

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 046694

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.10

(21) Номер заявки
201791744

(22) Дата подачи заявки
2010.06.10

(51) Int. Cl. *A61K 47/18* (2017.01)
A61K 9/127 (2006.01)
C07C 229/12 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)

(54) ЛИПИДНАЯ КОМПОЗИЦИЯ НА ОСНОВЕ КАТИОННОГО ЛИПИДА И
НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

(31) 61/185,800; 61/244,834

(32) 2009.06.10; 2009.09.22

(33) US

(43) 2018.03.30

(62) 201690312; 2010.06.10

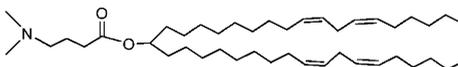
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АРБУТУС БИОФАРМА
КОРПОРЭЙШН (СА)

(72) Изобретатель:
Акинг Акин, Доркин Джозеф Р.,
Цинь Сяоцзюнь (US), Кентли Вильям
(GB), Манохаран Мутиах, Раджив
Каллантотатил Г., Нараяннаннаир
Джаяпракаш К., Джаяраман
Мутусами, Чэнь Цзяньсинь, Энселл
Стивен (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) EP-A1-1938843
WO-A1-199816240
US-A-5459127
US-A1-20070167351

(57) Изобретение относится к липидной композиции для доставки терапевтического агента в клетку, содержащей катионный липид формулы I или его фармацевтически приемлемую соль и терапевтический агент, причем указанный терапевтический агент представляет собой нуклеиновую кислоту, при этом нуклеиновая кислота представляет собой мРНК.



B1

046694

046694

B1

Притязание на приоритет

Заявка на данное изобретение претендует на приоритет заявок U.S.S.N. 61/185800, поданной 10 июня 2009 г., и U.S.S.N. 61/244834, поданной 22 сентября 2009 г., содержание каждой из которых целиком включено в настоящее описание в качестве ссылок.

Область техники

Изобретение относится к области доставки терапевтических агентов с применением липидных частиц. В частности, настоящее изобретение направлено на создание катионных липидов и липидных частиц, содержащих эти липиды, которые полезны для доставки *in vivo* нуклеиновых кислот, а также композиций нуклеиновых кислот с липидными частицами, пригодных для терапевтического применения *in vivo*. Кроме того, настоящее изобретение направлено на создание способов получения этих композиций, а также способов внедрения нуклеиновых кислот внутрь клеток с применением указанных композиций, например, для лечения различных болезненных состояний.

Уровень техники

Терапевтические нуклеиновые кислоты включают, например, малые интерферирующие РНК (siРНК), микроРНК (miРНК), антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы, плазмиды и иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты. Эти нуклеиновые кислоты действуют посредством различных механизмов. В случае siРНК или miРНК эти нуклеиновые кислоты могут вызывать снижение внутриклеточного содержания специфичных белков посредством процесса, называемого РНК-интерференцией (РНКi). После внедрения siРНК или miРНК в цитоплазму клетки эти двухцепочечные РНК-конструкции могут связываться с белком, называемым RISC. Смысловая цепь siРНК или miРНК удаляется из комплекса RISC, в результате чего в составе RISC остается матрица, которая может распознавать и связываться с мРНК, имеющей последовательность, комплементарную последовательности, связанной siРНК или miРНК. После связывания с комплементарной мРНК комплекс RISC расщепляет мРНК и высвобождает расщепленные цепи. РНКi может обеспечивать подавление специфичных белков путем целевого специфичного разрушения соответствующих мРНК, которые служат матрицами для синтеза белка.

Терапевтическое применение РНКi крайне обширно, так как могут быть синтезированы конструкции siРНК и miРНК с любой нуклеотидной последовательностью, направленные против целевого белка. К настоящему времени, конструкции siРНК продемонстрировали способность специфично подавлять целевые белки в моделях как *in vitro*, так и *in vivo*. Кроме того, конструкции siРНК в настоящий момент проходят оценку в клинических исследованиях.

Однако в настоящее время при использовании конструкций siРНК или miРНК возникают две проблемы, во-первых, их чувствительность к расщеплению нуклеазами в плазме и, во-вторых, их ограниченная способность к получению доступа во внутриклеточный компартмент, где они могут связаться с RISC, при системном введении в виде свободной siРНК или miРНК. Эти двухцепочечные конструкции могут быть стабилизированы с помощью внедрения химически модифицированных нуклеотидных линкеров в пределах молекулы, например, фосфотиолатных групп. Однако эти химические модификации обеспечивают только ограниченную защиту от расщепления нуклеазами и могут снижать активность конструкции. Внутриклеточная доставка siРНК или miРНК может быть облегчена применением переносящих систем, таких как полимеры, катионные липосомы или путем химической модификации конструкции, например, с помощью ковалентного присоединения молекул холестерина. Однако необходимы улучшенные системы доставки для увеличения эффективности молекул siРНК и miРНК и снижения или отмены потребности в химической модификации.

Антисмысловые олигонуклеотиды и рибозимы также могут ингибировать трансляцию мРНК в белок. В случае антисмысловых конструкций эти одноцепочечные дезоксирибонуклеиновые кислоты имеют последовательность, комплементарную последовательности мРНК целевого белка, и могут связываться с мРНК путем Уотсон-Криковского спаривания оснований. Это связывание предотвращает трансляцию целевой мРНК и/или запускает деградацию мРНК-транскриптов под действием РНКазы H. Вследствие этого антисмысловые олигонуклеотиды имеют огромный потенциал для специфичного действия (т.е. подавления специфичного связанного с заболеванием белка). В настоящее время эти соединения продемонстрировали потенциал в нескольких моделях *in vitro* и *in vivo*, включая модели воспалительного заболевания, рака и ВИЧ (обзор см. в Agrawal, Trends in Biotech. 14:376-387, 1996). Антисмысловые цепи также могут влиять на клеточную активность, специфично гибридизируясь с хромосомной ДНК. В настоящее время осуществляется более тщательная клиническая оценка с участием человека нескольких антисмысловых лекарственных препаратов. Цели этих лекарственных препаратов включают гены bcl2 и аполипопротеина В и их мРНК-продукты.

Имуностимулирующие нуклеиновые кислоты включают дезоксирибонуклеиновые кислоты и рибонуклеиновые кислоты. В случае дезоксирибонуклеиновых кислот показано, что определенные последовательности или мотивы вызывают иммуностимуляцию у млекопитающих. Эти последовательности или мотивы включают CpG мотивы, пиримидин-богатые последовательности и палиндромные последовательности. Полагают, что CpG мотив в дезоксирибонуклеиновых кислотах специфично узнается эндосомальным рецептором, Toll-подобным рецептором 9 (TLR-9), который после этого запускает пути стимуляции как врожденного, так и приобретенного иммунитета. Также сообщалось о некоторых иммуно-

стимулирующих последовательностях рибонуклеиновых кислот. Считается, что эти последовательности РНК запускают активацию иммунитета путем связывания с Toll-подобными рецепторами 6 и 7 (TLR-6 и TLR-7). Кроме того, также сообщалось о том, что двухцепочечные РНК являются иммуностимулирующими и, как полагают, осуществляют активацию посредством связывания с TLR-3. Одна хорошо известная проблема при применении терапевтических нуклеиновых кислот связана со стабильностью фосфодиэфирной межнуклеотидной связи и чувствительностью этого линкера к нуклеазам. Присутствие экзонуклеаз и эндонуклеаз в сыворотке приводит к быстрому расщеплению нуклеиновых кислот, содержащих фосфодиэфирные линкеры, и, следовательно, терапевтические нуклеиновые кислоты могут иметь очень короткие периоды полураспада в присутствии сыворотки или внутри клеток. (Zelphati, O., et al., *Antisense. Res. Dev.* 3:323-338 (1993) и Thierry, A.R., et al., p. 147-161 в *Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA* (Eds. Erickson, R.P. and Izant, J.G.; Raven Press, NY (1992)). При разработке в настоящее время терапевтической нуклеиновой кислоты не применяют базовую фосфодиэфирную химическую связь, обнаруженную в природных нуклеиновых кислотах, вследствие этой и других известных проблем.

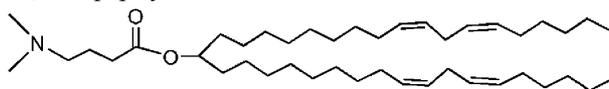
Эта проблема была частично решена с помощью химических модификаций, которые снижают деградацию в сыворотке и внутри клетки. Были испытаны модификации межнуклеотидного фосфодиэфирного мостика (например, применение фосфоротиоатного, метилфосфонатного или фосфорамидатного соединения), оснований нуклеотидов (например, 5-пропинил-пиримидины) или сахара (например, 2'-модифицированные сахара) (Uhlmann E., et al., *Antisense: Chemical Modifications. Encyclopedia of Cancer*, Vol. X., p 64-81 Academic Press Inc. (1997)). Другими исследователями были предприняты попытки улучшить стабильность с помощью 2'-5' соединения сахаров (см., например, патент США № 5532130). Были предприняты и другие изменения. Однако ни одно из этих решений не было признано полностью удовлетворительным, и свободные *in vivo* терапевтические нуклеиновые кислоты до сих пор имеют очень ограниченную эффективность.

Кроме того, как указано выше для siРНК и miРНК, сохраняются проблемы с ограниченной способностью терапевтических нуклеиновых кислот пересекать клеточные мембраны (см., Vlassov, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1197:95-1082 (1994)) и проблемы, связанные с системной токсичностью, такие как опосредованные комплементом анафилаксия, измененные свойства свертываемости и цитопения (Galbraith, et al., *Antisense Nucl. Acid Drug Des.* 4:201-206, 1994).

С целью улучшения эффективности исследователи также применяли переносящие системы на основе липидов для доставки химически модифицированных или немодифицированных терапевтических нуклеиновых кислот. В Zelphati, O. and Szoka, F.C., *J. Contr. Rel.* 41:99-119 (1996), авторы ссылаются на применение анионных (обычных) липосом, чувствительных к рН липосом, иммунолипосом, фузогенных липосом и агрегатов катионных липидов с антисмысловыми. Сходным образом siРНК систематически вводили в катионных липосомах, и сообщается, что эти нуклеинолипидные частицы обеспечивают улучшенное подавление целевых белков у млекопитающих, в том числе у нечеловекообразных приматов (Zimmermann et al., *Nature*, 441:111-114 (2006)). Несмотря на недавний прогресс, остается потребность в улучшенных композициях из липидов и терапевтических нуклеиновых кислот, пригодных для общего терапевтического применения. Предпочтительно эти композиции должны инкапсулировать нуклеиновые кислоты с высокой эффективностью, иметь высокое соотношение лекарственное средство:липид, защищать инкапсулированную нуклеиновую кислоту от деградации и клиренса в сыворотке, быть пригодными для системной доставки и обеспечивать внутриклеточную доставку инкапсулированной нуклеиновой кислоты. Кроме того, эти липидные частицы нуклеиновой кислоты должны быть хорошо переносимы и обеспечивать адекватный терапевтический индекс, такой, чтобы лечение пациента при эффективной дозе нуклеиновой кислоты не было ассоциировано с существенной токсичностью и/или риском для пациента. Настоящее изобретение направлено на создание таких композиций, способов получения композиций и способов применения композиций для внедрения нуклеиновых кислот в клетки, в том числе для лечения заболеваний.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение направлено на создание улучшенных липидных композиций, содержащих катионный липид формулы I, где формула I



или его фармацевтически приемлемую соль и терапевтический агент, причем указанный терапевтический агент представляет собой нуклеиновую кислоту, при этом нуклеиновая кислота представляет собой мРНК.

Настоящее изобретение дополнительно включает, в других родственных вариантах воплощения, способ доставки терапевтического агента в клетку, включающий введение субъекту липидной композиции по настоящему изобретению.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлена столбчатая диаграмма, изображающая влияние липидных композиций, содержащих DLin-M-C3-DMA, на сайленсинг FVII при использовании мыши в качестве модельного организма.

На фиг. 2 представлена столбчатая диаграмма, показывающая дозозависимый эффект МСЗ у крыс для различных липосомных композиций.

На фиг. 3 представлена столбчатая диаграмма, которая демонстрирует зависимость от AроЕ эффективности композиций, содержащих МСЗ. Мыши дикого типа, но не мыши, нокаутные по гену AроЕ, демонстрировали дозозависимое снижение содержания белка FVII. На фиг. 3 также изображен график, демонстрирующий, что зависимость от AроЕ липосомных композиций с МСЗ и отсутствие сайленсинга у нокаутных по гену AроЕ мышей при применении МСЗ могут быть эффективно нормализованы путем предварительного смешивания с AроЕ.

На фиг. 4 представлена столбчатая диаграмма, которая показывает эффекты вариаций мольного процентного содержания МСЗ в липосомной композиции, а также эффекты вариаций нейтрального липида (например, замена нейтрального липида на ДСФХ, ДМФХ и ДЛФХ).

На фиг. 5 представлена столбчатая диаграмма, демонстрирующая, что возрастающая степень ПЭГ-экранирования снижает у мышей сайленсинг, опосредованный не GalNAc.

На фиг. 6 представлена столбчатая диаграмма, демонстрирующая, что возрастающая степень ПЭГ-экранирования снижает у крыс сайленсинг, опосредованный не GalNAc.

На фиг. 7 представлена столбчатая диаграмма, показывающая эффективность липосомных композиций, имеющих различное мольное процентное содержание МСЗ, содержащих и не содержащих GalNAc.

На фиг. 8 представлена столбчатая диаграмма, показывающая, что активность несущих GalNAc липосом отсутствует у мышей, нокаутных по гену рецептора асиалогликопротеинов (ASGPR).

На фиг. 9 показана кривая зависимости доза-эффект от % остаточного FVII и дозы (мг/кг) для композиции, получение которой описано в примере 17.

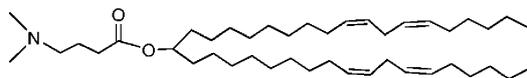
На фиг. 10 представлена кривая титрования рКа для катионного липида формулы I, полученная, как описано в примере 18.

Подробное описание изобретения

В этом документе описана улучшенная липидная композиция, которая может быть применена, например, в качестве агента доставки, например агента на основе нуклеиновых кислот, такого как конструкции на основе РНК, в клетку или в организм субъекта. Также в этом документе описаны способы введения улучшенных липидных композиций, содержащих конструкции на основе РНК, животному, и в некоторых вариантах воплощения, способы оценки экспрессии целевого гена. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения улучшенная липидная композиция включает нацеливающий липид (например, нацеливающий липид, описанный в этом документе, такой как липид, содержащий GalNAc или фолат).

Липиды.

Настоящее изобретение направлено на создание улучшенных липидных композиций, содержащих катионный липид формулы I, нейтральный липид, стерин и ПЭГ или липид, модифицированный ПЭГ, где формула I



В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения липид является рацемической смесью.

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения липид обогащен одним диастереомером, например липид содержит по меньшей мере 95%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 70% избыток диастереомера.

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения липид является хирально чистым, например, одиночным изомером.

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения липид обогащен одним изомером.

В одном из вариантов воплощения композиции согласно изобретению включают по меньшей мере на 75%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90%. В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения композиция содержит от примерно 25 до примерно 75% в молярном выражении катионного липида формулы I, например, от примерно 35 до примерно 65%, от примерно 45 до примерно 65%, примерно 60%, примерно 57,5%, примерно 50% или примерно 40% в молярном выражении.

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения композиция содержит от примерно 0,5 до примерно 15% в молярном выражении нейтрального липида, например, от примерно 3 до примерно 12%, от примерно 5 до примерно 10% или примерно 15%, примерно 10% или примерно 7,5% в молярном выражении.

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения композиция содержит от примерно 5 до примерно 50% в молярном выражении стерина (например, от примерно 15 до примерно 45%, от пример-

но 20 до примерно 40%, примерно 40%, примерно 38,5%, примерно 35% или примерно 31% в молярном выражении). В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения стерин является холестерином.

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения композиция содержит от примерно 0,5 до примерно 20% в молярном выражении ПЭГ или липида, модифицированного ПЭГ (например, от примерно 0,5 до примерно 10%, от примерно 0,5 до примерно 5%, примерно 1,5%, примерно 0,5%, примерно 1,5%, примерно 3,5% или примерно 5% в молярном выражении).

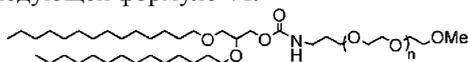
В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения композиции согласно изобретению включают 25-75% катионного липида формулы I, 0,5-15% нейтрального липида, 5-50% стерина и 0,5-20% ПЭГ или ПЭГ-модифицированного липида в молярном отношении.

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения композиции согласно изобретению включают 35-65% катионного липида формулы I, 3-12% нейтрального липида, 15-45% стерина и 0,5-10% ПЭГ или ПЭГ-модифицированного липида в молярном отношении.

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения композиции согласно изобретению включают 45-65% катионного липида формулы I, 5-10% нейтрального липида, 25-40% стерина и 0,5-10% ПЭГ или ПЭГ-модифицированного липида в молярном отношении.

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения композиции согласно изобретению включают примерно 60% катионного липида формулы I, примерно 7,5% нейтрального липида, примерно 31% стерина и примерно 1,5% ПЭГ или ПЭГ-модифицированного липида в молярном отношении. В одном предпочтительном воплощении катионный липид является соединением формулы I, нейтральный липид является ДСФХ, стерин является холестерином и ПЭГ-липид является ПЭГ-ДМГ (также называемым в этом документе ПЭГ-С₁₄ или С₁₄-ПЭГ). В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения ПЭГ или ПЭГ-модифицированный липид содержит молекулу ПЭГ со средней молекулярной массой 2000 Да. В другом варианте воплощения ПЭГ или ПЭГ-модифицированный липид содержит молекулу ПЭГ со средней молекулярной массой менее 2000, например, около 1500 Да, около 1000 Да или около 500 Да.

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения ПЭГ или ПЭГ-модифицированный липид является соединением по следующей формуле VI:



с молекулой ПЭГ со средней молекулярной массой 2000 Да.

