	72	86	131	91	92	108	169	135	93	166	115
13f	93	100	96	97	122	75	110	90	104	63	70	47
14f	102	94	103	102	119	137	103	78	156	74	65	101
15f	93	81	137	81	105	150	77	87	122	69	59	88
16f	131	83	79	131	159	150	107	165	125	79	146	95
18f(*)	15	10	11	20	7	13	17	12	6	20	8	10

(*)порівняльний продукт:

18f = флуоресцентна похідна DEAE-декстрану

5

З отриманих результатів видно, що найвища концентрація, при якій всі флуоресцентні похідні катіонних полімерів у відповідності з даним винаходом є нецитотоксичними, протягом 24-годинного періоду, становить 1 мг/мл. Навпаки, флуоресцентна похідна DEAE-декстрану є високо цитотоксичною при всіх проаналізованих концентраціях.

10

Приклад 7

Дослідження поглинання клітиною речовин

Дослідження поглинання клітиною речовин проводять у 2, 6 та 24 год, використовуючи флуоресцентні похідні катіонних полімерів даного винаходу (1f-16f) та DEAE-декстрану гідрохлориду, при концентрації 1 мг/мл, тобто найвищій концентрації, виявленій у дослідженні на цитотоксичність, при якій флуоресцентні похідні 1f-16f є не цитотоксичними впродовж 24-годинного періоду.

15

Дослідження проводять, використовуючи HT29 адгезивні клітини, оброблені у відповідності до наступної процедури.

20

HT-29 клітини, розподілені по планшету за день до експерименту при щільності 20000 клітин/лунку, інкубують з відповідними флуоресцентними похідними при концентрації 1 мг/мл впродовж 2, 6 та 24 год. Наприкінці кожного інкубаційного періоду, середовище видаляють з лунок та клітини промивають стандартним рН 7,4 фосфат-забуферним сольовим розчином (PBS) три рази.

25

Далі, клітини обробляють за допомогою 200 мкл лізисного розчину (Triton X-100 0,5 % у 0,2н. NaOH) та флуоресценцію вимірюють за допомогою флуорометрії (λ збудж. 485 нм; λ випром. 535 нм).

Для кожної сполуки та для кожного часу розраховують середню флуоресценцію двох повторів, де ці значення представлені у Таблиці 18.

Таблиця 18

Полімер №	Інтенсивність флуоресценції		
	2 години	6 годин	24 години
1f	1696	1372	744
2f	5567	6327	7217
3f	17531	24101	30573
4f	70210	63668	120662
5f	4845	4365	3274
6f	6842	8306	7651
7f	26268	36314	52612
8f	19638	34463	58024
9f	2386	2991	2487
10f	3122	4318	3177
11f	10866	12491	8906
12f	14020	21569	37090
13f	937	1736	1008
14f	4599	7724	4190
15f	13319	22623	30889
16f	23560	48650	56919
18f(*)	15227	13689	12626
контроль	833	1152	349

Ефективну кількість поглинання клітиною флуоресцентних похідних розраховують шляхом побудови калібрувальної кривої для кожної флуоресцентної похідної у розчиннику для клітинного лізису (Triton X-100 при 0,5 % у 0,2н. NaOH).

5

З калібрувальних кривих та з інтенсивностей флуоресценції, що спостерігаються, розраховують кількість у мг/мл поглинання клітиною, як описано у Таблиці 19.

Таблиця 19

Полімер №	Концентрація мг/мл		
	2 год	6 год	24 год
2f	0,006	0,006	0,007
3f	0,008	0,014	0,021
4f	0,019	0,017	0,036
5f	0,002	0,001	0,000
6f	0,002	0,003	0,002
7f	0,026	0,036	0,053
8f	0,005	0,012	0,024
11f	0,002	0,003	0,001
12f	0,004	0,008	0,016
14f	0,006	0,009	0,005
15f	0,004	0,014	0,022
16f	0,008	0,020	0,025
18f(*)	0,002	0,002	0,001

(*) флуоресцентний DEAE-декстран

10 Отримані результати показують ступінь поглинання клітиною катіонних полімерів у відповідності з даним винаходом відносно DEAE-декстрану.

Більше того, зауважено, що ступінь дериватизації має прямо пропорційний вплив на поглинання клітиною речовин.

Приклад 8

15 Оцінювання буферної ємності

Буферну ємність оцінюють для того, щоб перевірити, що катіонні полімери у відповідності з даним винаходом будуть мати такі характеристики, завдяки яким вони також будуть спричиняти "протон-поглинальний" ефект, який вважається необхідним для забезпечення вивільнення

комплексу полімер-нуклеїнова кислота з ендосом, після клітинної абсорбції.

Катіонні полімери у відповідності з даним винаходом (DEAE-глікоген) та DEAE-декстран титрують після перетворення у гідрохлорид (як описано у Прикладі 2) за допомогою NaOH, при цьому титрування контролюють шляхом визначення зміни pH.

5 100 мг гідрохлориду полімеру розчиняють у 100 мл дистильованої води, цей розчин перемішують впродовж ночі при кімнатній температурі. На наступний день, цей розчин титрують за допомогою 0,01 н. NaOH, додавання титранту проводять з дозатором та титрування контролюють за допомогою pH-метру.

10 Титраційні дослідження, що проводять на катіонних похідних у відповідності з даним винаходом, дають можливість визначити pK_a розподілення нижче та при приблизно фізіологічному pH у інтервалі приблизно 4,5-8, що забезпечує катіонні полімери даного винаходу високою буферною ємністю.

15 pK_a значення при приблизно фізіологічному pH є корисними для надання катіонним полімерам даного винаходу позитивного заряду, необхідного для комплексування нуклеїнових кислот.

pK_a значення нижче фізіологічного pH є корисними для забезпечення вивільнення комплексів з ендосом у цитоплазму (за допомогою "протон-поглинального" ефекту).

20 На Фігурі 9 показані титраційні криві для катіонних полімерів 2, 3 та 4 (DEAE-глікоген, у відповідності з даним винаходом) для порівняльних цілей. Можна зауважити, що у межах одного класу похідних, буферна ємність збільшується, коли збільшується ступінь дериватизації.

Крім того, виявлено, що полімер 4 (DEAE-глікоген) та продукт 18 (DEAE-декстран) мають однаковий ступінь дериватизації та аналогічну буферну ємність, як показано на Фігурі 10.

Приклад 9

Реологічні вимірювання

25 Реологічні дослідження проводять на катіонних похідних 1-16 у відповідності з даним винаходом (DEAE-, DMAP-, DMAE-, 2-ОН-PTMA-глікоген) та на гідрохлориді DEAE-декстрану, при концентрації 1 % у PBS.

30 Вимірювання проводять, використовуючи роторний реометр Bohlin Gemini 150, що керується програмним забезпеченням Bohlin R6 40.5.32, оснащений конічним реометром 2°/55 мм, що термостатично підтримується приладом Peltier Bohlin при 25 °C та що використовують у режимі "регульованої напруги зсуву" у інтервалі напруги зсуву 1-5 Па.

Усі проаналізовані зразки показують дуже низьке значення в'язкості, порядку мПа·с. Ця характеристика дає можливість використовувати катіонні похідні у відповідності з даним винаходом також шляхом ін'єкції.

35 Як Приклад, у Таблиці 20 представлені значення в'язкості різних похідних при однаковому значенні напруги (2,5 Па).

Таблиця 20

Полімер №	В'язкість при 2,5 Па (Па·с)
1	$1,97 \times 10^{-3}$
2	$1,91 \times 10^{-3}$
3	$1,91 \times 10^{-3}$
4	$1,95 \times 10^{-3}$
5	$1,97 \times 10^{-3}$
6	$1,95 \times 10^{-3}$
7	$1,91 \times 10^{-3}$
8	$1,96 \times 10^{-3}$
9	$1,87 \times 10^{-3}$
10	$1,96 \times 10^{-3}$
11	$1,92 \times 10^{-3}$
12	$1,91 \times 10^{-3}$
13	$1,93 \times 10^{-3}$
14	$1,94 \times 10^{-3}$
15	$1,93 \times 10^{-3}$
16	$1,98 \times 10^{-3}$
18(*)	$2,36 \times 10^{-3}$

(*) порівняльний продукт: DEAE-декстран

Приклад 10

Дослідження цитотоксичності з катіонними похідними глікогену, закомплексованими з аніонними молекулами

5 НТ-29 клітини розподіляють по планшету за день до експерименту при щільності 10000 клітин/лунку у об'ємі 100 мкл DMEM середовища, що містить 10 % сироватки.

10 У день експерименту, середовище видаляють з лунок та додають 150 мкл DMEM середовища, що містить 2,5 % сироватки. Потім додають 50 мкл комплексів, утворених з катіонного полімеру у відповідності з даним винаходом та флуоресцентним міРНК. Ці комплекси, утворені з катіонного полімеру у відповідності з даним винаходом та флуоресцентного міРНК, одержують у відповідності з наступною процедурою.

15 Готують чотири розчини, кожен з яких містить 6,283 мг катіонного полімеру 3, 7, 11 та 15 у 40 мл PBS, що не містить РНази. До 142,86 мкл кожного з цих розчинів додають 6,6 мкл розчину міРНК у PBS, що не містить РНази, (концентрація 20 мкМ) та, через декілька хвилин, кожен розбавляють за допомогою 350,54 мкл PBS, що не містить РНази. Кінцева концентрація міРНК у розчинах становить 264 нМ, що еквівалентно 10 % за масою міРНК відносно маси полімеру.

Отримані таким чином розчини перемішують впродовж приблизно 30 секунд, інкубують при кімнатній температурі впродовж 10 хвилин, перемішують знову впродовж 30 секунд та залишають стояти впродовж 5 хвилин. Перед здійсненням експерименту, ці розчини перемішують знову впродовж 30 секунд.

20 Розчини (50 мкл) катіонних полімерів 3, 7, 11 та 15 у 40 мл PBS, що не містить РНази, до яких не додають міРНК, використовують як перший контрольний зразок.

25 Комплекс між міРНК та трансфекційним реагентом Lipofectamine® 2000, отриманий у відповідності з процедурою, описаною виробником Life-technologies™ для трансфекції міРНК, та що містить таку ж кількість міРНК, що і використана у комплексах з полімерами, використовують як другий контрольний зразок.

Трансфекційний реагент Lipofectamine® 2000, до якого не додають міРНК, використовують як третій контрольний зразок.

Комплекси та всі контрольні матеріали, отримані як описано вище, приводять у контакт з клітинами.

30 Ці клітини інкубують впродовж 4 та 24 год при 37 °С, після чого надосадову рідину видаляють та додають 100 мкл середовища, що містить 2,5 % сироватки.