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения ПЭГ или ПЭГ-модифицированный липид является ПЭГ-дистеароил-глицерином (ПЭГ-ДСГ, также называемым в этом документе как ПЭГ-С₁₈ или С₁₈-ПЭГ).

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения композиции согласно изобретению включают примерно 50% катионного липида формулы I, примерно 10% нейтрального липида, примерно 38,5% стерина и примерно 1,5% ПЭГ или ПЭГ-модифицированного липида в молярном отношении. В одном предпочтительном воплощении катионный липид является соединением формулы I, нейтральный липид является ДСФХ, стерин является холестерином и ПЭГ-липид является ПЭГ-ДМГ (также называемым в этом документе ПЭГ-С₁₄ или С₁₄-ПЭГ). В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения ПЭГ или ПЭГ-модифицированный липид является ПЭГ-дистирол-глицерином (ПЭГ-ДСГ, также называемым в этом документе как ПЭГ-С₁₈ или С₁₈-ПЭГ). В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения ПЭГ или ПЭГ-модифицированный липид является ПЭГ-ДПГ (ПЭГ-дипальмитоил-глицерином). В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения ПЭГ или ПЭГ-модифицированный липид содержит молекулу ПЭГ со средней молекулярной массой 2000 Да.

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения композиции согласно изобретению включают примерно 50% катионного липида формулы I, примерно 10% нейтрального липида, примерно 35% стерина, примерно 4,5% ПЭГ или ПЭГ-модифицированного липида и примерно 0,5% нацеливающего липида в молярном отношении. В одном предпочтительном воплощении катионный липид является соединением формулы I, нейтральный липид является ДСФХ, стерин является холестерином, ПЭГ-липид является ПЭГ дистеароил-глицерином (ПЭГ-ДСГ, также называемым в этом документе как ПЭГ-С₁₈ или С₁₈-ПЭГ), и нацеливающий липид является GalNAc3-ПЭГ-ДСГ.

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения композиции согласно изобретению включают примерно 50% катионного липида формулы I, примерно 10% нейтрального липида, примерно 35% стерина, примерно 4,5% ПЭГ или ПЭГ-модифицированного липида и примерно 0,5% нацеливающего липида в молярном отношении. В одном предпочтительном воплощении катионный липид является соединением формулы I, нейтральный липид является ДСФХ, стерин является холестерином, ПЭГ-липид является ПЭГ-ДМГ (также называемым в этом документе ПЭГ-С₁₄ или С₁₄-ПЭГ).

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения композиции согласно изобретению включают примерно 40% катионного липида формулы I, примерно 15% нейтрального липида, примерно 40% стерина и примерно 5% ПЭГ или ПЭГ-модифицированного липида в молярном отношении. В одном предпочтительном воплощении катионный липид является соединением формулы I, нейтральный липид

является ДСФХ, стерин является холестерином, ПЭГ-липид является ПЭГ-ДМГ (также называемым в этом документе ПЭГ-С₁₄ или С₁₄-ПЭГ).

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения композиции согласно изобретению включают примерно 50% катионного липида формулы I, примерно 10% нейтрального липида, примерно 35% стерина и примерно 5% ПЭГ или ПЭГ-модифицированного липида в молярном отношении. В одном предпочтительном воплощении катионный липид является соединением формулы I, нейтральный липид является ДСФХ, стерин является холестерином, ПЭГ-липид является ПЭГ-ДМГ (также называемым в этом документе ПЭГ-С₁₄ или С₁₄-ПЭГ).

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения композиции согласно изобретению включают примерно 57,2% катионного липида формулы I, примерно 7,1% нейтрального липида, примерно 34,3% стерина и примерно 1,4% ПЭГ или ПЭГ-модифицированного липида в молярном отношении. В одном предпочтительном воплощении катионный липид является соединением формулы I, нейтральный липид является ДПФХ, стерин является холестерином, ПЭГ-липид является ПЭГ-сDMA (ПЭГ-сDMA дополнительно обсуждается в Heyes et al. (J. Controlled Release, 107, 276-287 (2005))).

GalNAc3-ПЭГ-ДСГ. В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения ПЭГ или ПЭГ-модифицированный липид является соединением формулы VI или ПЭГ-ДСГ, при этом молекула ПЭГ имеет среднюю молекулярную массу 2000 Да.

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения композиции согласно изобретению включают примерно 57,5% катионного липида формулы I, примерно 7,5% нейтрального липида, примерно 31,5% стерина и примерно 3,5% ПЭГ или ПЭГ-модифицированного липида в молярном отношении. В одном предпочтительном воплощении катионный липид является соединением формулы I, нейтральный липид является ДСФХ, стерин является холестерином и ПЭГ-липид является ПЭГ-ДМГ.

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения соотношение липид:siPHK составляет по меньшей мере от примерно 0,5:1, по меньшей мере примерно 1:1, по меньшей мере примерно 2:1, по меньшей мере примерно 3:1, по меньшей мере примерно 4:1, по меньшей мере примерно 5:1, по меньшей мере примерно 6:1, по меньшей мере примерно 7:1, по меньшей мере примерно 8:1, по меньшей мере примерно 10:1, по меньшей мере примерно 11:1, по меньшей мере примерно 12:1 до по меньшей мере примерно 15:1. В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения, соотношение липид:siPHK составляет от примерно 1:1 до примерно 20:1, от примерно 3:1 до примерно 15:1, от примерно 4:1 до примерно 15:1, от примерно 5:1 до примерно 13:1. В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения соотношение липид:siPHK составляет от примерно 0,5:1 до примерно 15:1.

Одной из особенностей изобретения является то, что улучшенная липидная композиция также включает нацеливающий липид. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения нацеливающий липид содержит остаток GalNAc (т.е. остаток N-галактозамина). Например, нацеливающий липид, содержащий остаток GalNAc, может включать таковой, описанный в USSN 12/328669, поданной 12.04.2008, которая полностью включена в описание в качестве ссылок. Нацеливающий липид также может включать любой другой липид (например, нацеливающий липид), известный специалистам в данной области, например, как описано в USSN 12/328669 или Международной публикации № WO 2008/042973, содержание каждой из которых целиком включено в описание в качестве ссылок. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения липид направленного действия включает множество остатков GalNAc, например два или три остатка GalNAc. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения липид направленного действия включает множество, например два или три остатка N-ацетилгалактозамина (GalNAc). В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения липид в составе нацеливающего липида является 1,2-ди-О-гексадецил-sn-глицеридом (т.е. ДСГ). В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения нацеливающий липид включает остаток ПЭГ (например, остаток ПЭГ, имеющий молекулярную массу не менее чем примерно 500 Да, такую как примерно 1000, 1500, 2000 Да или более), например остаток направленного действия присоединен к липиду через остаток ПЭГ.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения нацеливающий липид содержит остаток фолата. Например, нацеливающий липид содержащий остаток фолата, может включать таковой, описанный в USSN 12/328 669, поданной 12.04.2008, которая полностью включена сюда в качестве ссылок. В другом варианте воплощения настоящего изобретения нацеливающий липид содержащий остаток фолата, может включать соединение формулы V.

Примеры липидов направленного действия представлены формулой L ниже:

(Группа направленного действия)_n-L-липид,

формула L

где Группа направленного действия является любой группой направленного действия, которая известна специалистам в данной области и/или описана в этом документе (например, рецептор клеточной поверхности);

n является целым числом от 1 до 5 (например, 3);

L является линкерной группой;

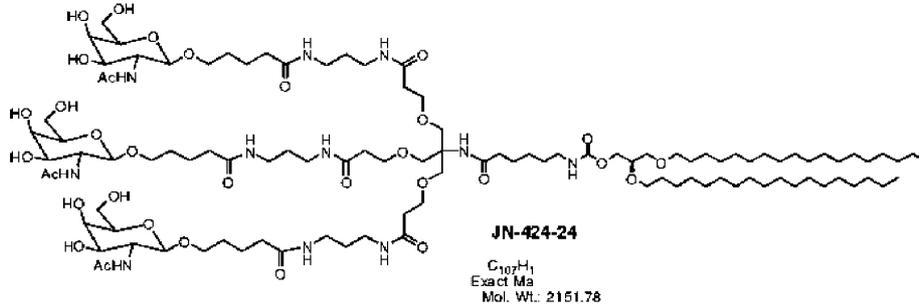
липид является липидом, таким как описан в этом документе (например, нейтральным липидом, та-

ким как ДСГ).

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения линкерная группа содержит остаток ПЭГ.

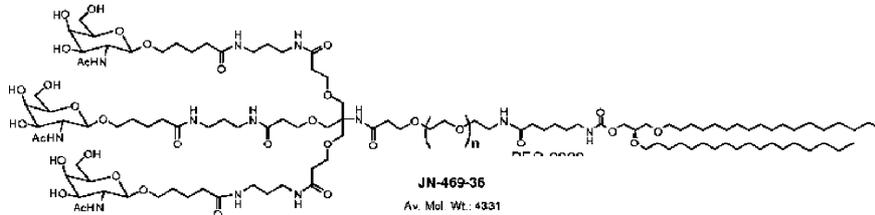
В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения нацеливающий липид является соединением 2, 3, 4 или 5, представленным ниже:

GalNAc3-ДСГ



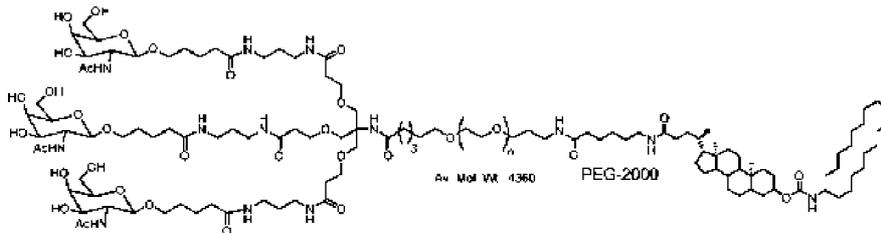
Формула II

GalNAc3-ПЭГ-ДСГ



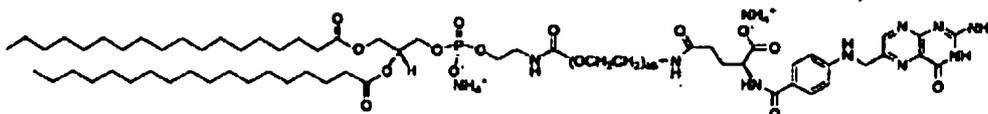
Формула III

(GalNAc)₃-ПЭГ-LCO



Формула IV

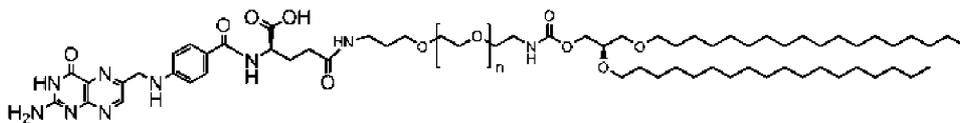
Фолат-ПЭГ-ДСФЭ



1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[фолат(полиэтиленгликоль)-2000](аммониевая соль)

Формула V

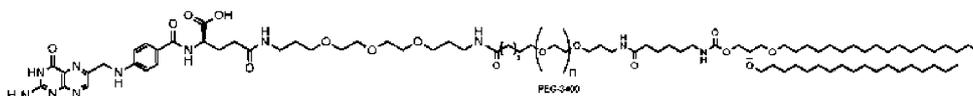
Фолат-ПЭГ2000-ДСГ



Mol Wt: ~ 3028

Формула VI

Фолат-ПЭГ3400-ДСГ



MW: ~ 4761

Формула VII

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения нацеливающий липид представлен в композиции в количестве от примерно 0,001 до примерно 5% (например, примерно 0,005, 0,15, 0,3, 0,5, 1,5, 2, 2,5, 3, 4 или 5%) в молярном отношении. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения нацеливающий липид представлен в композиции в количестве от примерно 0,005 до примерно 1,5%. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения нацеливающий липид включен в композицию, описанную в этом документе.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения липидная композиция также содержит антиоксидант (например, ловушку радикалов). Антиоксидант может присутствовать в композиции, например, в количестве от примерно 0,01 до примерно 5%. Антиоксидант может быть гидрофобным или гидрофильным (например, липидорастворимым или водорастворимым). В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения антиоксидант является фенольным соединением, например бутилгидрокси-ситолуолом, ресвератролом, коэнзимом Q10 или другим флавиноидом, или витамином, например витамином E или витамином C. Другие примеры антиоксидантов включают липоевую кислоту, мочевую кислоту, каротин, такой как β -каротин или ретинол (витамин A), глутатион, мелатонин, селен и убихинол.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения рецептор липида направленного действия (например, липида, содержащего GalNAc) является рецептором асиалогликопротеинов (т.е. ASGPR).

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения композиции согласно изобретению получены с применением способа экструзии или способа поточного смешивания.

Способ экструзии (также называемый способом с предварительным формированием или способ серийного производства) является способом, при котором сперва получают пустые липосомы (т.е. без нуклеиновой кислоты), после чего добавляют нуклеиновую кислоту к пустым липосомам. Экструзия липосомных композиций через мелкопористую поликарбонатную мембрану или асимметрическую керамическую мембрану приводит к относительно четко определенному распределению по размерам. В типичном случае суспензия циркулирует через мембрану один или несколько раз, до достижения требуемого распределения липосомных комплексов по размеру. Липосомы могут быть экструдированы через последовательные мембраны с уменьшающимся размером пор для достижения постепенного уменьшения размера липосом. В некоторых случаях формирующиеся липидо-нуклеиновые кислотные композиции могут быть применены без разделения по размерам. Эти способы раскрыты в патентах США № 5008050; 4927637; 4737323; Biochim Biophys Acta. 1979 Oct 19; 557(1):9-23; Biochim. Biophys. Acta. 1980 Oct 2; 601(3):559-7; Biochim. Biophys. Acta. 1986 Jun 13; 858(1):161-8 и Biochim. Biophys. Acta. 1985, 812, 55-65, содержание которых целиком включено в описание в качестве ссылок.

Способ поточного смешивания является способом, при котором как липиды, так и нуклеиновая кислота добавляются в смесительную камеру параллельно. Смесительная камера может являться простым тройниковым соединителем или любой другой смесительной камерой, известной специалистам в данной области. Эти способы раскрыты в патентах США № 6534018 и 6855277; публикации США 2007/0042031 и Pharmaceuticals Research, Vol. 22, No. 3, Mar. 2005, p. 362-372, которые полностью включены в описание в качестве ссылок.

При этом понимается, что композиции согласно изобретению могут быть получены любыми другими способами, известными всем специалистам в данной области.

В дополнительном варианте воплощения представительные композиции, содержащие соединение

формулы I, описаны в табл. 1.

Таблица 1

МСЗ	ДСФХ	Холестерин	ПЭГ
60	7,5	31	1,5
50	10	38,5	1,5
40	20	38,5	1,5
50	10	38,5	1,5
50	10	38,5	1,5
40	20	38,5	1,5
60	7,5	21	1,5
50	10	38,5	1,5
50	10	38,5	1,5
	20		
40	(ДМФХ)	38,5	1,5
30	30	38,5	1,5
	10		
50	(ДМФХ)	38,5	1,5
	30		
30	(ДМФХ)	38,5	1,5
	10		
51	(ДЛФХ)	38,5	1,5
	20		
40	(ДЛФХ)	38,5	1,5
40	20	38,5	1,5
40	10	40	10
60	10	20	10
40	20	37	3
60	10	27	3

В одном из вариантов воплощения специфичные композиции, содержащие соединение формулы I, описаны следующим образом:

Соотношение липидов (в мольных процентах).

Соотношение липид:siPHK.

50/10/38,5/1,5 (МСЗ:ДСФХ:холестерин:ПЭГ-ДМГ).

Соотношение липид:siPHK ~11;

40/15/40/5 (МСЗ:ДСФХ:холестерин: ПЭГ-ДМГ).

Соотношение липид:siPHK ~11;

50/10/35/4,5/0,5% (МСЗ:ДСФХ:холестерин:ПЭГ-ДСГ (C18-ПЭГ):GalNAc3-ПЭГ-ДСГ).

Соотношение липид:siPHK ~11;

50/10/30/9,5/0,5% (МСЗ:ДСФХ:холестерин:ПЭГ-ДСГ:GalNAc3-ПЭГ-ДСГ).

Соотношение липид:siPHK ~11;

50/10/35/5% (МСЗ:ДСФХ:холестерин:ПЭГ-ДСГ).

Соотношение липид:siPHK ~11;

50/10/38,5/1,5 (МСЗ:ДПФХ:холестерин:ПЭГ-ДМГ).

Соотношение липид:siPHK ~11.

40/15/40/5 (МСЗ:ДПФХ:холестерин:ПЭГ-ДМГ).

Соотношение липид:siPHK ~11;

50/10/35/4,5/0,5% (МСЗ:ДПФХ:холестерин:ПЭГ-ДСГ:GalNAc3-ПЭГ-ДСГ).

Соотношение липид:siPHK ~11;

50/10/30/9,5/0,5% (МСЗ:ДПФХ:холестерин:ПЭГ-ДСГ:GalNAc3-ПЭГ-ДСГ).

Соотношение липид:siPHK ~11;

50/10/35/5% (МСЗ:ДПФХ:холестерин:ПЭГ-ДСГ)

Соотношение липид:siPHK ~11;

50/10/38,5/1,5 (МСЗ:ДСФХ:холестерин:ПЭГ-ДМГ).

Соотношение липид:siPHK ~7;

50/10/38,5/1,5 (МСЗ:ДСФХ:холестерин:ПЭГ-ДСГ).

Соотношение липид:siPHK ~10;

50/10/38,5/1,5 (МСЗ:ДСФХ:холестерин:ПЭГ-ДМГ).

Соотношение липид:siPHK ~12;

50/10/35/5% (МСЗ:ДСФХ:холестерин:ПЭГ-ДМГ).

Соотношение липид:siPHK ~8№

50/10/35/5% (МСЗ:ДСФХ:холестерин:ПЭГ-ДМГ).

Соотношение липид:siPHK ~10.

В одном из вариантов воплощения композиции согласно изобретению захвачены по меньшей мере на 75%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90%.