Наприкінці обробки тестовими сполуками, життєздатність клітин визначають як функцію вироблення аденозин-трифосфату (АТФ), використовуючи набір ATPlite (Perkin-Elmer), як описано у прикладі 6 у цьому описі вище.

35 Результати, отримані як описано у Прикладі 6, виражають як відсоток живих клітин у Таблиці 21 нижче.

Таблиця 21

Полімер №	Життєздатність клітин CV (%)	
	4 год	24 год
3 + міРНК	58	100
7 + міРНК	89	85
11 + міРНК	91	70
15 + міРНК	101	59
Перший контрольний зразок		
3	92	105
7	90	99
11	85	85
15	86	72
Другий контрольний зразок		
Lipofectamine® 2000 + міРНК	130	110
Третій контрольний зразок		
Lipofectamine® 2000	110	108

40 Отримані результати показують, що комплекси, отримані між катіонними полімерами у відповідності з даним винаходом та міРНК, є нецитотоксичними.

Отже, катіонні полімери 3, 7, 11 та 15 використовують у наступному дослідженні поглинання клітиною речовин.

Приклад 11

Дослідження поглинання клітиною речовин з катіонними похідними глікогену, закомплексованого з флуоресцентними аніонними молекулами

Ці дослідження проводять за способами, подібними до тих, що описані у Прикладі 7 у цьому описі вище, використовуючи HT29 адгезивні клітини.

5 HT-29 клітини розподіляють по планшету за день до експерименту при щільності 20000 клітин/лунку у об'ємі 100 мкл DMEM середовища, що містить 10 % сироватки.

У день експерименту, середовище видаляють з лунок та додають 150 мкл DMEM середовища, що містить 2,5 % сироватки. Потім додають 50 мкл комплексів, утворених з катіонного полімеру у відповідності з даним винаходом та флуоресцентним міРНК.

10 Ці комплекси, утворені з катіонного полімеру у відповідності з даним винаходом та флуоресцентного міРНК, одержують у відповідності з наступною процедурою.

Отримують чотири розчини, кожен з яких містить 6,2832 мг катіонного полімеру 3, 7, 11 та 15 у 40 мл PBS, що не містить РНази. До 142,86 мкл кожного з цих розчинів додають 6,6 мкл розчину міРНК у PBS, що не містить РНази (концентрація 20 мкМ) та, через декілька хвилин, кожен розбавляють за допомогою 350,54 мкл PBS, що не містить РНази. міРНК являє собою мічену флуоресцентною сполукою Alexa-488. Кінцева концентрація міРНК у розчинах становить 264 нМ, що еквівалентно 10 % за масою міРНК відносно маси полімеру.

20 Отримані таким чином розчини перемішують впродовж приблизно 30 секунд, інкубують при кімнатній температурі впродовж 10 хвилин, перемішують знову впродовж 30 секунд та залишають стояти впродовж 5 хвилин. Перед здійсненням експерименту, ці розчини перемішують знову впродовж ще 30 секунд.

25 Комплекс між міРНК та трансфекційним реагентом Lipofectamine[®] 2000, отриманим у відповідності з процедурою, описаною виробником Life-technologies[™] для трансфекції міРНК, та що містить таку ж кількість міРНК, що і використовується у комплексах з полімерами, використовують як перший контрольний зразок.

Флуоресценцію тільки окремо міРНК вимірюють як наступний контроль.

Комплекси та всі контрольні матеріали, отримані як описано вище, приводять у контакт з клітинами.

30 Ці клітини інкубують впродовж 4 год при 37 °С, після чого надосадову рідину відкидають, та ці клітини промивають двічі за допомогою 200 мкл PBS.

Далі, ці клітини обробляють за допомогою 200 мкл лізисного розчину (Triton X-100 0,5 % у 0,2н. NaOH) впродовж 5 хвилин при кімнатній температурі при перемішуванні.

35 Флуоресценцію, що випромінюється міРНК, міченою за допомогою Alexa-488, яка поглинається клітиною, вимірюють за допомогою флуориметру (λ збудж. 485 нм; λ випром. 535 нм), після того, як комплекси між полімером та міРНК підтримували у контакті з клітинами впродовж 4 год.

40 Для кожного полімеру, експеримент проводять у трьох повторях та потім розраховують середню інтенсивність флуоресценції. Від цього значення віднімають середнє значення інтенсивності флуоресценції, розраховане тільки для культурального середовища, яке дорівнює 1366, отримуючи кінцеву інтенсивність флуоресценції.

Такий же процедурі слідує для першого контрольного зразку (Lipofectamine[®] 2000 + міРНК), для якого середнє значення інтенсивності флуоресценції тільки для культурального середовища дорівнює 1328.

Результати представлені у Таблиці 22.

Таблиця 22

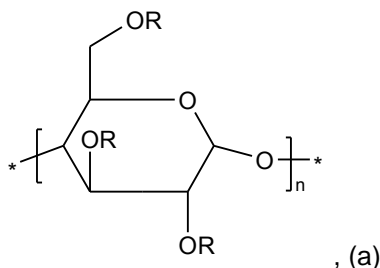
Полімер №	Інтенсивність флуоресценції				
	zareestrovana			середня	кінцева
3	2533	2504	2642	2560	1194
7	2721	2973	3066	2920	1554
11	1906	1801	1856	1854	489
15	2493	2927	2851	2757	1391
Lipofectamine [®] 2000 + міРНК	1811	1820	1845	1825	498
міРНК	1334	1351	1267	1317	-

50 Отримані результати показують, що катіонні полімери у відповідності з даним винаходом здатні викликати поглинання міРНК у клітинну мембрану. Крім того, катіонні полімери у відповідності з даним винаходом дають можливість поглинати більшу кількість міРНК, ніж комплексу, що включає Lipofectamine[®] 2000, що використовується як контрольний зразок.

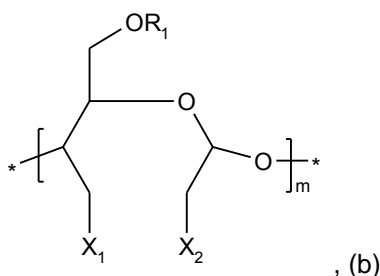
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Катіонний полімер на основі глікогену, що включає щонайменше одну повторювану одиницю, вибрану з групи, що включає:

(a)



- у якій групи R, які можуть бути однаковими або різними, являють собою атом водню, карбоксиметильну групу, необов'язково у формі солі з фармацевтично прийнятною органічною або неорганічною основою, або групу, що містить атом азоту, вибрану з таких як NH₂-(C₁-C₆)алкіл, [N,N-ді(C₁-C₆)алкіламіно]-(C₁-C₆)алкіл, NH₂-[(C₁-C₆)алкілді(C₁-C₆)алкіламоній]-(C₁-C₆)алкіл, {[N,N-ді(C₁-C₆)алкіламіно]-(C₁-C₆)алкілді(C₁-C₆)алкіламоній]-(C₁-C₆)алкіл, NH₂-[(C₁-C₆)алкіламіно]-(C₁-C₆)алкіл, {[N,N-ді(C₁-C₆)алкіламіно]-(C₁-C₆)алкіламіно]-(C₁-C₆)алкіл, [три(C₁-C₆)алкіламоній]-(C₁-C₆)алкіл, азоцикліл-(C₁-C₆)алкіл, у яких ланцюги (C₁-C₆)алкіл, які можуть бути однаковими або різними, є необов'язково заміщеними однією або більше гідроксильними групами, та n являє собою ціле число, яке більше ніж або дорівнює 1; та
- (b)



- у якій R₁ вибирають з атома водню, карбоксиметильної групи, необов'язково у формі солі з фармацевтично прийнятною органічною або неорганічною основою, або групи, що містить атом азоту, вибраної з таких як: NH₂-(C₁-C₆)алкіл, [N,N-ді(C₁-C₆)алкіламіно]-(C₁-C₆)алкіл, NH₂-[(C₁-C₆)алкілді(C₁-C₆)алкіламоній]-(C₁-C₆)алкіл, {[N,N-ді(C₁-C₆)алкіламіно]-(C₁-C₆)алкілді(C₁-C₆)алкіламоній]-(C₁-C₆)алкіл, NH₂-[(C₁-C₆)алкіламіно]-(C₁-C₆)алкіл, {[N,N-ді(C₁-C₆)алкіламіно]-(C₁-C₆)алкіламіно]-(C₁-C₆)алкіл, [три(C₁-C₆)алкіламоній]-(C₁-C₆)алкіл, у яких (C₁-C₆)алкільні ланцюги, які можуть бути однаковими або різними, є необов'язково заміщеними однією або більше гідроксильними групами; X₁ та X₂, які можуть бути однаковими або різними, являють собою групу -ОН або групу, що містить азот, -NHR₂, у якій R₂ вибирають з таких як: атом водню, (C₁-C₆)алкіл, H-[NH-(C₁-C₆)алкіл]_p-, де p являє собою ціле число, яке більше ніж або дорівнює 1, та (C₁-C₄)алкільні групи можуть бути однаковими або різними; та m являє собою ціле число, яке більше ніж або дорівнює 1; за умови, що щонайменше один з R, R₁, X₁ та X₂ являє собою групу, що містить азот, як визначено, відповідно, для кожного з R, R₁, X₁ та X₂, та за умови, що, коли в зазначеному катіонному полімері на основі глікогену зазначені групи R відрізняються від водню, то щонайменше одна із цих зазначених груп R, які відрізняються від водню, відрізняється від [триметиламоній]-2-гідроксипропілу.
2. Катіонний полімер на основі глікогену за п. 1, у якому зазначені групи R, які можуть бути однаковими або різними, являють собою атом водню, карбоксиметильну групу, необов'язково у

формі солі з фармацевтично прийнятною органічною або неорганічною основою, або групу, що містить атом азоту, вибрану з таких як: [N,N-ді(C₁-C₃)алкіламіно]-(C₁-C₃)алкіл, {[N,N-ді(C₁-C₃)алкіламіно]-(C₁-C₃)алкілді(C₁-C₃)алкіламоній}-(C₁-C₃)алкіл, {[N,N-ді(C₁-C₃)алкіламіно]-(C₁-C₃)алкіламіно}-(C₁-C₃)алкіл, [три(C₁-C₃)алкіламоній]-(C₁-C₃)алкіл, азоцикліл-(C₁-C₃)алкіл, у яких (C₁-C₃)алкільні ланцюги, які можуть бути однаковими або різними, є необов'язково заміщеними гідроксильною групою.