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения композиции согласно изобретению дополнительно содержат аполипопротеин. При использовании в этом документе термин "аполипопротеин" или "липопротеин" означает аполипопротеины, известные специалисту в данной области, и их варианты и фрагменты, и агонисты, аналоги аполипопротеинов или их фрагменты, описанные ниже.

Пригодные аполипопротеины включают в качестве неограничивающих примеров ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoA-V и ApoE и их активные полиморфные формы, изоформы, варианты и мутантные формы, а также фрагменты или укороченные формы. В некоторых воплощениях аполипопротеин является тиолсодержащим аполипопротеином. "Тиолсодержащий аполипопротеин" означает аполипопротеин, вариант, фрагмент или изоформу, содержащий по меньшей мере один остаток цистеина. Самыми обычными тиолсодержащими аполипопротеинами являются ApoA-I Milano (ApoA-I_M) и ApoA-I Paris (ApoA-I_P), которые содержат один остаток цистеина (Jia et al., 2002, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 297: 206-13; Bielicki and Oda, 2002, *Biochemistry*, 41:2089-96). ApoA-II, ApoE2 и ApoE3 тоже являются тиолсодержащими аполипопротеинами. Изолированный ApoE и/или его активные фрагменты и полипептидные аналоги, включая его рекомбинантно полученные формы, описаны в патентах США № 5672685; 5525472; 5473039; 5182364; 5177189; 5168045; 5116739; раскрытия которых включены в описание в качестве ссылок. ApoE3 описан в Weisgraber, et al., "Human E apoprotein heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms", *J. Biol. Chem.* (1981), 256:9077-9083 и Rail, et al., "Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects", *Proc. Nat. Acad. Sci.* (1982), 79:4696-4700. См. также номер доступа K00396 в GenBank.

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

В некоторых воплощениях аполипопротеин может являться фрагментом, вариантом или изоформой аполипопротеина. Термин "фрагмент" означает любой аполипопротеин, имеющий аминокислотную последовательность короче, чем таковая нативного аполипопротеина, при этом фрагмент сохраняет активность нативного аполипопротеина, включая липидсвязывающие свойства. Под "вариантом" подразумеваются замены или изменения в аминокислотных последовательностях аполипопротеина, при этом замены или изменения, например добавление или делеция аминокислотных остатков, не уничтожает активность нативного аполипопротеина, включая липидсвязывающие свойства. Таким образом, вариант может включать белок или пептид, имеющий аминокислотную последовательность, в существенной мере идентичную нативному аполипопротеину, описанному в этом документе, в которой один или несколько аминокислотных остатков были консервативно заменены аминокислотами со схожими химическими свойствами. Примеры консервативных замен включают замену по меньшей мере одного гидрофобного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин или метионин, на другой. Сходным образом, настоящее изобретение предполагает, например, замену по меньшей мере одного гидрофильного остатка, такую как, например, обмен между аргинином и лизином, между глутамином и аспарагином и между глицином и серином (см. патенты США № 6004925, 6037323 и 6046166).

Термин "изоформа" означает белок, имеющий ту же, более широкую или частичную функцию и схожую, идентичную или частичную последовательность, который может являться или не являться продуктом того же самого гена и обычно является тканеспецифичным (см. Weisgraber 1990, *J. Lipid Res.* 31(8):1503-11; Hixson and Powers 1991, *J. Lipid Res.* 32(9):1529-35; Lackner et al., 1985, *J. Biol. Chem.* 260(2):703-6; Hoeg et al., 1986, *J. Biol. Chem.* 261(9):3911-4; Gordon et al., 1984, *J. Biol. Chem.* 259(1):468-74; Powell et al., 1987, *Cell* 50(6):831-40; Aviram et al., 1998, *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 18(10):1617-24; Aviram et al., 1998, *J. Clin. Invest.* 101(8):1581-90; Billecke et al., 2000, *Drug Metab. Dispos.* 28(11):1335-42; Draganov et al., 2000, *J. Biol. Chem.* 275(43):33435-42; Steinmetz and Utermann 1985, *J. Biol. Chem.* 260(4):2258-64; Widler et al., 1980, *J. Biol. Chem.* 255(21):10464-71; Dyer et al., 1995, *J. Lipid Res.* 36(1):80-

8; Sacre et al., 2003, FEBS Lett. 540(1-3):181-7; Weers, et al., 2003, Biophys. Chem. 100(1-3):481-92; Gong et al., 2002, J. Biol. Chem. 277(33):29919-26; Ohta et al., 1984, J. Biol. Chem. 259(23):14888-93 и патент США № 6372886).

В некоторых воплощениях способы и композиции по настоящему изобретению включают применение химерных конструкций аполипопротеина. Например, химерная конструкция аполипопротеина может быть составлена из аполипопротеинового домена с высокой липид-связывающей активностью, ассоциированного с аполипопротеиновым доменом, обладающим свойствами защиты от реперфузии при ишемии. Химерная конструкция аполипопротеина может являться конструкцией, которая включает отдельные области в пределах аполипопротеина (т.е. гомологичной конструкцией), или же химерная конструкция может являться конструкцией, которая включает отдельные области различных аполипопротеинов (т.е. гетерологичными конструкциями). Композиции, содержащие химерную конструкцию, также могут включать сегменты, которые являются вариантами аполипопротеинов, или сегменты, созданные так, чтобы они обладали специфичным свойством (например, связывание липидов, связывание рецептора, ферментативные свойства, свойство активировать фермент, антиоксидантные или окислительно-восстановительные свойства) (см. Weisgraber 1990, J. Lipid Res. 31(8):1503-11; Hixson and Powers 1991, J. Lipid Res. 32(9):1529-35; Lackner et al., 1985, J. Biol. Chem. 260(2):703-6; Hoeg et al., 1986, J. Biol. Chem. 261(9):3911-4; Gordon et al., 1984, J. Biol. Chem. 259(1):468-74; Powell et al., 1987, Cell, 50(6):831-40; Aviram et al., 1998, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 18(10):1617-24; Aviram et al., 1998, J. Clin. Invest. 101(8):1581-90; Billecke et al., 2000, Drug Metab. Dispos. 28(11):1335-42; Draganov et al., 2000, J. Biol. Chem. 275(43):33435-42; Steinmetz and Utermann 1985, J. Biol. Chem. 260(4):2258-64; Widler et al., 1980, J. Biol. Chem. 255(21):10464-71; Dyer et al., 1995, J. Lipid Res. 36(1):80-8; Sorenson et al., 1999, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19(9):2214-25; Palgunachari 1996, Arterioscler. Throb. Vasc. Biol. 16(2):328-38; Thurberg et al., J. Biol. Chem. 271(11):6062-70; Dyer 1991, J. Biol. Chem. 266(23):15009-15; Hill 1998, J. Biol. Chem. 273(47):30979-84).

Аполипопротеины, применяемые в изобретении, также включают рекомбинантные, синтетические, полусинтетические или очищенные аполипопротеины. Способы получения аполипопротеинов или им эквивалентные, применяемые в изобретении, хорошо известны специалистам в данной области. Например, аполипопротеины могут быть выделены из плазмы или природных продуктов с помощью, например, центрифугирования в градиенте плотности или иммуноаффинной хроматографии или получены синтетически, полусинтетически или с применением методик рекомбинантных ДНК, известных специалистам в данной области (см., например, Mulugeta et al., 1998, J. Chromatogr. 798(1-2):83-90; Chung et al., 1980, J. Lipid Res. 21(3):284-91; Cheung et al., 1987, J. Lipid Res. 28(8):913-29; Persson, et al., 1998, J. Chromatogr. 711:97-109; патенты США № 5059528, 5834596, 5876968 и 5721114 и PCT публикации WO 86/04920 и WO 87/02062).

Аполипопротеины, применяемые в изобретении, дополнительно включают агонисты аполипопротеинов, такие как пептиды и пептидные аналоги, которые имитируют активность ApoA-I, ApoA-I Milano (ApoA-I_M), ApoA-I Paris (ApoA-I_P), ApoA-II, ApoA-IV и ApoE. Например, аполипопротеин может являться любым из таковых, описанных в патентах США № 6004925, 6037323, 6046166 и 5840688, содержание которых целиком включено в описание в качестве ссылок.

Пептиды-агонисты или пептидные аналоги аполипопротеинов могут быть синтезированы или произведены с применением любой методики пептидного синтеза, известной специалистам в данной области, включая, например, методики, описанные в патентах США № 6004925, 6037323 и 6046166. Например, пептиды могут быть получены с применением методики твердофазного синтеза, первоначально описанной Merrifield (1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154). Другие методики пептидного синтеза можно найти в Bodanszky et al., Peptide Synthesis, John Wiley & Sons, 2nd Ed., (1976) и других литературных источниках, свободно доступных для специалиста в данной области. Резюме по методикам синтеза полипептидов можно найти в Stuart and Young, Solid Phase Peptide. Synthesis, Pierce Chemical Company, Rockford, 111. (1984). Пептиды также могут быть синтезированы способами, использующими синтез в растворе, как описано в The Proteins, Vol. II, 3rd Ed., Neurath et al., Eds., p. 105-237, Academic Press, New York, N.Y. (1976). Защитные группы, пригодные для применения при различных способах пептидного синтеза, описаны в вышеупомянутых текстах, а также в McOmie, Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, New York, N.Y. (1973). Пептиды по настоящему изобретению также могут быть получены путем химического или ферментативного расщепления из более длинной формы, например, аполипопротеина A-I.

В некоторых воплощениях аполипопротеин может являться смесью аполипопротеинов. В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения, аполипопротеин может являться гомогенной смесью, т.е. одним типом аполипопротеина. В другом варианте воплощения, аполипопротеин может являться гетерогенной смесью аполипопротеинов, т.е. смесью двух и более различных аполипопротеинов. Воплощения гетерогенных смесей аполипопротеинов могут включать, например, смесь аполипопротеина из животного источника и аполипопротеина полусинтетического происхождения. В некоторых воплощениях гетерогенная смесь может включать, например, смесь ApoA-I и ApoA-I Milano. В некоторых воплощениях гетерогенная смесь может включать, например, смесь ApoA-I Milano и ApoA-I Paris. Смеси, при-

годные для применения в способах и композициях согласно изобретению будут очевидны для специалиста в данной области.

Если аполипопротеин получен из природных источников, он может быть получен из растительного или животного источника. Если аполипопротеин получен из животного источника, аполипопротеин может происходить из любого биологического вида. В некоторых воплощениях аполипопротеин может быть получен из животного источника. В некоторых воплощениях аполипопротеин может быть получен из источника, полученного от человека. В предпочтительных воплощениях изобретения аполипопротеин происходит из того же биологического вида, что и индивидуум, которому вводится аполипопротеин.

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения целевой ген выбирают из группы, включающей ген фактора VII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, PDGF β ген, ген Erb-B, ген Src, ген CRK, ген GRB2, ген RAS, ген MEKK, ген JNK, ген RAF, ген Erk1/2, ген PCNA(p21), ген MYB, ген JUN, ген FOS, ген BCL-2, ген циклина D, ген VEGF, ген EGFR, ген циклина A, ген циклина E, ген WNT-1, ген β -катенина, ген c-MET, ген PKC, ген NFkB, ген STAT3, ген сурвивина, ген Her2/Neu, ген топоизомеразы I, ген топоизомеразы II a, ген p73, ген p21(WAF1/CIP1), ген p27(KIP1), ген PPM1D, ген RAS, ген кавеолина I, ген MIB I, ген MTA1, ген M68, мутации в генах опухолевых супрессоров, ген опухолевого супрессора p53 и их комбинации. В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения целевой ген является геном, экспрессируемым в печени, например геном фактора VII (FVII). Эффект на экспрессию целевого гена, например гена FVII, оценивают измерением уровня FVII в биологической пробе, такой как сыворотка или образец ткани. Например, уровень FVII может быть определен в крови, например, согласно измерению путем количественного определения активности FVII. В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения может оцениваться уровень мРНК в печени. В другом предпочтительном воплощении проводят по меньшей мере два типа оценки, например одновременно проводят и оценку уровня белка (например, в крови), и измерение уровня мРНК (например, в печени).

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения агент является нуклеиновой кислотой, такой как двухцепочечная РНК (дцРНК).

В другом варианте воплощения настоящего изобретения нуклеиновая кислота-агент является одноцепочечной ДНК или РНК, или двухцепочечной ДНК или РНК, или гибридом ДНК-РНК. Например, двухцепочечная ДНК может быть структурным геном, геном, содержащим регуляторные и терминаторные области, или самореплицирующейся системой, такой как вирусная или плазмидная ДНК. Двухцепочечная РНК может являться, например, дцРНК или другим реагентом РНК-интерференции. Одноцепочечная нуклеиновая кислота может являться, например, антисмысловым олигонуклеотидом, рибозимом, микроРНК или триплекс-образующим олигонуклеотидом.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения в различных временных точках после введения кандидатного агента, биологическая проба, такая как проба жидкости, например крови, плазмы или сыворотки, или образец ткани, такой как образец ткани печени, берут у испытуемого субъекта и испытывают на наличие эффекта агента на уровень экспрессии целевого белка или мРНК. В одном из особо предпочтительных воплощений кандидатный агент является дцРНК, которая направлена против FVII, и биологическую пробу испытывают на наличие эффекта на уровне белка или мРНК фактора FVII. В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения проводят количественное определение уровней содержания в плазме белка FVII, такое как с применением иммуногистохимического анализа или хроматографического анализа. В другом варианте воплощения настоящего изобретения уровни мРНК FVII в печени испытывают с применением количественного определения, такого как метод разветвленных зондов или нозерн-блоттинг или метод ОТ-ПЦР.

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения, агент, например, композиция, включающая улучшенную липидную композицию, оценивается на токсичность. В другом варианте воплощения настоящего изобретения может проводиться мониторинг модельного субъекта на наличие физических эффектов, таких как изменение массы или поведения в клетке.

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения, способ дополнительно включает воздействие агента, например, композиции, содержащей улучшенную липидную композицию, для дальнейшей оценки. Дальнейшая оценка может включать, например, (i) повторение оценки, описанной выше, (ii) повторение оценки, описанной выше, с различным количеством животных или с разными дозами или (iii) оценку другим способом, например, оценку на другом модельном животном например на нечеловекообразном примате.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения делается решение относительно того, включать или не включать агент и улучшенную липидную композицию в дальнейшие исследования, такие как клинические испытания, в зависимости от наблюдаемого эффекта кандидатного агента на уровне белка или мРНК в печени. Например, если наблюдается, что кандидатная дцРНК снижает уровни белка или мРНК по меньшей мере на 20, 30, 40, 50% или более, то агент можно рассматривать для участия в клинических испытаниях.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения делается решение относительно того, включать или не включать агент и улучшенную липидную композицию в фармацевтическую компози-

цию, в зависимости от наблюдаемого эффекта кандидатного агента и аминоклипида на уровне белка или мРНК в печени. Например, если наблюдается, что кандидатная дцРНК снижает уровни белка или мРНК по меньшей мере на 20, 30, 40, 50 или более, то агент можно рассматривать для участия в клинических испытаниях.

Другой особенностью является то, что изобретение предлагает способ оценки улучшенной липидной композиции на ее пригодность к доставке терапевтического агента в клетку. В некоторых вариантах воплощения изобретение предлагает способ оценки улучшенной липидной композиции на ее пригодность к доставке конструкции на основе РНК, например дцРНК, направленного действия на FVII. Способ включает создание композиции, которая содержит дцРНК, направленного действия на FVII, и кандидатного аминоклипида, введение композиции грызуну, например мыши, оценку экспрессии FVII как функцию по меньшей мере одного показателя из уровня FVII в крови или уровня мРНК FVII в печени, что обеспечивает оценку кандидатного аминоклипида. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения способ дополнительно включает сравнение экспрессии целевого гена с заранее выбранным референтным значением.

Композиции, которые включают липидсодержащие компоненты, такие как липосомы, более детально описаны ниже. Примеры агентов на основе нуклеиновых кислот включают двухцепочечную РНК, антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы, микроРНК, иммуностимулирующие олигонуклеотиды или триплекс-образующие олигонуклеотиды. Эти агенты также более подробно описаны ниже.

"Алкил" означает имеющий линейную цепь или разветвленный, нециклический или циклический, насыщенный алифатический углеводород, содержащий от 1 до 24 атомов углерода. Примеры насыщенных, с линейной цепью, алкилов включают метил, этил, н-пропил, н-бутил, н-пентил, н-гексил и т.п.; а насыщенные разветвленные алкилы включают изопропил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, изопентил и т.п. Примеры насыщенных циклических алкилов включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и т.п.; а ненасыщенные циклические алкилы включают циклопентенил и циклогексенил и т.п.

"Алкенил" означает алкил, как определено выше, содержащий по меньшей мере одну двойную связь между соседними атомами углерода. Алкенилы включают как цис-, так и транс-изомеры. Примеры имеющих линейную цепочку и разветвленных алкенилов включают этиленил, пропиленил, 1-бутенил, 2-бутенил, изобутиленил, 1-пентенил, 2-пентенил, 3-метил-1-бутенил, 2-метил-2-бутенил, 2,3-диметил-2-бутенил и т.п.

"Алкинил" означает любой алкил или алкенил, как определено выше, который дополнительно содержит по меньшей мере одну тройную связь между соседними атомами углерода. Примеры имеющих линейную цепочку и разветвленных алкинилов включают ацетиленил, пропиленил, 1-бутинил, 2-бутинил, 1-пентинил, 2-пентинил, 3-метил-1-бутинил и т.п.

"Ацил" означает любой алкил, алкенил или алкинил, где атом углерода в точке присоединения замещен оксогруппой, как определено ниже. Например, -C(=O)алкил, -C(=O)алкенил и -C(=O)алкинил являются ацильными группами.

Термин "арил" означает ароматическую моноциклическую, бициклическую или трициклическую систему колец углеводорода, где любой атом кольца может быть замещен. Примеры арильных остатков включают в качестве неограничивающих примеров фенил, нафтил, антраценил и пиренил.