3. Катіонний полімер на основі глікогену за п. 2, у якому зазначені групи R, які можуть бути однаковими або різними, являють собою атом водню, карбоксиметильну групу, необов'язково у формі солі з фармацевтично прийнятною органічною або неорганічною основою, або групу, що містить атом азоту, вибрану з таких як: N,N-диметиламіноетил, N,N-диметиламінопропіл, N,N-діетиламіноетил, [(N,N-диметиламіноетил)диметиламоній]етил, [(N,N-диметиламінопропіл)диметиламоній]пропіл, [(N,N-діетиламіноетил)діетиламоній]-етил, [триметиламоній]-2-гідроксипропіл, піперидил-N-етил або морфолініл-N-етил.

4. Катіонний полімер на основі глікогену за будь-яким з попередніх пунктів, у якому R₁ являє собою атом водню, карбоксиметильну групу, необов'язково у формі солі з фармацевтично прийнятною органічною або неорганічною основою, або групу, що містить атом азоту, вибрану з таких як: [N,N-ді(C₁-C₃)алкіламіно]-(C₁-C₃)алкіл, {[N,N-ді(C₁-C₃)алкіламіно]-(C₁-C₃)алкілді(C₁-C₃)алкіламоній}-(C₁-C₃)алкіл, {[N,N-ді(C₁-C₃)алкіламіно]-(C₁-C₃)алкіламіно}-(C₁-C₃)алкіл або [три(C₁-C₃)алкіламоній]-(C₁-C₃)алкіл, у яких (C₁-C₃)алкільні ланцюги, які можуть бути однаковими або різними, є необов'язково заміщеними гідроксильною групою.

5. Катіонний полімер на основі глікогену за п. 4, у якому R₁ являє собою атом водню або карбоксиметильну групу.

6. Катіонний полімер на основі глікогену за будь-яким з попередніх пунктів, у якому X₁ та X₂, які можуть бути однаковими або різними, являють собою групу, що містить азот, -NHR₂, у якій R₂ являє собою атом водню або H-[NH-(C₁-C₄)алкіл]_p-, де p являє собою ціле число, яке більше ніж або дорівнює 1, та (C₁-C₄)алкільні групи можуть бути однаковими або різними.

7. Катіонний полімер на основі глікогену за п. 6, у якому зазначена група H-[NH-(C₁-C₄)алкіл]_p- являє собою поліетиленімін, з молекулярною масою від 50 до 3000 дальтонів, спермін (H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NH₂) або спермідин (H₂N(CH₂)₄NH(CH₂)₄NH₂).

8. Катіонний полімер на основі глікогену за будь-яким з попередніх пунктів, у якому зазначені повторювані одиниці (a) та (b) включають:

щонайменше одну групу, що містить азот, яка є здатною до іонізації при фізіологічному pH, яку вибирають з групи, що включає такі як: NH₂-(C₁-C₆)алкіл, [N,N-ді(C₁-C₆)алкіламіно]-(C₁-C₆)алкіл, NH₂-{(C₁-C₆)алкіламіно}-(C₁-C₆)алкіл, {[N,N-ді(C₁-C₆)алкіламіно]-(C₁-C₆)алкіламіно}-(C₁-C₆)алкіл та азоцикліл-(C₁-C₆)алкіл; та

щонайменше одну групу, що містить азот, яка є здатною до іонізації при pH нижче фізіологічного pH, яку вибирають з групи, що включає такі як: NH₂-{[(C₁-C₃)алкіл]-ді(C₁-C₆)алкіламоній}-(C₁-C₆)алкіл та {[N,N-ді(C₁-C₃)алкіламіно]-(C₁-C₆)алкілді(C₁-C₆)алкіламоній}-(C₁-C₆)алкіл.

9. Комплекс між катіонним полімером на основі глікогену за будь-яким з пунктів 1-8 та аніонною сполукою, де зазначена аніонна сполука вибрана з групи, що складається з активної речовини та нуклеїнової кислоти.

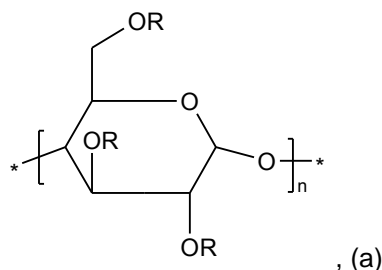
10. Комплекс за п. 9, де зазначений комплекс включає кількість зазначеної аніонної сполуки від 5 % до 60 % за масою по відношенню до маси зазначеного катіонного полімеру на основі глікогену.

11. Комплекс за п. 10, де зазначений комплекс включає кількість зазначеної аніонної сполуки від 10 % до 50 % за масою по відношенню до маси зазначеного катіонного полімеру на основі глікогену.

12. Фармацевтична композиція, що включає (A) комплекс між (1) катіонним полімером на основі глікогену, що включає щонайменше одну повторювану одиницю, вибрану з групи, що включає

такі як:

(a)

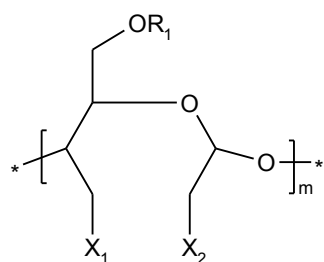


у якій

групи R, які можуть бути однаковими або різними, являють собою атом водню, карбоксиметильну групу, необов'язково у формі солі з фармацевтично прийнятною органічною або неорганічною основою, або групу, що містить атом азоту, вибрану з таких як: $\text{NH}_2\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $[\text{N,N-ді(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $\text{NH}_2\text{-}[(\text{C}_1\text{-C}_6\text{)алкілді(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламоній}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $\{[\text{N,N-ді(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкілді(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл-амоній}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $\text{NH}_2\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $\{[\text{N,N-ді(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $[\text{три(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламоній}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, азоцикліл-(C₁-C₆)алкіл, у яких (C₁-C₆)алкільні ланцюги, які можуть бути однаковими або різними, є необов'язково заміщеними однією або більше гідроксильними групами, та

n являє собою ціле число, яке більше ніж або дорівнює 1; та

(b)