"Гетероцикл" означает моноциклическое с количеством членов от 5 до 7 или бициклическое с количеством членов от 7 до 10 гетероциклическое кольцо, которое может быть насыщенным, ненасыщенным или ароматическим и которое содержит от 1 до 2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и где гетероатомы азота и серы могут быть необязательно окислены и гетероатом азота может быть необязательно четвертичным, включая бициклические кольца, в которых любые из вышеуказанных гетероциклов сопряжены с бензольным кольцом. Гетероцикл может быть присоединен через любой гетероатом или атом углерода. Гетероциклы включают гетероарилы, как определено ниже. Гетероциклы включают морфолинил, пирролидинонил, пирролидинил, пиперидинил, пиперизинил, гидантоинил, валеролактанил, оксиранил, оксетанил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, тетрагидропиридинил, тетрагидропримидинил, тетрагидроотиофенил, тетрагидропириранил, тетрагидропиримидинил, тетрагидроотиофенил, тетрагидропириранил и т.п.

Термины "необязательно замещенный алкил", "необязательно замещенный алкенил", "необязательно замещенный алкинил", "необязательно замещенный ацил" и "необязательно замещенный гетероцикл" означают, что при наличии замещения по меньшей мере один атом водорода заменен на заместитель. В случае оксозаместителя (=O) замещены два атома водорода. В этом смысле заместители включают оксогруппу, галоген, гетероцикл, -CN, -OR^x, -NR^xR^y, -NR^xC(=O)R^y, -NR^xSO₂R^y, -C(=O)R^x, -C(=O)OR^x, -C(=O)NR^xR^y, -SO_nR^x и -SO_nNR^xR^y, где n равно 0, 1 или 2, R^x и R^y являются одинаковыми или разными и, независимо, являются атомом водорода, алкилом или гетероциклом, и каждый из названных алкильных или гетероциклических заместителей может быть дополнительно замещен одной или несколькими группами из оксогруппы, галогена, -OH, -CN, алкила, -OR^x, гетероцикла, -NR^xR^y, -NR^xC(=O)R^y, -NR^xSO₂R^y, -C(=O)R^x, -C(=O)OR^x, -C(=O)NR^xR^y, -SO_nR^x и -SO_nNR^xR^y.

Термин "гетероарил" означает ароматическую моноциклическую с 5-8 членами, бициклическую с 8-12 членами или трициклическую с 11-14 членами систему колец, имеющую 1-3 гетероатома, если яв-

ляется моноциклической, 1-6 гетероатомов, если является бициклической, или 1-9 гетероатомов, если является трициклической, при этом названные гетероатомы выбраны из O, N или S (например, атомы углерода и 1-3, 1-6 или 1-9 гетероатомов N, O или S, если является моноциклической, бициклической или трициклической соответственно), при этом любой атом кольца может быть замещен. Гетероарильные группы, описанные в этом документе, также могут содержать сопряженные кольца, имеющие общую углерод-углеродную связь.

Термин "алкилгетероцикл" означает гетероарил, где по меньшей мере один из атомов кольца замещен алкилом, алкенилом или алкинилом.

Термин "замещенный" означает замену одного или нескольких радикалов водорода в данной структуре радикалом специфического заместителя, включая в качестве неограничивающих примеров галоген, алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероцикл, тиол, алкилтио, оксогруппу, тиокси, арилтио, алкилтиоалкил, арилтиоалкил, алкилсульфонил, алкилсульфонилалкил, арилсульфонилалкил, алкокси, арилокси, аралкокси, аминокарбонил, алкиламинокарбонил, ариламинокарбонил, алкоксикарбонил, арилоксикарбонил, галоалкил, аминоксигруппу, трифторометил, цианогруппу, нитрогруппу, алкиламино, ариламино, алкиламиноалкил, ариламиноалкил, аминалоалкиламино, гидроксигруппу, алкоксиалкил, карбоксиалкил, алкоксикарбонилалкил, аминокарбонилалкил, ацил, аралкоксикарбонил, карбоновую кислоту, сульфоновую кислоту, сульфонил, фосфоновую кислоту, арил, гетероарил, гетероциклическую и алифатическую группу. При этом понимается, что заместитель может быть дополнительно замещенным.

"Галоген" означает фтор, хлор, бром и йод.

Термины "алкиламин" и "диалкиламин" означают радикалы -NH(алкил) и -N(алкил)₂ соответственно.

Термин "алкилфосфат" означает -O-P(Q')(Q'')-O-R, где Q' и Q'' являются каждый независимо O, S, N(R)₂, необязательно замещенными алкилом или алкоксигруппой; и R необязательно замещенный алкил, ω-аминоалкил или ω-(замещенный)аминоалкил.

Термин "алкилфосфоротиоат" означает алкилфосфат, где по меньшей мере один из Q' или Q'' является S.

Термин "алкилфосфонат" означает алкилфосфат, где по меньшей мере один из Q' или Q'' является алкилом.

Термин "гидроксиалкил" означает радикал -O-алкил.

Термин "алкилгетероцикл" означает алкил, где по меньшей мере один метилен был заменен на гетероцикл.

Термин "ω-аминоалкил" означает радикал -алкил-NH₂. Термин "ω-(замещенный)аминоалкил" означает ω-аминоалкил, где по меньшей мере один из атомов H у N был заменен алкилом.

Термин "ω-фосфоалкил" означает -алкил-O-P(Q')(Q'')-O-R, где Q' и Q'' каждый независимо являются O или S и R необязательно замещенный алкил.

Термин "ω-тиофосфоалкил" означает ω-фосфоалкил, где по меньшей мере один из Q' или Q'' является S.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения способы согласно изобретению могут требовать применения защитных групп. Методология защитных групп хорошо известна специалистам в данной области (см., например, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Green, T.W. et al., Wiley-Interscience, New York City, 1999). В кратком изложении, защитные группы в контексте настоящего изобретения являются любой группой, которая снижает или избавляет от нежелательной реактивности функциональную группу. Защитная группа может быть добавлена к функциональной группе для маскирования ее реактивности во время определенных реакций, и после этого удаляется для высвобождения исходной функциональной группы. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения применяют "группу, защищающую спиртовую группу". "Группа, защищающая спиртовую группу" является любой группой, которая снижает или избавляет от нежелательной реактивности спиртовую функциональную группу. Защитные группы могут быть добавлены и удалены с применением способов, хорошо известных специалистам в данной области.

Липидные частицы.

Агенты и/или аминоклипы для испытания в модельном скрининге с применением клеток печени, описанном в этом документе, могут быть помещены в липидные частицы. Липидные частицы включают в качестве неограничивающих примеров липосомы. При использовании в этом документе, липосома является структурой, имеющей липидосодержащие мембраны, заключающие водную внутреннюю область. Липосомы могут иметь одну или несколько липидных мембран. Изобретение предполагает как однослойные липосомы, которые называют одноламеллярными, так и многослойные липосомы, которые называют мультламеллярными. При образовании комплекса с нуклеиновыми кислотами липидные частицы могут также являться липоплексами, которые состоят из бислоев катионных липидов, размещенных как в сэндвиче между слоями ДНК, как описано, например, в Feigner, *Scientific American*.

Липидные частицы могут дополнительно включать один или несколько дополнительных липидов и/или других компонентов, таких как холестерин. Другие липиды могут быть включены в композиции липосом с различными целями, такими как предотвращение окисления липидов или присоединение ли-

гандов на поверхности липосомы. Любой из ряда липидов может присутствовать, включая амфипатические, нейтральные, катионные и анионные липиды. Такие липиды могут применяться поодиночке или в сочетании. Конкретные примеры дополнительных липидных компонентов, которые могут присутствовать, описаны ниже.

Дополнительные компоненты, которые могут присутствовать в липидной частице, включают стабилизирующие бислои компоненты, такие как полиамидные олигомеры (см., например, патент США № 6320017), пептиды, белки, детергенты, производные липидов, такие как соединенный с ПЭГ фосфатидилэтаноламин и конъюгированные с ПЭГ церамиды (см. патент США № 5885613). В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения липидная частица включает агент направленного действия, такой как нацеливающий липид, описанный в этом документе.

Липидная частица может включать один или несколько из второго аминокислотного или катионного липида, нейтрального липида, стерина и липид, выбранный для снижения агрегации липидных частиц во время их формирования, которое может быть результатом стерической стабилизации частиц, предотвращающей индуцируемую зарядами агрегацию при формировании.

При использовании в этом документе предполагается, что термин "катионный липид" включает липиды, которые имеют одну или две жирнокислотные или жирные алкильные цепи и аминокислотную группу головки (включая алкиламино или диалкиламино группу), которая может быть протонирована с образованием катионного липида при физиологическом pH. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения катионный липид называется "аминолипидом".

Другие катионные липиды могут включать липиды, имеющие другие варианты жирнокислотных групп и другие диалкиламиногруппы, включая такие, в которых заместители алкила различны (например, N-этил-N-метиламино-, N-пропил-N-этиламино- и т.п.) В целом, липиды (например, катионный липид), имеющие менее насыщенные ацильные цепи, легче разделяются по размеру, в частности, когда комплексы разделяют по размеру в области менее 0,3 мкм, для целей стерилизации на фильтре. Катионные липиды, содержащие ненасыщенные жирные кислоты с длинами углеродной цепи в диапазоне от C₁₀ до C₂₀, являются предпочтительными. Другие остовы могут применяться для разделения аминокислотной группы (например, аминокислотной группы катионного липида) и жирнокислотной или жирной алкильной части катионного липида. Пригодные остовы известны для специалиста в данной области.

В некоторых воплощениях катионные липиды содержат по меньшей мере одну способную к протонированию или депротонированию группу, такую, что липид положительно заряжен при pH, равном или ниже физиологического pH (например, pH 7,4), и является нейтральным при втором значении pH, предпочтительно равном или выше физиологического pH. Такие липиды также называют катионными липидами. Безусловно, понятно, что добавление или удаление протонов как функция от значения pH является равновесным процессом и что упоминание заряженного или нейтрального липида относится к природе преобладающих видов и не требует, чтобы все липиды присутствовали в заряженной или нейтральной форме. Липиды, имеющие более одной способной к протонированию или депротонированию группы или являющиеся цвиттерионными, не исключены из применения в изобретении.

В некоторых воплощениях способные к протонированию липиды (т.е. катионные липиды) имеют рКа способной к протонированию группы в диапазоне от примерно 4 до примерно 11. Наиболее предпочтительные значения рКа составляют от примерно 4 до примерно 7, так как такие липиды будут находиться в катионной форме при более низких значениях pH на стадии получения композиции, в то же время частицы будут в основном (хотя и не полностью) иметь нейтральную поверхность при физиологическом pH примерно 7,4. Одним из преимуществ такого значения рКа является то, что по меньшей мере некоторые нуклеиновые кислоты, ассоциированные с внешней поверхностью частицы, будут терять электростатическое взаимодействие при физиологическом значении pH и будут удаляться под действием простого диализа; существенно уменьшая таким образом подверженность частиц клиренсу.

Примеры липидов, которые снижают агрегацию частиц во время формирования, включают полиэтиленгликоль (ПЭГ)-модифицированные липиды, моносиалоганглиозиды G_{M1} и полиамидные олигомеры ("ПАО"), как описано в патенте США № 6320017). Другие соединения с незаряженными, гидрофильными, создающими стерические барьеры остатками, которые предотвращают агрегацию во время получения композиции, такие как ПЭГ, G_{M1} или АТТА, также могут быть присоединены к липидам для применения в способах и композициях согласно изобретению. АТТА-липиды описаны, например, в патенте США № 6320017, и конъюгаты ПЭГ-липидов описаны, например, в патентах США № 5820873, 5534499 и 5885613. В типичном случае концентрация липидного компонента, выбранного для снижения агрегации, составляет примерно от 1 до 15% (в мольных процентах липида).

Примерами липидов, которые снижают агрегацию и/или пригодны для конъюгации с агентами, являющимися нуклеиновыми кислотами, которые могут применяться в модельном скрининге с применением клеток печени, служат полиэтиленгликоль (ПЭГ)-модифицированные липиды, моносиалоганглиозиды G_{M1}, и полиамидные олигомеры ("ПАО"), такие как описаны в патенте США № 6320017. Другие соединения с незаряженными, гидрофильными, создающими стерические барьеры остатками, которые предотвращают агрегацию во время получения композиции, такие как ПЭГ, G_{M1} или АТТА, также могут быть присоединены к липидам для применения в способах и композициях согласно изобретению.

АТТА-липиды описаны, например, в патенте США № 6320017, и конъюгаты ПЭГ-липидов описаны, например, в патентах США № 5820873, 5534499 и 5885613. В типичном случае, концентрация липидного компонента, выбранного для снижения агрегации, составляет примерно от 1 до 15% (в мольных процентах липида).

Конкретные примеры ПЭГ-модифицированных липидов (или липидно-полиоксиэтиленовых конъюгатов), которые полезны для изобретения, могут иметь различные "заякоривающие" липидные части для размещения ПЭГ-части на поверхности липидной везикулы. Примеры пригодных ПЭГ-модифицированных липидов включают ПЭГ-модифицированный фосфатидилэтаноламин и фосфатидную кислоту, конъюгаты ПЭГ с церамидами (например, ПЭГ-CerC₁₄ или ПЭГ-CerC₂₀), которые описаны в находящейся в процессе одновременного рассмотрения заявке USSN 08/486214, включенной в этот документ в качестве ссылки, ПЭГ-модифицированные диалкиламины и ПЭГ-модифицированные 1,2-диацилоксипропан-3-амины. Наиболее предпочтительными являются ПЭГ-модифицированные диацилглицерол и диалкилглицерол. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения суммарное содержание в мольных процентах ПЭГ-липидов в составе частицы составляет примерно 1,5 мол.%. Например, когда в состав частицы входит множество ПЭГ-липидов, описанных в этом документе, таких как ПЭГ-модифицированные липиды, описанные выше, и содержащие ПЭГ липиды направленного действия суммарное количество ПЭГ-содержащих липидов, взятых вместе, составляет примерно 1,5 мол.%.

В вариантах воплощения, где стерически объемные остатки, такие как ПЭГ или АТТА, конъюгированы с липидным якорем, выбор липидного якоря зависит от того, какой тип ассоциации с липидной частицей должен иметь конъюгат. Хорошо известно, что теПЭГ (мол. масса 2000)-диастеароилфосфатидилэтаноламин (ПЭГ-ДСФЭ) остается в ассоциации с липосомой вплоть до того момента, как частица удаляется из циркуляции, возможно, в течение периода, исчисляемого днями. Другие конъюгаты, такие как ПЭГ-CerC₂₀, имеют схожую способность сохранять ассоциацию. Однако ПЭГ-CerC₁₄ быстро удаляется из композиции при воздействии сыворотки, с T_{1/2} менее 60 мин, согласно ряду исследований с количественным определением. Как наглядно показано в заявке на патент США SN 08/486214, по меньшей мере три параметра влияют на скорость обмена: длина ацильной цепи, степень насыщения ацильной цепи и размер создающей стерический барьер группы головки липида. Соединения, имеющие пригодные варианты этих характеристик, могут быть полезны для изобретения. Для некоторых терапевтических применений может быть предпочтительно, чтобы ПЭГ-модифицированный липид быстро удалялся из липидной частицы нуклеиновой кислоты *in vivo* и, следовательно, ПЭГ-модифицированный липид будет обладать относительно короткими заякоривающими липидными частями. В других терапевтических применениях может быть предпочтительно, чтобы липидная частица нуклеиновой кислоты обладала более длительным временем сохранения в плазме кровеносной системы и, следовательно, ПЭГ-модифицированный липид будет обладать относительно более длинными заякоривающими липидными частями. Примеры заякоривающих липидных частей включают таковые с длиной от примерно C₁₄ до примерно C₂₂, предпочтительно от примерно C₁₄ до примерно C₁₆. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения остаток ПЭГ, например, mПЭГ-NH₂, имеет размер примерно 1000, 2000, 5000, 10000, 15000 или 20000 Да.

Следует отметить, что соединения, предотвращающие агрегацию, необязательно требуют конъюгации с липидом для правильного функционирования. Присутствие свободного ПЭГ или свободного АТТА в растворе может быть достаточным для предотвращения агрегации. Если частицы стабильны после получения композиции, ПЭГ или АТТА могут быть удалены с помощью диализа перед введением субъекту.

Нейтральные липиды, если они присутствуют в липидной частице, могут являться любым из ряда типов липидов, которые существуют либо в незаряженной, либо в нейтральной цвиттерионной форме при физиологическом значении pH. Такие липиды включают, например, диацилфосфатидилхолин, диацилфосфатидилэтаноламин, церамид, сфингомиелин, дигидросфингомиелин, кефалин и цереброзиды. Выбор нейтральных липидов для применения в частицах, описанных в этом документе, в общем случае зависит от соображений, касающихся, например, размера липосом и стабильности липосом в кровотоке. Предпочтительно компонент, представленный нейтральным липидом, является липидом, имеющим две ацильные группы (т.е. диацилфосфатидилхолином и диацилфосфатидилэтаноламином). Липиды, имеющие различные группы ацильных цепей с разной длиной цепи и степенью насыщенности, доступны или могут быть выделены или синтезированы с применением хорошо известных способов. В одной группе вариантов воплощения являются предпочтительными липиды, содержащие насыщенные жирные кислоты с длинами углеродной цепи в диапазоне от C₁₄ до C₂₂. В другой группе вариантов воплощения применяют липиды, содержащие моно- или диненасыщенные жирные кислоты с длинами углеродной цепи в диапазоне от C₁₄ до C₂₂. Дополнительно, могут применяться липиды, содержащие смеси насыщенных и ненасыщенных жирнокислотных цепей. Предпочтительно нейтральные липиды, применяемые в изобретении, являются ДОФЭ, ДСФХ, ДПФХ, ПОФХ или любым родственным фосфатидилхолином. Нейтральные липиды, применяемые в настоящем изобретении, могут также состоять из сфингомиелина, дигидросфингомиелина или фосфолипидов с другими группами головки, такими как серин и инозитол.

Стеринный компонент липидной смеси, если он присутствует, может являться любым из стерина,

стандартно применяемых в области получения липосом, липидных везикул или липидных частиц. Предпочтительным стерином является холестерин.