, (b)

у якій

R₁ вибирають з атома водню, карбоксиметальної групи, необов'язково у формі солі з фармацевтично прийнятною органічною або неорганічною основою, або групи, що містить атом азоту, вибраної з таких як: $\text{NH}_2\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $[\text{N,N-ді(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $\text{NH}_2\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкілді(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламоній}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $\{[\text{N,N-ді(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкілді(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламоній}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $\text{NH}_2\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $\{[\text{N,N-ді(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламіно}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, $[\text{три(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіламоній}]\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкіл}$, у яких (C₁-C₆)алкільні ланцюги, які можуть бути однаковими або різними, є необов'язково заміщеними однією або більше гідроксильними групами;

X₁ та X₂, які можуть бути однаковими або різними, являють собою групу -ОН або групу, що містить азот, -NHR₂, у якій R₂ вибирають з таких як: атом водню, (C₁-C₆)алкіл, H-[NH-(C₁-C₆)алкіл]_p-, де p являє собою ціле число, яке більше ніж або дорівнює 1, та (C₁-C₄)алкільні групи можуть бути однаковими або різними; та

m являє собою ціле число, яке більше ніж або дорівнює 1;

за умови, що щонайменше один з R, R₁, X₁ та X₂ являє собою групу, що містить азот, як визначено, відповідно, для кожного з R, R₁, X₁ та X₂,

та (2) аніонною сполукою, де зазначена аніонна сполука вибрана з групи, що складається з активної речовини та нуклеїнової кислоти;

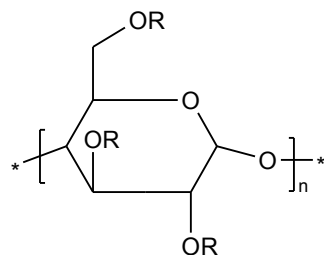
та (В) щонайменше одну фармацевтично прийнятну допоміжну речовину.

13. Фармацевтична композиція за п. 12, у якій зазначена аніонна сполука являє собою нуклеїнову кислоту.

14. Фармацевтична композиція за п. 12 або п. 13 для ін'єкційного застосування.

15. Застосування комплексу між (1) катіонним полімером на основі глікогену, що включає щонайменше одну повторювану одиницю, вибрану з групи, що включає такі як:

(a)



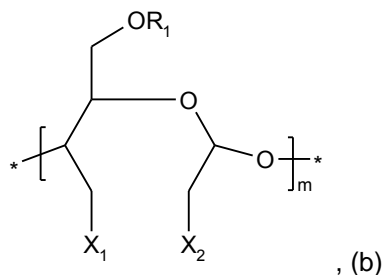
, (a)

у якій

групи R, які можуть бути однаковими або різними, являють собою атом водню, карбоксиметильну групу, необов'язково у формі солі з фармацевтично прийнятною органічною або неорганічною основою, або групу, що містить атом азоту, вибрану з таких як NH₂-(C₁-C₆)алкіл, [N,N-ді(C₁-C₆)алкіламіно]-(C₁-C₆)алкіл, NH₂-{[(C₁-C₆)алкілді(C₁-C₆)алкіламоній]}-(C₁-C₆)алкіл, {[N,N-ді(C₁-C₆)алкіламіно]-(C₁-C₆)алкілді(C₁-C₆)алкіл-амоній]}-(C₁-C₆)алкіл, NH₂-[(C₁-C₆)алкіламіно]-(C₁-C₆)алкіл, {[N,N-ді(C₁-C₆)алкіламіно]-(C₁-C₆)алкіламіно]-(C₁-C₆)алкіл, [три(C₁-C₆)алкіламоній]-(C₁-C₆)алкіл, азоцикліл-(C₁-C₆)алкіл, у яких (C₁-C₆)алкільні ланцюги, які можуть бути однаковими або різними, є необов'язково заміщеними однією або більше гідроксильними групами, та

10 n являє собою ціле число, яке більше ніж або дорівнює 1; та

(b)



15 у якій

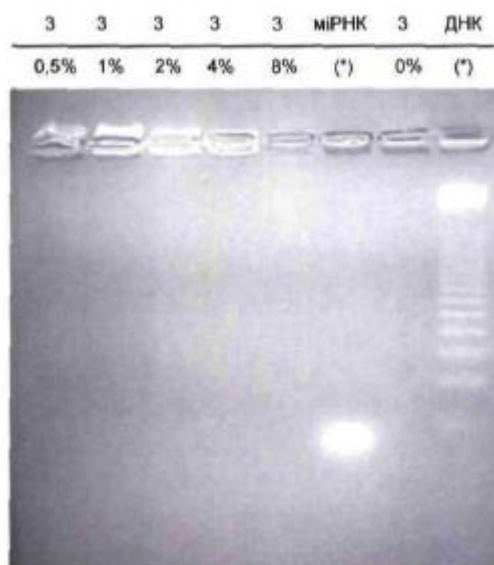
R₁ вибирають з атома водню, карбоксиметильної групи, необов'язково у формі солі з фармацевтично прийнятною органічною або неорганічною основою, або групи, що містить атом азоту, вибраної з таких як: NH₂-(C₁-C₆)алкіл, [N,N-ді(C₁-C₆)алкіламіно]-(C₁-C₆)алкіл, NH₂-[(C₁-C₆)алкілді(C₁-C₆)алкіламоній]}-(C₁-C₆)алкіл, {[N,N-ді(C₁-C₆)алкіламіно]-(C₁-C₆)алкілді(C₁-C₆)алкіламоній]}-(C₁-C₆)алкіл, NH₂-[(C₁-C₆)алкіламіно]-(C₁-C₆)алкіл, {[N,N-ді(C₁-C₆)алкіламіно]-(C₁-C₆)алкіламіно]-(C₁-C₆)алкіл, [три(C₁-C₆)алкіламоній]}-(C₁-C₆)алкіл, у яких (C₁-C₆)алкільні ланцюги, які можуть бути однаковими або різними, є необов'язково заміщеними однією або більше гідроксильними групами;

20 X₁ та X₂, які можуть бути однаковими або різними, являють собою групу -ОН або групу, що містить азот, -NHR₂, у якій R₂ вибирають з таких як: атом водню, (C₁-C₆)алкіл, H-[NH-(C₁-C₆)алкіл]_p-, де p являє собою ціле число, яке більше ніж або дорівнює 1, та (C₁-C₄)алкільні групи можуть бути однаковими або різними; та

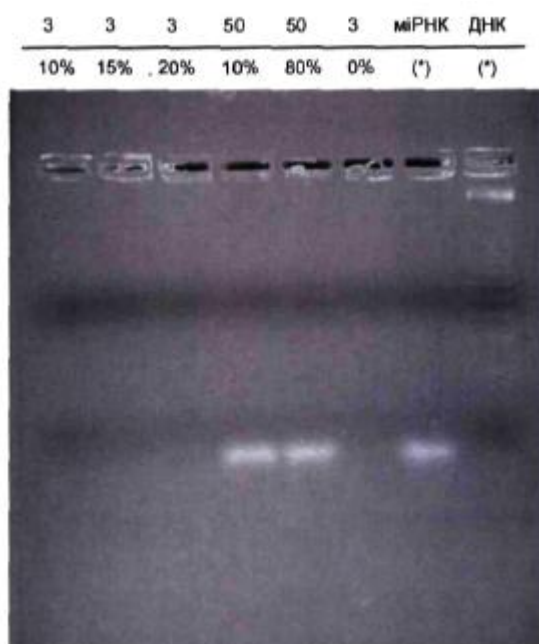
m являє собою ціле число, яке більше ніж або дорівнює 1;

за умови, що щонайменше один з R, R₁, X₁ та X₂ являє собою групу, що містить азот, як визначено, відповідно, для кожного з R, R₁, X₁ та X₂,

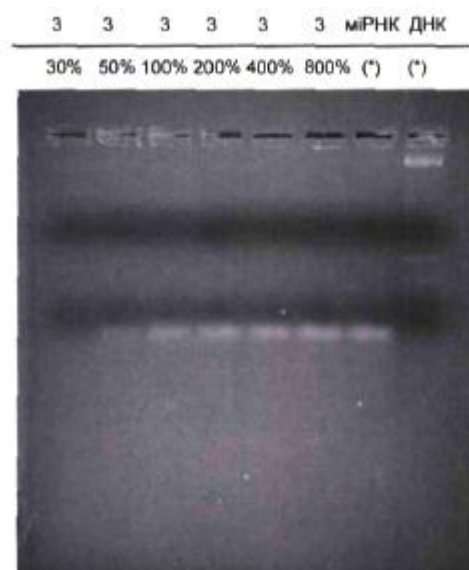
30 та (2) аніонною сполукою, де зазначена аніонна сполука вибрана з групи, що складається з активної речовини та нуклеїнової кислоти, для доставки або трансфектування зазначеної аніонної сполуки у специфічну фармакологічну ціль.