Другие катионные липиды, несущие суммарный положительный заряд при близких к физиологическому значению рН, в дополнение к таковым, специально описанным выше, также могут быть включены в липидные частицы согласно изобретению. Такие катионные липиды включают в качестве неограничивающих примеров:

- N,N-диолеил-N,N-диметиламмония хлорид ("DODAC");
- N-(2,3-диолеилокси)пропил-N,N-N-триэтиламмония хлорид ("DOTMA");
- N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония бромид ("DDAB");
- N-(2,3-диолеилокси)пропил-N,N,N-триметиламмония хлорид ("DOTAP");
- 1,2-диолеилокси-3-триметиламинопропана хлорид ("DOTAP.C1");
- 3 β -(N-(N',N'-диметиламиноэтан)карбамоил)холестерин ("DC-Chol");
- N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N-2-(сперминкарбоксамидо)этил-N,N-диметиламмония трифторацетат ("DOSPA");
- диоктадециламидоглицил карбоксиспермин ("DOGS");
- 1,2-диолеил-sn-3-фосфоэтанолламин ("ДФЭ");
- 1,2-диолеил-3-диметиламмония пропан ("DODAP");
- N,N-диметил-2,3-диолеилокси)пропиламин ("DODMA") и
- N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксиэтиламмония бромид ("DMRIE").

Дополнительно, может быть применен ряд коммерчески доступных препаратов катионных липидов, таких как, например, LIPOFECTIN (содержащий DOTMA и ДФЭ, поставляемый GIBCO/BRL) и LIPOFECTAMINE (содержащий DOSPA и ДФЭ, поставляемый GIBCO/BRL). В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения катионный липид является аминоклипом.

Анионные липиды, пригодные для применения в липидных частицах согласно изобретению включают в качестве неограничивающих примеров фосфатидилглицерин, кардиолипин, диацилфосфатидилсерин, диацилфосфатидную кислоту, N-додеканоил фосфатидилэтанолламин, N-сукцинил фосфатидилэтанолламин, N-глутарил фосфатидилэтанолламин, лизилфосфатидилглицерин и другие анионные модифицированные группы, соединенные с нейтральными липидами.

В большом числе вариантов воплощения, в липидные частицы согласно изобретению включены амфипатические липиды. Термин "амфипатические липиды" означает любой пригодный материал, где гидрофобная часть липидного материала ориентирована внутрь гидрофобной фазы, а гидрофильная часть ориентирована в направлении водной фазы. Такие соединения включают в качестве неограничивающих примеров фосфолипиды, аминоклипы и сфинголипиды. Примеры фосфолипидов включают сфингомиелин, фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидную кислоту, пальмитоилолеилфосфатидилхолин, лизофосфатидилхолин, лизофосфатидилэтанолламин, дипальмитоилфосфатидилхолин (ДФФХ), диолеилфосфатидилхолин (ДФХ), дистеароилфосфатидилхолин (ДФХ), димиристоилфосфатидилхолин (ДФХ) или дилинолеилфосфатидилхолин (ДФХ). Также могут применяться другие соединения, не содержащие фосфора, такие как сфинголипиды, члены семейства гликоксфинголипидов, диацилглицерины и β -ацилоксикислоты. Дополнительно, такие амфипатические липиды могут быть легко смешаны с другими липидами, такими как триглицериды и стерин.

Для включения в липидные частицы согласно изобретению также пригодны липиды, обуславливающие программируемое слияние. Такие липидные частицы имеют слабую склонность к слиянию с клеточными мембранами и высвобождению своей полезной нагрузки до наступления определенного сигнального события. Это позволяет достичь более равномерного распределения липидных частиц после инъекции в организм или пораженный участок перед тем, как они начнут сливаться с клетками. Сигнальным событием может быть, например, изменение рН, температуры, ионного окружения или время. В последнем случае компонент, задерживающий слияние, или "маскирующий" компонент, такой как конъюгат АТГА-липиды или конъюгат ПЭГ-липиды, может просто удаляться в результате обмена с мембраны липидной частицы с течением времени. Примеры закоривающих липидных частей включают таковые с длиной от примерно C_{14} до примерно C_{22} , предпочтительно от примерно C_{14} до примерно C_{16} . В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения остаток ПЭГ, например mПЭГ-NH₂, имеет размер примерно 1000, 2000, 5000, 10000, 15000 или 20000 Да.

К моменту времени, когда липидная частица должным образом распределяется в организме, она теряет существенный маскирующий агент, становясь таким образом фузогенной. В случае других сигнальных событий, желательным выбирать сигнал, который ассоциирован с пораженным участком или целевой клеткой, такой как повышение температуры в месте воспаления.

Липидная частица, конъюгированная с агентом, представленным нуклеиновой кислотой, может также включать остаток направленного действия, например остаток направленного действия, специфичный к типу клеток или ткани. Осуществление направленного действия липидных частиц с применением различных остатков направленного действия, таких как лиганды, поверхностные рецепторы клеток, гли-

копротеины, витамины (например, рибофлавин) и моноклональные антитела, было описано ранее (см., например, патенты США № 4957773 и 4603044). Примеры остатков направленного действия включают липид направленного действия, такой как нацеливающий липид, описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения липид направленного действия является GaINAc, содержащим липид направленного действия, таким как GaINAc3-ДСГ и GaINAc3-ПЭГ-ДСГ, как описано в этом документе. Остатки направленного действия могут включать целый белок или его фрагменты. Механизмы направленного действия в общем случае требуют, чтобы агенты направленного действия были расположены на поверхности липидной частицы таким образом, чтобы остаток направленного действия был доступен для взаимодействия с целью, например, рецептором клеточной поверхности. Целый ряд различных агентов направленного действия и способов известны и доступны специалистам в данной области, включая таковые, описанные, например, в Sarga, P. and Allen, T.M., *Prog. Lipid Res.* 42(5):439-62 (2003) и Abra, R.M. et al., *J. Liposome Res.* 12:1-3, (2002).

Было предложено применение для реализации направленного действия липидных частиц, т.е. липосом, чья поверхность покрыта гидрофильными полимерными цепями, такими как полиэтиленгликолевые (ПЭГ) цепи (Allen, et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1237:99-108 (1995); DeFrees, et al., *Journal of the American Chemistry Society*, 118:6101-6104 (1996); Blume, et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1149:180-184 (1993); Klibanov, et al., *Journal of Liposome Research*, 2:321-334 (1992); U.S. Patent No. 5,013556; Zalipsky, *Bioconjugate Chemistry*, 4:296-299 (1993); Zalipsky, *FEBS Letters*, 353:71-74 (1994); Zalipsky, in *Stealth Liposomes Chapter 9 (basic and Martin, Eds) CRC Press, Boca Raton Fl* (1995). В одном из способов лиганд, такой как антитело, служащий для направленного действия липидной частицы, соединен с полярной группой головки липидов, образующих липидную частицу. В другом способе лиганд направленного действия присоединен к дистальным концам ПЭГ-цепочек, образующих гидрофильную полимерную оболочку (Klibanov, et al., *Journal of Liposome Research*, 2:321-334 (1992); Kirpotin et al., *FEBS Letters*, 388:115-118 (1996)).

Могут быть применены стандартные способы присоединения целевых агентов. Например, могут применяться фосфатидилэтаноламин, который может быть активирован для присоединения целевых агентов, или производные липофильные соединения, такие как производное липида блеомицин. Липосомы направленного действия с помощью антител могут быть сконструированы с применением, например, липосом, в которые внедрен белок А (см. Renneisen, et al., *J. Bio. Chem.*, 265:16337-16342 (1990) and Leonetti, et al., *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)*, 87:2448-2451 (1990). Другие примеры конъюгации с антителами описаны в патенте США № 6027726, идеи которого включены в описание в качестве ссылок. Примеры остатков направленного действия также могут включать другие белки, специфичные к клеточным компонентам, в том числе к антигенам, ассоциированным с новообразованиями и опухолями. Белки, применяемые в качестве остатков направленного действия, могут быть присоединены к липосомам ковалентными связями (см. Heath, *Covalent Attachment of Proteins to Liposomes*, 149 *Methods in Enzymology* 111-119 (Academic Press, Inc. 1987)). Другие способы направленного действия включают биотин-авидиновую систему.

В одном из примеров воплощения настоящего изобретения, липидная частица содержит смесь катионного липида по настоящему изобретению, нейтральных липидов (отличных от катионного липида), стерина (например, холестерина) и ПЭГ-модифицированного липида (например, ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-сDMA). В некоторых воплощениях липидная смесь состоит из или в существенной степени состоит из катионного липида по настоящему изобретению, нейтрального липида, холестерина и ПЭГ-модифицированного липида. В дополнительных предпочтительных воплощениях липидная частица состоит из или в существенной степени состоит из вышеуказанной липидной смеси с молярными соотношениями примерно 20-70% DLin-M-C3-DMA:5-45% нейтрального липида:20-55% холестерина:0,5-15% ПЭГ-модифицированного липида.

В некоторых вариантах воплощения липидная частица состоит из или в существенной степени состоит из DLin-M-C3-DMA, ДСФХ, холестерина и либо ПЭГ-ДМГ, либо ПЭГ-сDMA, например, в молярном соотношении примерно 20-60% DLin-M-C3-DMA:5-25% ДСФХ:25-55% холестерина:0,5-15% ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-сDMA. В некоторых вариантах воплощения молярное соотношение липидов составляет примерно 40/10/40/10 (мол.% DLin-M-C3-DMA/ДСФХ/холестерин/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-сDMA), 35/15/40/10 (мол.% DLin-M-C3-DMA/ДСФХ/холестерин/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-сDMA) или 52/13/30/5 (мол.% DLin-M-C3-DMA/ДСФХ/холестерин/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-сDMA).

В другой группе вариантов воплощения нейтральный липид, ДСФХ, в этих композициях заменен на ПОФХ, ДПФХ, ДОФЭ или SM.

Композиции и составы липидных частиц, содержащих терапевтический агент.

Изобретение включает композиции, содержащие липидную частицу согласно изобретению и активный агент, при этом активный агент ассоциирован с липидной частицей. В некоторых вариантах воплощения активный агент является терапевтическим агентом. В некоторых вариантах воплощения активный агент инкапсулирован внутри водной внутренней области липидной частицы. В других вариантах воплощения активный агент находится в одном или нескольких липидных слоях липидной частицы. В других вариантах воплощения активный агент связан с внешней или внутренней поверхностью липидного

слоя липидной частицы.

"Полностью инкапсулированный" при использовании в этом документе означает, что нуклеиновая кислота в частицах не подвергается существенной деградации после воздействия сыворотки или в ходе анализа с применением нуклеаз, что вызвало бы существенную деградацию свободной ДНК. В полностью инкапсулированной системе предпочтительно менее 25% нуклеиновой кислоты в частице деградирует в условиях обработки, при которых в норме было бы деградировано 100% свободной нуклеиновой кислоты, более предпочтительно - менее 10% и наиболее предпочтительно - менее 5% нуклеиновой кислоты в частице деградирует. В соответствии с другим вариантом полное инкапсулирование может быть определено анализом с помощью Oligreen®. Oligreen® - это сверхчувствительный флуоресцентный краситель нуклеиновых кислот для количественного определения олигонуклеотидов и одноцепочечной ДНК в растворе (поставляемый фирмой Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния, США). Полное инкапсулирование также предполагает, что частицы устойчивы к действию сыворотки, т.е. что они не претерпевают быструю разборку на компоненты после введения *in vivo*.

Активные агенты, при использовании в этом документе, включают любую молекулу или соединение, способные оказывать требуемый эффект на клетку, ткань, орган или субъект. Такие эффекты могут быть, например, биологическими, физиологическими или косметическими.

Активные агенты могут являться молекулой или соединением любого типа, включая, например, нуклеиновые кислоты, пептиды и полипептиды, в том числе, например, антитела, такие как, например, поликлональные антитела, моноклональные антитела, фрагменты антител; гуманизированные антитела, рекомбинантные антитела, рекомбинантные антитела человека и антитела Primatized™, цитокины, факторы роста, апоптотические факторы, факторы, индуцирующие дифференцировку, поверхностные рецепторы клеток и их лиганды; гормоны; и малые молекулы, в том числе малые органические молекулы или соединения.

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения активный агент является терапевтическим агентом, или его солью или производным. Производные терапевтических агентов могут быть терапевтически активными сами или они могут являться пролекарствами, которые становятся активными после дополнительной модификации. Таким образом, в одном из вариантов воплощения производное терапевтического агента сохраняет часть или всю терапевтическую активность по сравнению с немодифицированным агентом, а в другом варианте воплощения производное терапевтического агента не обладает терапевтической активностью.

В различных вариантах воплощения терапевтические агенты включают любой терапевтически эффективный агент или лекарственное средство, такие как противовоспалительные соединения, антидепрессанты, стимуляторы, анальгетики, антибиотики, противозачаточный препарат, жаропонижающие средства, сосудорасширяющие средства, анти-ангиогенные средства, цитоваскулярные агенты, ингибиторы передачи сигнала, кардиоваскулярные лекарственные препараты, например антиаритмические агенты, сосудосуживающие средства, гормоны и стероиды.

В некоторых воплощениях терапевтический агент является онкологическим лекарственным препаратом, который также может называться противоопухолевым лекарственным препаратом, противораковым лекарственным препаратом, препаратом для лечения опухолей, противонеопластическим лекарственным препаратом и т.п. Примерами онкологических лекарственных препаратов, которые могут применяться в соответствии с изобретением, включают в качестве неограничивающих примеров адриамицин, алкеран, аллопуринол, алтретамин, амифостин, анастрозол, агаС, триоксид мышьяка, азатиоприн, бексаротен, b1CNU, блеомицин, бусульфан внутривенно, бусульфан перорально, капецитабин (Кселода), карбоплатин, кармустин, CCNU, цеlexоксид, хлорамбуцил, цисплатин, кладрибин, циклоспорин А, цитарабин, цитозина арабинозид, даунорубин, цитоксан, даунорубин, дексаметазон, дексразоксан, додетаксел, доксорубин, доксорубин, DTIC, эпирубин, эстрамустин, этопозида фосфат, этопозид и VP-16, эксеместан, FK506, флударабин, фторурацил, 5-FU, гемцитабин (Гемзар), гемтузумаб-озогамицин, гозерелина ацетат, гидреа, гидроксимочевину, идарубин, ифосфамид, иматиниба мезилат, интерферон, иринотекан (Камптостар, СРТ-111), летрозол, лейковорин, лейстатин, лейпролид, левамизол, литретиноин, мегастрол, мелфалан, L-РАМ, месну, метотрексат, метоксалан, митрамицин, митомицин, митоксантрон, азотистый иприт, паклитаксел, памидронат, пегадемазу, пентостатин, натрия порфирин, преднизон, ритуксан, стрептозоцин, STI-571, тамоксифен, таксотер, темозоламид, тенипозид, VM-26, топотекан (Гикамтин), торемифен, третиноин, АТРА, валрубин, велбан, винбластин, винкристин, VP 16 и винорелбин. Другими примерами онкологических лекарственных препаратов, которые могут применяться в соответствии с изобретением, являются эллиптицин и аналоги или производные эллиптицина, эпотилоны, ингибиторы внутриклеточных киназ и камптотецины.

Липидо-нуклеиновые кислотные частицы.

В некоторых воплощениях липидные частицы согласно изобретению ассоциированы с нуклеиновой кислотой с образованием липидо-нуклеиновой кислотной частицы. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота полностью инкапсулирована в липидной частице. Подразумевается, что, при использовании в этом документе термин "нуклеиновая кислота" включает любой олигонуклеотид или полинуклеотид.

Фрагменты, содержащие до 50 нуклеотидов, обычно называют олигонуклеотидами, а более длинные фрагменты называют полинуклеотидами. В некоторых воплощениях олигонуклеотиды согласно изобретению имеют длину 20-50 нуклеотидов.

В контексте настоящего изобретения термины "полинуклеотид" и "олигонуклеотид" относятся к полимеру или олигомеру нуклеотидных или нуклеозидных мономеров, состоящему из природного происхождения оснований, сахаров и межсахарных (остовных) связей. Термины "полинуклеотид" и "олигонуклеотид" также включают полимеры или олигомеры, содержащие мономеры не природного происхождения или их части, с функциональным сходством. Такие модифицированные или замещенные олигонуклеотиды часто имеют превосходство над нативными формами благодаря своим свойствам, таким как, например, более интенсивное поглощение клетками и повышенная стабильность в присутствии нуклеаз.

Олигонуклеотиды относят к дезоксирибоолигонуклеотидам или рибоолигонуклеотидам. Дезоксирибоолигонуклеотид состоит из 5-углеродного сахара, называемого дезоксирибозой, ковалентно соединенного с фосфатом в положениях 5'- и 3'-углеродных атомов сахара с образованием чередующегося неразветвленного полимера. Рибоолигонуклеотид состоит из похожей повторяющейся структуры, где 5-углеродный сахар представлен рибозой.

Нуклеиновая кислота, присутствующая в липидо-нуклеиновой частице в соответствии с настоящим изобретением, включает любую известную форму нуклеиновой кислоты. Нуклеиновые кислоты, применяемые в этом изобретении, могут быть одноцепочечной ДНК или РНК, или двухцепочечной ДНК или РНК, или гибридом ДНК-РНК. Примеры двухцепочечной ДНК включают структурные гены, гены, содержащие контрольные и терминаторные области и самореплицирующиеся системы, такие как вирусная или плазмидная ДНК. Примеры двухцепочечной РНК включают siРНК и другие реагенты РНК интерференции. Одноцепочечные нуклеиновые кислоты включают, например, антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы, микроРНК и триплекс-образующие олигонуклеотиды.

Нуклеиновые кислоты согласно изобретению могут иметь различную длину, в основном в зависимости от конкретной формы нуклеиновой кислоты. Например, в некоторых воплощениях плазмиды или гены могут иметь длину от 1000 до 100000 нуклеотидных остатков. В некоторых воплощениях длина олигонуклеотидов может варьировать от примерно 10 до 100 нуклеотидов. В различных родственных вариантах воплощения олигонуклеотиды, как одноцепочечные, так и двухцепочечные и трехцепочечные, могут иметь длину в диапазоне от примерно 10 до примерно 50 нуклеотидов, от примерно 20 до примерно 50 нуклеотидов, от примерно 15 до примерно 30 нуклеотидов, от примерно 20 до примерно 30 нуклеотидов в длину.

В некоторых воплощениях олигонуклеотид (или его цепь) согласно изобретению специфично гибридизуется с целевым полинуклеотидом или является комплементарным ему. "Специфично гибридизуется" и "комплементарен" - это термины, которые применяются для указания на существенную степень комплементарности, такую что происходит стабильное и специфичное связывание между ДНК- или РНК-мишенью и олигонуклеотидом. При этом понимается, что олигонуклеотид необязательно должен быть на 100% комплементарен нуклеотидной последовательности своей мишени, чтобы быть способным к специфичной гибридизации. Олигонуклеотид способен к специфичной гибридизации, когда связывание олигонуклеотида с мишенью препятствует нормальной функции целевой молекулы и вызывает потерю ее полезной функции или экспрессии, и имеется существенная степень комплементарности, чтобы избежать неспецифичного связывания олигонуклеотида с нецелевыми последовательностями в условиях, в которых требуется специфичное связывание, т.е. в физиологических условиях в случае анализа *in vivo* или терапевтического лечения, или, в случае анализа *in vitro*, в условиях, в которых такой анализ проводится. Таким образом, в других вариантах воплощения данный олигонуклеотид включает 1, 2 или 3 замены оснований по сравнению с областью гена или последовательности мРНК, которая является мишенью или с которой он специфично гибридизуется.

Нуклеиновые кислоты, участвующие в РНК-интерференции.

В некоторых вариантах воплощения липидо-нуклеиновые частицы согласно изобретению ассоциированы с молекулами, участвующими в РНК-интерференции (РНКi). Способы, включающие РНК-интерференцию с применением молекул, участвующих в РНКi, могут применяться для нарушения экспрессии рассматриваемого гена или полинуклеотида. За последние 5 лет малые интерферирующие РНК (siРНК) в существенной степени заменили антисмысловые олигодезоксирибонуклеотиды и рибозимы в качестве следующего поколения разрабатываемых лекарственных препаратов в виде олигонуклеотидов направленного действия. SiРНК являются РНК-дуплексами, в норме имеющими длину 21-30 нуклеотидов, которые могут ассоциировать с цитоплазматическим мультитебелковым комплексом, известным как индуцируемый РНКi комплекс сайленсинга (RISC). RISC в связи с siРНК опосредует деградацию гомологичных транскриптов мРНК, таким образом, siРНК может быть сконструирована так, чтобы подавлять экспрессию белка с высокой специфичностью. В отличие от других технологий, использующих антисмысловые нуклеиновые кислоты, siРНК функционируют посредством природного механизма, вовлеченного в контроль экспрессии генов с помощью некодирующих РНК. Считается, что это является причиной того, что их активность является более сильной *in vitro* и *in vivo*, чем у антисмысловых олигодезоксирибонуклеотидов или рибозимов. Различные реагенты, участвующие в РНКi, вклю-

чая siРНК, направленные на клинически значимые мишени, находятся в настоящее время в фармацевтической разработке, как описано, например, в de Fougerolles, A. et al., *Nature Reviews*, 6:443-453 (2007).

Хотя первыми описанными молекулами, участвующими в РНКi, были гибриды РНК:РНК, содержащие РНК как в качестве смысловой цепи, так и в качестве антисмысловой цепи, к настоящему времени было показано, что гибриды смысловая ДНК:антисмысловая РНК, гибриды смысловая РНК:антисмысловая ДНК и гибриды ДНК:ДНК способны опосредовать РНКi (Lamberton, J.S. and Christian, A.T. (2003), *Molecular Biotechnology*, 24:111-119). Таким образом, изобретение включает применение молекул, участвующих в РНКi, содержащих любой из этих различных типов двухцепочечных молекул. Кроме того, при этом понимается, что молекулы, участвующие в РНКi, могут применяться и быть внедрены в клетку в различных формах. Соответственно, при использовании в этом документе молекулы, участвующие в РНКi, включают любую и все молекулы, способные индуцировать РНКi-ответ в клетках, включая в качестве неограничивающих примеров двухцепочечные полинуклеотиды, содержащие две разные цепи, т.е. смысловую цепь и антисмысловую цепь, например малая интерферирующая РНК (siРНК); полинуклеотиды, содержащие шпильчатую петлю из комплементарных последовательностей, которые образуют двухцепочечную область, например молекулы shРНКi, и экспрессионные векторы, которые экспрессируют один или несколько полинуклеотидов, способных формировать двухцепочечные полинуклеотиды сами по себе или в комбинации с другим полинуклеотидом.

"Соединение одноцепочечной siРНК" при использовании в этом документе означает соединение siРНК, состоящее из одной молекулы. Оно может включать дуплексные области, образованные внутрицепочечным спариванием, например, это может быть структура типа шпильки или "ручка сковороды", или такая структура может содержаться в соединении. Соединения одноцепочечных siРНК могут быть антисмысловыми по отношению к целевой молекуле.

Соединение одноцепочечной siРНК может иметь длину, достаточную для входа в RISC и участия в опосредованном комплексом RISC расщеплении целевой мРНК. Соединение одноцепочечной siРНК имеет длину по меньшей мере 14, а в других вариантах воплощения по меньшей мере 15, 20, 25, 29, 35, 40 или 50 нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения оно имеет длину менее 200, 100 или 60 нуклеотидов.

Соединения шпильчатых siРНК будут иметь дуплексный участок, равный или не менее 17, 18, 19, 29, 21, 22, 23, 24 или 25 пар нуклеотидов. Дуплексный участок может быть равным или меньше по длине чем 200, 100 или 50. В некоторых воплощениях диапазон размеров дуплексного участка составляет в длину 15-30, от 17 до 23, от 19 до 23, и от 19 до 21 пар нуклеотидов. Шпилька может иметь одноцепочечный "липкий" конец или терминальный неспаренный участок. В некоторых воплощениях "липкие" концы имеют длину 2-3 нуклеотида. В некоторых вариантах воплощения "липкий" конец находится на смысловой стороне шпильки, а в некоторых вариантах воплощения - на антисмысловой стороне шпильки.

"Соединение двухцепочечной siРНК" при использовании в этом документе означает соединение siРНК, которое содержит более одной, а в некоторых случаях две цепи, в которых в результате межцепочечной гибридизации может образоваться область с дуплексной структурой.

Антисмысловая цепь соединения двухцепочечной siРНК может быть по длине равна или не менее 14, 15, 16, 17, 18, 19, 25, 29, 40 или 60 нуклеотидов. Она может быть равна или меньше по длине чем 200, 100 или 50 нуклеотидов. Диапазон размеров может составлять от 17 до 25, от 19 до 23 и от 19 до 21 нуклеотида в длину. При использовании в этом документе термин "антисмысловая цепь" означает цепь соединения siРНК, которая в существенной мере комплементарна целевой молекуле, например целевой РНК.

Смысловая цепь соединения двухцепочечной siРНК может быть по длине равна или не менее 14, 15, 16, 17, 18, 19, 25, 29, 40 или 60 нуклеотидов. Она может быть равна или меньше по длине чем 200, 100 или 50 нуклеотидов. Диапазон размеров может составлять от 17 до 25, от 19 до 23 и от 19 до 21 нуклеотида в длину.

Двухцепочечная часть соединения двухцепочечной siРНК может быть по длине равна или не менее 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 29, 40 или 60 пар нуклеотидов. Она может быть равна или меньше по длине чем 200, 100 или 50 пар нуклеотидов. Диапазон размеров может составлять 15-30, от 17 до 23, от 19 до 23, и от 19 до 21 пар нуклеотидов в длину.

Во многих вариантах воплощения, соединение siРНК имеет существенную длину, таким образом, что оно может расщепляться эндогенными молекулами, например Dicer, с образованием меньших соединений siРНК, например, агентов siРНК.

Смысловая и антисмысловая цепи могут быть выбраны таким образом, что соединение двухцепочечной siРНК будет включать одноцепочечную или неспаренную область на одном или на обоих концах молекулы. Таким образом, двухцепочечное соединение siРНК может содержать смысловую и антисмысловую цепи, спаренные таким образом, что образуется "липкий" конец, например один или два 5' или 3' "липких" конца, или 3' "липкий" конец длиной 1-3 нуклеотида. Образование "липких" концов может быть результатом того, что одна цепь длиннее, чем другая, или результатом того, что две цепи одинаковой длины смещены друг относительно друга. В некоторых вариантах воплощения будет присутствовать

по меньшей мере один 3' "липкий" конец. В одном из вариантов воплощения оба конца молекулы siРНК будут иметь 3' "липкий" конец. В некоторых вариантах воплощения "липкий" конец имеет длину 2 нуклеотида.

В некоторых воплощениях длина дуплексной области составляет от 15 до 30, или 18, 19, 20, 21, 22 и 23 нуклеотида в длину, например, в диапазоне соединений ssiРНК, обсужденных выше. Соединения ssiРНК могут напоминать по длине и структуре природные процессированные Dicer продукты, полученные из длинных dsiРНК. Варианты воплощения, в которых две цепи соединения ssiРНК соединены, например ковалентно соединены, также включены в изобретение. Шпилька или другие одноцепочечные структуры, обеспечивающие наличие требуемой двухцепочечной области и 3' "липкий" конец, также находятся в пределах объема настоящего изобретения.

Соединения siРНК, описанные в этом документе, включая соединения двухцепочечных siРНК и соединения одноцепочечных siРНК, могут опосредовать сайленсинг целевой РНК, например мРНК, например транскрипта гена, кодирующего белок. Для удобства такие мРНК также называются в этом документе мРНК, предназначенные для сайленсинга. Такой ген также называется целевым геном. В общем случае РНК, предназначенная для сайленсинга, является продуктом эндогенного гена или гена патогенного организма. Кроме того, РНК, отличные от мРНК, например тРНК и вирусные РНК, также могут являться мишенями.

При использовании в этом документе фраза "опосредует РНКi" относится к способности вызывать сиквенс-специфичный сайленсинг целевой РНК. Не следуя какой-то определенной теории, полагают, что процесс сайленсинга использует аппарат или процесс РНКi и gРНК, например соединения ssiРНК длиной от 21 до 23 нуклеотидов.

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения соединение siРНК "в существенной мере комплементарно" целевой РНК, например целевой мРНК, таким образом, что соединение siРНК вызывает сайленсинг продукции белка, кодируемого целевой мРНК. В другом варианте воплощения соединение siРНК "строго комплементарно" целевой РНК, например, целевая РНК и соединение siРНК отжигаются, например, с формированием гибрида, состоящего исключительно из Уотсон-Криковских пар оснований в области строгой комплементарности. "В существенной мере комплементарная" целевая РНК может содержать внутреннюю область (например, длиной по меньшей мере 10 нуклеотидов), которая строго комплементарна целевой РНК. Более того, в некоторых воплощениях, соединение siРНК специфично распознает однонуклеотидное различие. В этом случае, соединение siРНК опосредует РНКi только если в данной области однонуклеотидного различия обнаружена строгая комплементарность (например, в пределах 7 нуклеотидов).

РНК-интерференция (РНКi) может применяться для специфичного ингибирования экспрессии целевых полинуклеотидов. Опосредованное двухцепочечной РНК подавление экспрессии гена и нуклеиновой кислоты может достигаться, согласно изобретению, путем введения двухцепочечной РНК, siРНК или shРНК в клетки или организмы. SiРНК может являться двухцепочечной РНК, или гибридной молекулой, содержащей как РНК, так и ДНК, например, одну цепь РНК и одну цепь ДНК. Было показано, что прямое введение siРНК в клетку может запускать РНКi в клетках млекопитающих (Elshabir, S.M., et al. *Nature*, 411:494-498 (2001)). Дополнительно, подавление в клетках млекопитающих происходило на уровне РНК и было специфичным к целевым генам, со строгой корреляцией между подавлением РНК и белка (Caplen, N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:9746-9747 (2001)). Кроме того, было показано, что большое количество клеточных линий, включая клетки HeLa S3, COS7, 293, NIH/3T3, A549, HT-29, CHO-K1 и MCF-7, чувствительны к определенному уровню сайленсинга посредством siРНК (Brown, D. et al., *TechNotes*, 9(1):1-7, доступно в сети Интернет по адресу www.dot.ambion.dot.com/techlib/tn/91/912.html (9/1/02)).

Молекулы, участвующие в РНКi и направленные на специфичные полинуклеотиды, могут быть легко получены в соответствии с методиками, известными специалистам в данной области. Были определены структурные характеристики эффективных молекул siРНК. Elshabir, S.M. et al. (2001), *Nature*, 411:494-498 и Elshabir, S.M. et al. (2001), *EMBO*, 20:6877-6888. Соответственно, специалисту в данной области будет понятно, что широкое разнообразие различных молекул siРНК может применяться для направленного действия на специфичный ген или транскрипт. В некоторых воплощениях молекулы siРНК согласно изобретению являются двухцепочечными и имеют длину 16-30 или 18-25 нуклеотидов, включая все целочисленные значения между указанными. В одном из вариантов воплощения, siРНК имеет длину 21 нуклеотид. В некоторых воплощениях siРНК имеют 3' "липкие" концы длиной 0-7 нуклеотидов или 5' "липкие" концы длиной 0-4 нуклеотида. В одном из вариантов воплощения, молекула siРНК имеет 3' "липкий" конец длиной два нуклеотида. В одном из вариантов воплощения siРНК имеет длину 21 нуклеотид и 3' "липкие" концы длиной два нуклеотида (т.е. они содержат комплементарную область длиной 19 нуклеотидов между смысловой и антисмысловой цепями). В некоторых воплощениях "липкие" концы являются 3' "липкими" концами UU или dTdT.

В целом, молекулы siРНК полностью комплементарны одной цепи молекулы целевой ДНК, так как было показано, что наличие даже всего одной неспаренной пары оснований снижает эффективность сайленсинга. В других вариантах воплощения, siРНК могут иметь модифицированную композицию остова,

с такими, например, модификациями, как 2'-дезоксидили 2'-О-метил. Однако в предпочтительных воплощениях вся цепь siРНК не может быть целиком построена из 2'-дезоксидили 2'-О-модифицированных оснований.

В другом варианте воплощения настоящее изобретение направлено на создание клетки, содержащей вектор для ингибирования экспрессии гена в клетке. Вектор содержит регуляторную последовательность, функционально присоединенную к нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере одну цепь одной из двухцепочечных РНК согласно изобретению.

В одном из вариантов воплощения целевые сайты siРНК выбирают путем сканирования последовательности целевого мРНК-транскрипта на наличие динуклеотидных последовательностей AA. Каждая динуклеотидная последовательность AA в сочетании с находящимися с 3' стороны от нее примерно 19 нуклеотидами является потенциальным целевым сайтом для siРНК. В одном из вариантов воплощения целевые сайты siРНК предпочтительно не располагаются в пределах 5' и 3' нетранслируемых областей (UTR) или областей около стартового кодона (в пределах примерно 75 оснований), так как белки, которые связываются с регуляторными областями, могут мешать связыванию комплекса siРНК и эндонуклеазы (Elshabir, S. et al., *Nature*, 411:494-498 (2001); Elshabir, S. et al., *EMBO J.* 20:6877-6888 (2001)). Кроме того, потенциальные целевые сайты можно сравнить с соответствующей геномной базой данных, такой как BLASTN 2.0.5, доступной на сервере NCBI по адресу www.ncbi.nlm. и отбросить потенциальные целевые последовательности, имеющие существенную гомологию с другими кодирующими последовательностями.

В некоторых вариантах воплощения короткие шпилечные РНК составляют компонент нуклеиновой кислоты липидо-нуклеиновых кислотных частиц согласно изобретению. Короткая шпилечная РНК (shРНК) является формой шпилечной РНК, способной сиквенс-специфично снижать экспрессию целевого гена. Короткие шпилечные РНК могут иметь преимущества перед siРНК при подавлении экспрессии гена, так как они в целом более стабильны и менее чувствительны к деградации в клеточном окружении. Было установлено, что сайленсинг генов, опосредованный такими короткими шпилечными РНК, действует в ряде нормальных и опухолевых клеточных линий и в клетках млекопитающих, включая клетки мыши и человека. Paddison, P. et al., *Genes Dev.* 16(8):948-58 (2002). Дополнительно, были получены линии трансгенных клеток, несущих хромосомные гены, которые кодируют созданные генно-инженерными методами shРНК. Эти клетки способны конститутивно синтезировать shРНК, тем самым облегчая длительный или конститутивный сайленсинг генов, который может передаваться в поколениях в клетки потомков. Paddison, P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(3):1443-1448 (2002).

shРНК содержат структуру "стебель с петлей". В некоторых воплощениях они могут содержать стебли с различной длиной, в типичном случае от 19 до 29 нуклеотидов в длину или с любым числом в этом диапазоне. В некоторых воплощениях шпильки содержат стебли длиной от 19 до 21 нуклеотида, в то время как в других вариантах воплощения шпильки содержат стебли длиной от 27 до 29 нуклеотидов. В некоторых воплощениях размер петли находится в диапазоне от 4 до 23 нуклеотидов в длину, хотя размер петли может быть более 23 нуклеотидов, при этом не оказывая существенного влияния на активность сайленсинга. Молекулы shРНК могут содержать пары с нарушением комплементарности, например пара с нарушением комплементарности G-U между двумя цепями стебля shРНК, без снижения эффективности. Действительно, в некоторых воплощениях shРНК сконструированы так, чтобы они включали один или несколько пар G-U в стебле шпильки для стабилизации шпилек, например, во время амплификации в бактериях. Однако в типичном случае необходима комплементарность между частью стебля, которая связывается с целевой мРНК (антисмысловой цепью), и мРНК, и даже единичная основная пара с нарушением комплементарности в этой области может препятствовать сайленсингу. 5' и 3' "липкие" концы не требуются, так как они, как кажется, не являются критически важными для функционирования shРНК, хотя они могут присутствовать (Paddison et al. (2002), *Genes & Dev.* 16(8):948-58).