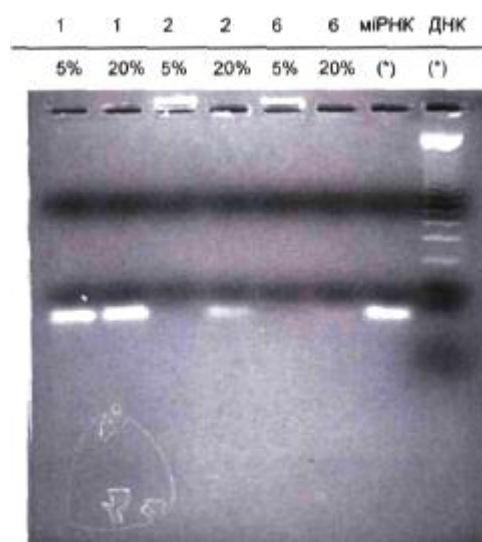
Фіг. 1



Фіг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

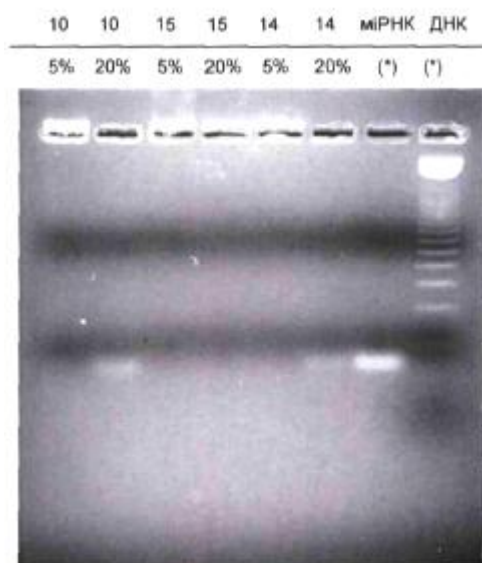


Fig. 5

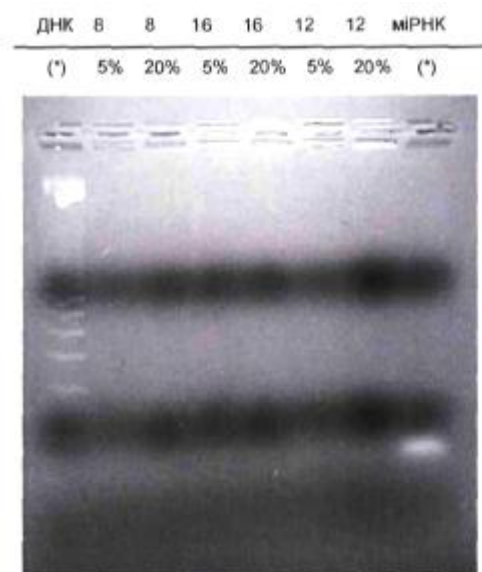


Fig. 6

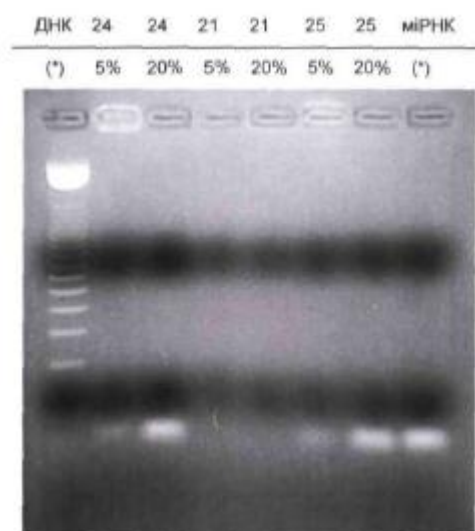


Fig. 7

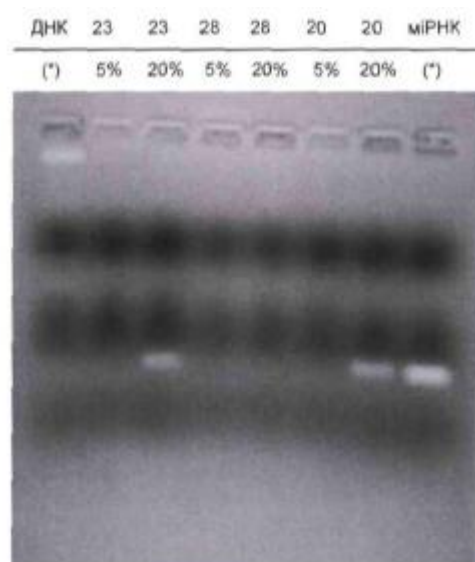
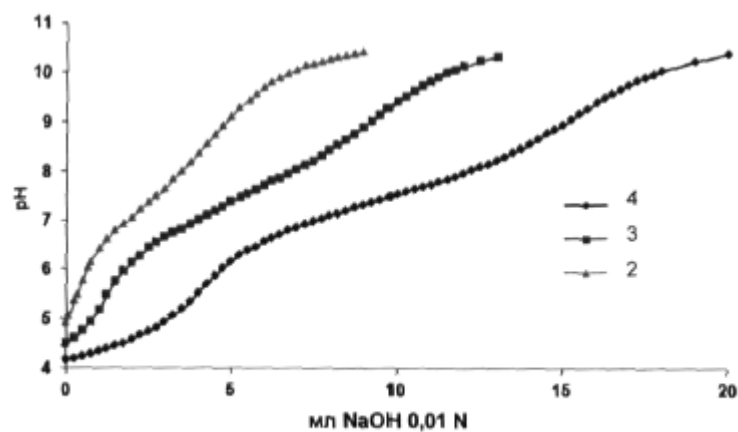
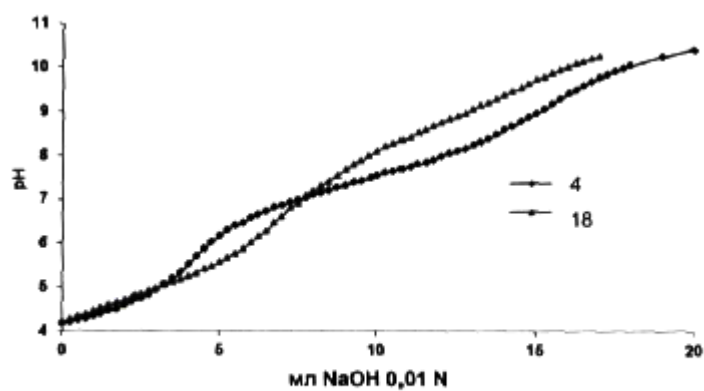


Fig. 8



Фіг. 9



Фіг. 10

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601