МикроРНК

МикроРНК (miРНК) являются высококонсервативным классом молекул малых РНК, которые транскрибируются с геномной ДНК растений и животных, но не транслируются в белки. Процессированные miРНК представляют собой одноцепочечные молекулы РНК длиной приблизительно 17-25 нуклеотидов (нт), которые вовлекаются в индуцируемый РНК комплекс сайленсинга (RISC) и которые были идентифицированы как ключевые регуляторы развития, пролиферации клеток, апоптоза и дифференцировки. Полагают, что они играют роль в регуляции экспрессии генов, связываясь с 3'-нетранслируемой областью специфичных мРНК. RISC опосредует подавление экспрессии генов путем ингибирования трансляции, расщепления транскрипта, или с помощью обоих этих механизмов. RISC также участвует в транскрипционном сайленсинге в ядре у широкого круга эукариот.

Число идентифицированных к настоящему моменту последовательностей miРНК велико и продолжает расти, наглядные примеры таких последовательностей можно найти, например, в "miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature", Griffiths-Jones S., Grocock R.J., van Dongen S., Bateman A., Enright A.J. *NAR*, 2006, 34, Database Issue, D140-D144; "The microRNA Registry", Griffiths-Jones S. *NAR*, 2004, 32, Database Issue, D109-D111; а также в сети Интернет по адресу

microrna.dot.sanger.dot.ac.dot.uk/sequences/.

Антисмысловые олигонуклеотиды.

В одном из вариантов воплощения нуклеиновая кислота является антисмысловым олигонуклеотидом, направленным на целевой полинуклеотид. Подразумевается, что термин "антисмысловой олигонуклеотид" или просто "антисмысловая последовательность" включает олигонуклеотиды, которые комплементарны последовательности целевого полинуклеотида. Антисмысловые олигонуклеотиды представлены одиночными цепями ДНК или РНК, которые комплементарны выбранной последовательности. В случае антисмысловой РНК, они предотвращают трансляцию комплементарной цепи РНК путем связывания с нею. Антисмысловая ДНК может применяться для направленного действия на специфичную, комплементарную (кодирующую или некодирующую) РНК. Если происходит связывание, этот гибрид ДНК/РНК может быть деградирован ферментом РНКазой Н. В некоторых воплощениях антисмысловые олигонуклеотиды содержат от примерно 10 до примерно 50 нуклеотидов, более предпочтительно от примерно 15 до примерно 30 нуклеотидов. Термин также включает антисмысловые олигонуклеотиды, которые могут быть не строго комплементарны требуемому целевому гену. Таким образом, изобретение может применяться в случаях, когда у антисмысловой последовательности были обнаружены неспецифичные к целевой молекуле активности, или когда наиболее предпочтительной для конкретного применения является антисмысловая последовательность, содержащая одну или несколько пар с нарушением комплементарности с целевой последовательностью.

Показано, что антисмысловые олигонуклеотиды являются эффективными и направленными ингибиторами белкового синтеза и, следовательно, могут применяться для специфичного ингибирования синтеза белка целевым геном. Эффективность антисмысловых олигонуклеотидов для ингибирования белкового синтеза хорошо установлена. Например, синтез полигалактоураназы и мускаринового ацетилхолинового рецептора 2 типа ингибируется антисмысловыми олигонуклеотидами, направленными на соответствующие им последовательности мРНК (патенты США № 5739119 и 5759829). Дополнительно, примеры ингибирования антисмысловыми последовательностями были показаны для ядерного белка циклина, гена множественной лекарственной устойчивости (MDG1), ICAM-1, E-селектина, STK-1, стритарного рецептора ГАМК_A и ЭФР человека (Jaskulski et al., *Science*. 1988 Jun 10; 240(4858):1544-6; Vasanthakumar and Ahmed, *Cancer Commun*. 1989; 1(4):225-32; Peris et al., *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 1998 Jun 15; 57(2):310-20; патенты США № 5801154; 5789573; 5718709 и 5610288). Дополнительно, были описаны антисмысловые конструкции, которые способны к ингибированию и могут применяться для лечения различных аномалий клеточной пролиферации, например рака (патенты США № 5747470; 5591317 и 5783683).

Способы получения антисмысловых олигонуклеотидов известны специалистам в данной области и могут быть легко адаптированы для получения антисмыслового олигонуклеотида, направленного на любую полинуклеотидную последовательность. Выбор последовательности антисмыслового олигонуклеотида, специфичной к данной целевой последовательности, основан на анализе выбранной целевой последовательности и определении вторичной структуры, T_m , энергии связывания и относительной стабильности. Антисмысловые олигонуклеотиды могут быть выбраны на основе их относительной неспособности формировать димеры, шпильки или другие вторичные структуры, которые снижали бы или делали невозможным специфичное связывание с целевой мРНК в клетке-хозяине. В высокой степени предпочтительные целевые области мРНК включают области, содержащие или расположенные рядом с кодоном инициации трансляции AUG, и последовательности, которые в существенной мере комплементарны 5' областям мРНК. Эти соображения относительно анализа вторичной структуры и выбора целевого сайта могут быть реализованы, например, с помощью программного обеспечения OLIGO primer analysis, верс. 4 (Molecular Biology Insights) и/или программного обеспечения на основе алгоритма BLASTN 2.0.5 (Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 1997, 25(17):3389-402).

Антагомиры.

Антагомиры являются РНК-подобными олигонуклеотидами, в которые включены различные модификации для защиты от РНКаз и придания фармакологических свойств, таких как повышенное поглощение тканями и клетками. Они отличаются от нормальной РНК наличием, например, полного 2-О-метирирования сахара, фосфоротиоатного остова и, например, остатка холестерина на 3'-конце. Антагомиры могут применяться для эффективного сайленсинга эндогенных miРНК путем формирования дуплексов, состоящих из антагомира и эндогенной miРНК, что предотвращает индуцируемый miРНК сайленсинг генов. Примером опосредованного антагомиром сайленсинга miРНК служит сайленсинг miR-122, описанный в работе Krutzfeldt et al., *Nature*, 2005, 438:685-689, содержание которой специально целиком включено в описание в качестве ссылки. РНК-антагомиры могут быть синтезированы с применением стандартных протоколов твердофазного синтеза олигонуклеотидов. См. заявки на патент США сер. № 11/502158 и 11/657341 (раскрытие каждой из которых включено в описание в качестве ссылки).

Антагомир может содержать субъединицы конъюгированного с лигандом мономера и мономера для синтеза олигонуклеотидов. Примеры мономеров описаны в заявке на патент США № 10/916185, поданной 10 августа 2004 г. Антагомир может иметь структуру ZXY, такую как описана в заявке на патент РСТ № РСТ/US2004/07070, поданной 8 марта 2004 г. Антагомир может находиться в комплексе с амфи-

патическим остатком. Примеры амфипатических остатков для применения с олигонуклеотидными агентами описаны в заявке на патент РСТ № РСТ/US2004/07070, поданной 8 марта 2004 г.

Аптамеры.

Аптамеры являются молекулами нуклеиновой кислоты или пептидными молекулами, которые связываются с конкретной рассматриваемой молекулой с высокой аффинностью и специфичностью (Tuerk and Gold, *Science*, 249:505 (1990); Ellington and Szostak, *Nature*, 346:818 (1990)). Были успешно получены ДНК- или РНК-аптамеры, которые связываются со многими различными структурами - от крупных белков до малых органических молекул. См. Eaton, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1:10-16 (1997), Famulok, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9:324-9(1999) и Hermann and Patel, *Science*, 287:820-5 (2000). Аптамеры могут быть на основе РНК или ДНК и могут содержать рибопереключател. Рибопереключател представляет собой часть молекулы мРНК, которая непосредственно связывается с малой целевой молекулой, и чье связывание с целевой молекулой влияет на активность гена. Таким образом, мРНК, содержащая рибопереключател, напрямую вовлечена в регуляцию собственной активности, в зависимости от присутствия или отсутствия ее целевой молекулы. В общем случае аптамеры конструируют с помощью повторяющихся раундов отбора *in vitro* или, в равной степени, с помощью SELEX (систематической эволюции лигандов при экспоненциальном обогащении) таким образом, чтобы они связывались с различными молекулярными мишенями, такими как малые молекулы, белки, нуклеиновые кислоты и даже клетки, ткани и организмы. Аптамер может быть получен с применением любого известного способа, включая синтетические, рекомбинантные способы и способы очистки, и может применяться отдельно или в сочетании с другими аптамерами, специфичными к той же мишени. Дополнительно, как описано более полно в этом документе, термин "аптамер" определенно включает "вторичные аптамеры", которые содержат консенсусную последовательность, полученную сравнением двух или нескольких известных аптамеров с данной мишенью.

Рибозимы.

В соответствии с другим вариантом воплощения настоящего изобретения, липидо-нуклеиновые частицы ассоциированы с рибозимами. Рибозимы являются комплексами РНК и белка, имеющими специфичный каталитический домен, который обладает эндонуклеазной активностью (Kim and Cech, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1987 Dec; 84(24):8788-92; Forster and Symons, *Cell*. 1987 Apr 24; 49(2):211-20). Например, большое число рибозимов ускоряют реакции переноса на фосфоэфирную группу с высокой степенью специфичности, часто расщепляя только одну из нескольких фосфоэфирных связей в олигонуклеотидном субстрате (Cech et al., *Cell*. 1981 Dec; 27(3 Pt 2):487-96; Michel and Westhof, *J. Mol. Biol.* 1990 Dec 5; 216(3):585-610; Reinhold-Hurek and Shub, *Nature*. 1992 May 14; 357(6374):173-6). Эта специфичность была связана с требованием, чтобы субстрат связывался посредством специфичных взаимодействий спаривания оснований с внутренней адапторной последовательностью ("IGS") рибозима перед осуществлением химической реакции.

В настоящее время известны по меньшей мере шесть основных типов ферментативных РНК естественного происхождения. Каждая может катализировать гидролиз фосфодиэфирных связей в РНК *in trans* (и таким образом может расщеплять другие молекулы РНК) в физиологических условиях. В общем случае ферментативные нуклеиновые кислоты действуют посредством первоначального связывания с целевой РНК. Такое связывание происходит через часть каталитической нуклеиновой кислоты, предназначенную для связывания с мишенью и расположенную в тесной близости от ферментативной части молекулы, которая осуществляет расщепление целевой РНК. Таким образом, ферментативная нуклеиновая кислота сперва распознает и после этого связывается с целевой РНК посредством комплементарного спаривания оснований и после связывания с правильным сайтом осуществляет каталитическое расщепление целевой РНК. Рациональное расщепление такой целевой РНК приведет к нарушению способности осуществлять синтез кодируемого белка. После того как ферментативная нуклеиновая кислота связала и расщепила свою РНК-мишень, она высвобождается из взаимодействия с РНК для того, чтобы найти следующую мишень, и может многократно связывать и расщеплять новые мишени.

Молекула ферментативной нуклеиновой кислоты может иметь вид структуры типа "головка молотка", шпильки, РНК вируса гепатита δ , интрона I группы или РНК в составе РНКазы Р (в ассоциации с адапторной последовательностью РНК) или мотива VS РНК *Neurospora*, например. Конкретные примеры мотивов типа "головка молотка" описаны в работе Rossi et al., *Nucleic Acids Res.* 1992 Sep 11; 20(17):4559-65. Примеры шпильчных мотивов описаны в работе Hampel et al. (*Eur. Pat. Appl. Publ. No.* EP 0360257), Hampel and Tritz, *Biochemistry* 1989 Jun 13; 28(12):4929-33; Hampel et al., *Nucleic Acids Res.* 1990 Jan 25; 18(2):299-304 и патент США № 5631359. Пример мотива вируса гепатита δ описан в работе Perrotta and Been, *Biochemistry*. 1992 Dec 1; 31(47):11843-52; пример мотива РНКазы Р описан в работе Guerrier-Takada et al., *Cell*. 1983 Dec; 35(3 Pt 2):849-57; мотив VS РНК-рибозима *Neurospora* описан в работе Collins (Saville and Collins, *Cell*. 1990 May 18; 61(4):685-96; Saville and Collins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991 Oct 1; 88(19):8826-30; Collins and Olive, *Biochemistry*. 1993 Mar 23; 32(11):2795-9); и пример интрона I группы описан в патенте США № 4987071. Важными особенностями молекул ферментативных нуклеиновых кислот, применяемых в соответствии с настоящим изобретением, является то, что они

имеют специфичный сайт связывания субстрата, который комплементарен одной или нескольким областям ДНК или РНК целевого гена, и что они имеют нуклеотидную последовательность внутри или вокруг этого сайта связывания субстрата, которая придает молекуле активность расщепления РНК. Таким образом, конструкции рибозимов не следует ограничивать специфичными мотивами, упомянутыми в этом документе.

Способы получения рибозимов, направленных на любую полинуклеотидную последовательность, известны специалистам в данной области. Рибозимы могут быть сконструированы, как описано в международной публикации заявки на патент № WO 93/23569 и в международной публикации заявки на патент № WO 94/02595, каждая из которых специально включена в этот документ в качестве ссылки, и синтезированы для проверки *in vitro* и *in vivo*, как описано в этом документе.

Активность рибозима может быть оптимизирована путем изменения длины связывающего плеча рибозима или химического синтеза рибозимов с модификациями, которые предотвращают их деградацию рибонуклеазами сыворотки (см., например, международную публикацию заявки на патент № WO 92/07065; международную публикацию заявки на патент № WO 93/15187; международную публикацию заявки на патент № WO 91/03162; европейскую публикацию заявки на патент № 92110298.4; патент США 5334711; и международную публикацию заявки на патент № WO 94/13688, которые описывают различные химические модификации, которые могут быть осуществлены в отношении остатков сахара в молекуле ферментативной РНК), модификациями, которые усиливают их эффективность в клетках, и с удалением оснований стебля II для уменьшения времени синтеза РНК и снижения химических требований.

Дополнительные последовательности олигонуклеотидов (ODN) специфичных нуклеиновых кислот, пригодные для применения в композициях и способах согласно изобретению, описаны в заявке на патент США № 60/379 343, заявке на патент США № 09/649527; международной публикации WO 02/069369; международной публикации № WO 01/15726; патенте США № 6406705 и в работе Raney et al., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298:1185-1192 (2001). В некоторых воплощениях ODN, применяемые в композициях и способах по настоящему изобретению, имеют фосфодиэфирный ("PO") остов или фосфоротиоатный ("PS") остов и/или по меньшей мере один метилированный остаток цитозина в составе мотива CpG.

Модификации нуклеиновых кислот.

В 1990-х гг. антисмысловые олигодеоксинуклеотиды (ODN) на основе ДНК и рибозимы (РНК) представляли собой многообещающую новую парадигму для создания и разработки лекарственных средств, но их применению *in vivo* мешала эндо- и экзонуклеазная активность, а также отсутствие способов успешной доставки внутрь клетки. Проблема, связанная с деградацией, была эффективно решена после всестороннего исследования химических модификаций, которые предотвращают распознавание олигонуклеотидных (олиго) лекарственных препаратов ферментами нуклеазами, но не ингибируют их механизм действия. Это исследование было настолько успешным, что разрабатываемые сейчас лекарственные препараты на основе антисмысловых ODN остаются интактными *in vivo* в течение нескольких дней по сравнению с несколькими минутами в случае немодифицированных молекул (Kurreck, J. 2003. *Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications*. *Eur. J. Biochem.* 270:1628-44). Однако проблемы с доставкой внутрь клетки и механизмами действия до сих пор сдерживали превращение антисмысловых ODN и рибозимов в клинические продукты.

Дуплексам РНК свойственна более высокая стабильность к действию нуклеаз, чем у одноцепочечной ДНК или РНК, и в отличие от антисмысловых ODN немодифицированная siРНК демонстрирует достаточную активность при попадании в цитоплазму. Несмотря на это, химические модификации, разработанные для стабилизации антисмысловых ODN и рибозимов, также систематически применяли к siРНК, чтобы определить, насколько химическая модификация может быть переносима и можно ли улучшить фармакокинетическую и фармакодинамическую активность. РНК-интерференция, вызванная дуплексами siРНК, требует наличия антисмысловой и смысловой цепи, которые выполняют разные функции. Обе цепи необходимы, чтобы siРНК могла войти в RISC, но после загрузки две цепи разделяются и смысловая цепь деградирует, в то время как антисмысловая цепь остается, чтобы направлять RISC к целевой мРНК. Вход в состав RISC - это структурно менее строгий процесс, чем распознавание и расщепление целевой мРНК. Следовательно, возможно множество различных химических модификаций смысловой цепи, но допустимы лишь ограниченные изменения антисмысловой цепи (Zhang et al., 2006).

Как известно специалистам в данной области, нуклеозид - это комбинация основания и сахара. Нуклеотиды - это нуклеозиды, которые дополнительно содержат фосфатную группу, ковалентно присоединенную к частице сахара в составе нуклеотида. В случае нуклеозидов, которые содержат пентофуранозный сахар, фосфатная группа может быть присоединена к любой из 2', 3' или 5' гидроксильных групп сахара. При образовании олигонуклеотидов фосфатные группы ковалентно связывают соседние нуклеотиды друг с другом с образованием линейного полимерного соединения. В свою очередь, соответствующие концы этой линейной полимерной структуры могут дополнительно соединяться с образованием кольцевой структуры. В пределах структуры олигонуклеотида о фосфатных группах обычно говорят, что они образуют межнуклеотидный остов олигонуклеотида. Нормальное соединение или остов для РНК и

ДНК - это фосфодиэфирное соединение 3'-5'.

Нуклеиновая кислота, применяемая в липидо-нуклеиновой кислотной частице в соответствии с настоящим изобретением, включает любую известную форму нуклеиновой кислоты. Таким образом, нуклеиновая кислота может являться модифицированной нуклеиновой кислотой типа, применявшегося ранее для повышения устойчивости к нуклеазам и стабильности в сыворотке. Примечательно, однако, что приемлемые терапевтические продукты также могут быть получены с применением способа согласно изобретению для составления смеси липидо-нуклеиновых кислотных частиц из нуклеиновых кислот, которые не несут модификаций в фосфодиэфирных связях природных полимеров нуклеиновых кислот, и применение нуклеиновых кислот с немодифицированными фосфодиэфирными связями (т.е. нуклеиновых кислот, в которых все межнуклеозидные связи представлены фосфодиэфирными связями) является предпочтительным воплощением настоящего изобретения.

Модификации остова.

Антисмысловые РНК, siРНК и другие олигонуклеотиды, полезные для настоящего изобретения, включают в качестве неограничивающих примеров олигонуклеотиды, содержащие модифицированные остовы или не природные межнуклеозидные связи. Олигонуклеотиды, имеющие модифицированные остовы, включают таковые с сохранением атома фосфора в остове и таковые без сохранения атома фосфора в остове. Модифицированные олигонуклеотиды, которые не содержат атом фосфора в их межнуклеозидном остове, также могут считаться олигонуклеотидами. Остовы модифицированных олигонуклеотидов содержат, например, фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкилфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, включая 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включая 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры, фосфороселенат, метилфосфонат или О-алкилфосфотриэфир в качестве межнуклеозидных соединений, и боронофосфаты, содержащие нормальные соединения 3'-5', их аналоги с соединением 2'-5' и таковые с инвертированной полярностью, где соседние пары нуклеозидных единиц соединены 3'-5' к 5'-3' или 2'-5' к 5'-2'. Некоторые неограничивающие примеры некоторых модификаций, которые могут присутствовать в нуклеиновой кислоте согласно изобретению, показаны в табл. 2.

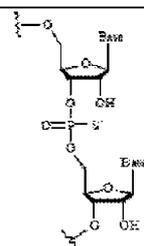
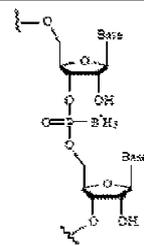
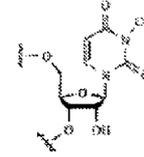
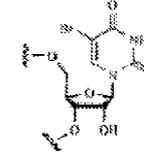
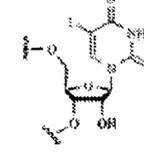
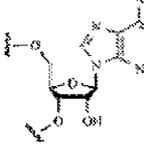
Включены также различные соли, смеси солей и формы свободных кислот. Примеры патентов США, которые описывают получение вышеназванных межнуклеозидных связей, включают в качестве неограничивающих примеров патенты США № 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177196; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 53999676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541306; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361 и 5625050.

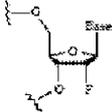
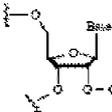
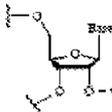
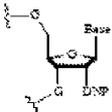
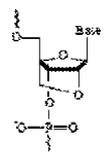
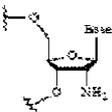
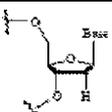
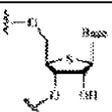
В некоторых воплощениях остовы модифицированных олигонуклеотидов, которые не содержат атома фосфора, имеют остовы, образованные межнуклеозидными связями из короткоцепочечных алкила или циклоалкила, смешанными гетероатомными и алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, или одной или несколькими короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями. Сюда относятся, например, таковые с морфолино-связями (образованными частично с участием остатка сахара в составе нуклеозида); силоксановыми остовами; сульфидными, сульфоксидными и сульфоновыми остовами; формацетильными и тиоформацетильными остовами; метиленаформацетильными и тиоформацетильными остовами; алкенсодержащими остовами; сульфаматные остовы; метилениминовые и метиленигидразиновые остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы и другие, имеющие в качестве компонентов сочетания N, O, S и CH₂. Примеры патентов США, которые описывают вышеназванные олигонуклеозиды, включают в качестве неограничивающих примеров патенты США № 5034506; 5166315; 5185444; 5214134; 5216141; 5235033; 5264562; 5264564; 5405938; 5434257; 5466677; 5470967; 5489677; 5541307; 5561225; 5596086; 5602240; 5610289; 5602240; 5608046; 5610289; 5618704; 5623070; 5663312; 5633360; 5677437 и 5677439.

Фосфоротиоатная модификация остова (табл. 2, № 1), где не входящий в состав мостиков атом кислорода в фосфодиэфирной связи замещен на атом серы, является самым первым и наиболее распространенным способом, применяемым для стабилизации лекарственных препаратов на основе нуклеиновых кислот против деградации нуклеазами. В общем случае полагают, что PS-модификации могут широко осуществляться в обеих цепях siРНК без существенного влияния на активность (Kugreck, J., *Eur. J. Biochem.* 270:1628-44, 2003). Однако известно, что PS-олиго ассоциируют с белками в существенной степени неспецифично, приводя к токсическим явлениям, особенно при внутривенном введении. Следовательно, PS-модификации обычно ограничены одним или двумя основаниями на 3' и 5' концах. Боронофосфатная межнуклеозидная связь (табл. 2, № 2) является недавно разработанной модификацией, которая очевидно более стабильна, чем PS, усиливает активность siРНК и имеет низкую токсичность (Hall et al., *Nucleic Acids Res.* 32:5991-6000, 2004).

Таблица 2

Химические модификации, применяемые к siРНК и другим нуклеиновым кислотам

№	Аббре-виатура	Название	Сайт модификации	Структура
1	PS	Фосфотиоат	Остов	
2	PB	Боранофосфат	Остов	
3	N3-MU	N3-метилуридин	Основание	
4	5'-BU	5'-бромоурацил	Основание	
5	5'-IU	5'-йодоурацил	Основание	
6	2,6-DP	2,6-диаминопурин	Основание	

7	2'-F	2'-фторо-	Сахар	
8	2'-OME	2''-O-метил	Сахар	
9	2'-O-MOE	2'-O-(2-метоксилэтил)	Сахар	
10	2'-DNP	2'-O-(2,4-динитрофенил)	Сахар	
11	LNA	Запертая нуклеиновая кислота (метиленовый мостик, соединяющий атом 2'-кислорода с атомом 4'-углерода в рибозном кольце)	Сахар	
12	2'-амино	2'-амино	Сахар	
13	2'-дезокси	2'-дезокси	Сахар	
14	4'-тио	4'-тиорибонуклеотид	Сахар	

Другие полезные производные нуклеиновых кислот включают такие молекулы нуклеиновых кислот, в которых образующие мостики атомы кислорода (таковые, образующие фосфоэфирные связи) были заменены на $-S-$, $-NH-$, $-CH_2-$ и им подобные. В некоторых воплощениях примененные изменения антисмысловых, siРНК, или других нуклеиновых кислот не окажут полного влияния на отрицательные заряды, ассоциированные с нуклеиновыми кислотами. Таким образом, настоящее изобретение рассматривает применение антисмысловых, siРНК, и других нуклеиновых кислот, в которых часть межнуклеозидных связей заменены, например, на нейтральные метилфосфонатные или фосфорамидатные связи. Когда применяются нейтральные межнуклеозидные связи, как в некоторых воплощениях, менее чем 80% межнуклеозидных связей в нуклеиновой кислоте заменены таким образом или менее чем 50% межнуклеозидных связей в нуклеиновой кислоте заменены таким образом.

Модификации оснований.

Модификации оснований встречаются реже, чем модификации остова и сахара. Все модификации, показанные в 0.3-6, по-видимому, стабилизируют siРНК против действия нуклеаз и оказывают незначительный эффект на активность (Zhang, H.Y., Du, Q., Wahlestedt, C., Liang, Z. 2006. RNA Interference with chemically modified siRNA. *Curr. Top. Med. Chem.* 6:893-900).

Соответственно, олигонуклеотиды также могут содержать модификации или замены нуклеобаз (часто называемых специалистами просто "основаниями"). При использовании в этом документе "немодифицированные" или "природные" нуклеобазы включают пуриновые основания аденин (А) и гуанин (G) и пиримидиновые основания тимин (Т), цитозин (С) и урацил (U). Модифицированные нук-

леоснования включают другие синтетические и природные нуклеоснования, такие как 5-метилцитозин (5-me-C или m5c), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-гало-урацил и цитозин, 5-пропинил-урацил и цитозин, 6-азоурацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-гало-, 8-амино-, 8-тиол-, 8-тиоалкил-, 8-гидроксил- и другие замещенные по 8 положению аденины и гуанины, 5-гало-, в частности 5-бромо-, 5-трифторметил и другие замещенные по 5 положению урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-дезааденин и 3-деазагуанин и 3-дезааденин.

Определенные нуклеоснования особенно полезны для увеличения аффинности связывания олигомерных соединений согласно изобретению, включая замещенные по 5 положению пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и O-6-замещенные пурины, в том числе 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Показано, что замены на 5-метилцитозин повышают стабильность дуплекса нуклеиновой кислоты на 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications* 1993, CRC Press, Boca Raton, pages 276-278). Они могут сочетаться, в некоторых воплощениях, с 2'-O-метоксиэтил-модификациями сахара. Патенты США, которые описывают получение некоторых из этих модифицированных нуклеоснований, а также других модифицированных нуклеоснований, включают в качестве неограничивающих примеров вышеназванный патент США № 3687808, а также патенты США № 4845205; 5130302; 5134066; 5175273; 5367066; 5432272; 5457187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711; 5552540; 5587469; 5594121, 5596091; 5614617 и 5681941.

Модификации сахара.

Большинство модификаций групп сахара происходят по 2'-ОН группе кольца сахара в РНК, которая является стандартным химически реактивным сайтом (Manoharan, M. 2004. RNA interference and chemically modified small interfering RNAs. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8:570-9; Zhang, H.Y., Du, Q., Wahlestedt, C., Liang, Z. 2006. RNA Interference with chemically modified siRNA. *Curr. Top. Med. Chem.* 6:893-900). Модификации 2'-F и 2'-ОМЕ (0.7 и 8) являются распространенными, и обе повышают стабильность, модификация 2'-ОМЕ не снижает активность, если ее распространение ограничено на менее чем 4 нуклеотида на цепь (Holen, T., Amarzguioui, M., Babaie, E., Prydz, H. 2003. Схожее поведение одноцепочечных и двухцепочечных siРНК предполагает, что они действуют через стандартный путь РНКi. *Nucleic Acids Res.* 31:2401-7). Модификация 2'-О-МОЕ (0.9) наиболее эффективна для siРНК, когда расположение модифицированных оснований ограничено центральной областью молекулы (Prakash, T.P., Allerson, C.R., Dande, P., Vickers, T.A., Sioufi, N., Jarres, R., Baker, B.F., Swayze, E.E., Griffey, R.H., Bhat, B. 2005. Positional effect of chemical modifications on short interference RNA activity in mammalian cells. *J. Med. Chem.* 48:4247-53). Другие модификации, для которых обнаружено, что они стабилизируют siРНК без потери активности, показаны в 0.10-14.

Модифицированные олигонуклеотиды могут также содержать один или несколько замещенных остатков сахара. Например, настоящее изобретение включает олигонуклеотиды, которые содержат один из следующих остатков в положении 2': ОН; F; O-, S-, или N-алкил, O-алкил-O-алкил, O-, S-, или N-алкенил, или O-, S- или N-алкинил, при этом алкил, алкенил и алкинил могут быть замещенными или незамещенными C₁-C₁₀-алкилом или C₂-C₁₀-алкенилом или алкинилом. Особенно предпочтительно O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ и O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, где n и m равны от 1 до примерно 10. Другие предпочтительные олигонуклеотиды содержат один из следующих остатков в положении 2': C₁-C₁₀-низший алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминоалкиламино, полиалкиламино, замещенный силл, расщепляющую РНК группу, репортерную группу, интеркалятор, группу для улучшения фармакокинетических свойств олигонуклеотида или группу для улучшения фармакодинамических свойств олигонуклеотида и другие заместители, имеющие схожие свойства. Одна модификация включает 2'-метоксиэтокси (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, также известную как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-МОЕ) (Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504), т.е. алкоксиалкокси группу. Другие модификации включают 2'-диметиламинооксиэтокси, т.е. группу O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, известную также как 2'-DMAOE и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (2'-DMAEOE).

Дополнительные модификации включают 2'-метокси (2'-O-CH₃), 2'-аминопропокси (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) и 2'-фторо (2'-F). Похожие модификации также могут быть введены в другие позиции в составе олигонуклеотида, в частности в позиции 3' сахара 3'-концевого нуклеотида или соединенных 2'-5' олигонуклеотидов и в позиции 5' у 5'-концевого нуклеотида. Олигонуклеотиды также могут содержать мететики сахаров, такие как остатки циклобутила вместо пентофуранозила сахара. Примеры патентов США, которые описывают получение структур таких модифицированных сахаров, включают в качестве неограничивающих примеров патенты США № 4981957; 5118800; 5319080; 5359044; 5393878; 5446137; 5466786; 5514785; 5519134; 5567811; 5576427; 5591722; 5597909; 5610300; 5627053; 5639873; 5646265; 5658873; 5670633 и 5700920.

В других миметиках олигонуклеотидов как сахар, так и межнуклеозидные связи, т.е. остов, нуклео-

тидных единиц, заменены новыми группами, хотя основания сохраняются для гибридизации с соответствующим целевым соединением - нуклеиновой кислотой. Одно такое олигомерное соединение, миметик олигонуклеотида, для которого было показано, что он обладает превосходными гибридизационными свойствами, называют пептидо-нуклеиновой кислотой (PNA). В соединении PNA сахарный остов олигонуклеотида заменен амидосодержащим остовом, в частности аминоэтилглициновым остовом, нуклеосоединения сохранены и связаны непосредственно или опосредованно с атомами азота азогрупп амидной части остова. Примеры патентов США, которые описывают получение соединений PNA, включают в качестве неограничивающих примеров патенты США № 5539082, 5714331 и 5719262. Дополнительные идеи по поводу соединений PNA можно найти в Nielsen et al. (Science, 1991, 254, 1497-1500).

Некоторые варианты воплощения настоящего изобретения являются олигонуклеотидами с фосфоротиоатными остовами и олигонуклеозидами с гетероатомными остовами, и, в частности, $-\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2-$ (называемым метилен (метиламино) или MMI-остовом), $-\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2-$ и $-\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2-$ (где природный фосфодиэфирный остов представлен в виде $-\text{O-P-O-CH}_2-$) по вышеуказанному патенту США № 5489677, и амидными остовами по вышеуказанному патенту США № 5602240. Также предпочтительными являются олигонуклеотиды, имеющие морфолиновую структуру остова по вышеуказанному патенту США № 5034506.

Остаток сахара также может содержать один или несколько атомов углерода, которые обладают стереохимической конфигурацией, противоположной таковой соответствующего атома углерода в составе рибозы. Таким образом, олигонуклеотид может включать нуклеотиды, содержащие, например, арабинозу, в качестве сахара. Мономер может иметь α -соединение в 1' позиции сахара, например α -нуклеозиды. Олигонуклеотиды могут также включать "лишенные азотистого основания" сахара, у которых отсутствует азотистое основание у атома C-1'. Эти лишенные азотистого основания сахара могут дополнительно содержать модификации по одному или нескольким составляющим атомам сахара. Олигонуклеотиды могут также содержать один или несколько сахаров, находящихся в L-форме, например L-нуклеозиды.

Химерные олигонуклеотиды.

Не требуется, чтобы все позиции в данном соединении были однородно модифицированы, и фактически более одной из вышеупомянутых модификаций может быть вовлечено в одном соединении или даже в одном нуклеозиде в пределах олигонуклеотида. Некоторые предпочтительные олигонуклеотиды по настоящему изобретению являются химерными олигонуклеотидами. "Химерные олигонуклеотиды" или "химеры" в контексте настоящего изобретения являются олигонуклеотидами, содержащими две или несколько химически различные области, каждая из которых состоит по меньшей мере из одного нуклеотида. Эти олигонуклеотиды в типичном случае содержат по меньшей мере одну область модифицированных нуклеотидов, которые придают одно или несколько полезных свойств (таких как, например, повышенная устойчивость к нуклеазам, повышенное поглощение клетками, повышенная аффинность связывания с РНК-мишенью), и область, которая является субстратом для расщепления РНКазой Н.

В одном из вариантов воплощения химерный олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну область, модифицированную для повышения аффинности связывания с мишенью. Аффинность олигонуклеотида к его мишени стандартно определяют измерением показателя T_m пары олигонуклеотид/мишень, который равен температуре, при которой олигонуклеотид и мишень диссоциируют; диссоциацию определяют спектрофотометрически. Чем выше значение T_m , тем больше аффинность олигонуклеотида к мишени. В одном из вариантов воплощения область олигонуклеотида, которую модифицируют для повышения аффинности связывания с мРНК-мишенью, содержит по меньшей мере один нуклеотид, модифицированный по 2' позиции сахара, наиболее предпочтительно 2'-О-алкил, 2'-О-алкил-О-алкил или 2'-фторо-модифицированный нуклеотид. Такие модификации стандартно внедряют в олигонуклеотиды, и было показано, что эти олигонуклеотиды обладают более высокой T_m (т.е. более высокой аффинностью связывания с мишенью), чем 2'-дезоксидолигонуклеотиды, действующие против данной мишени. Эффект такой повышенной аффинности заключается в значительном усилении ингибирования олигонуклеотидом экспрессии целевого гена.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения химерный олигонуклеотид содержит область, которая служит субстратом для РНКазы Н. Естественно, при этом понимается, что олигонуклеотиды могут включать любую комбинацию различных модификаций, описанных в этом документе.

Еще одна модификация олигонуклеотидов согласно изобретению включает химическое присоединение к олигонуклеотиду одного или нескольких остатков или конъюгатов, которые усиливают активность, распределение в клетке и поглощение клетками олигонуклеотида. Такие конъюгаты и способы их получения известны специалистам в данной области.

Специалисту в данной области понятно, что для полезности *in vivo*, такой как терапевтическая эффективность, целесообразным эмпирическим правилом является то, что если тиол-модифицированная версия последовательности работает в свободной форме, то инкапсулированные частицы той же последовательности, любой химической природы, также будут эффективны. Инкапсулированные частицы могут также иметь более широкий диапазон полезности *in vivo*, демонстрируя эффективность в условиях и

модельных системах, для которых известно, что они не отвечают на другие способы терапии с применением антисмысловых олигонуклеотидов. Специалисту в данной области известно, что применяя настоящее изобретение, можно обнаружить, что старые модельные системы начнут давать ответ на терапию с применением антисмысловых олигонуклеотидов. Дополнительно, могут быть пересмотрены ранее отброшенные антисмысловые последовательности или химические соединения, и обнаружено, что они являются эффективными в случае применения настоящего изобретения.

Олигонуклеотиды, применяемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть удобно и стандартно получены с помощью хорошо известного способа твердофазного синтеза. Оборудование для такого синтеза продают несколько поставщиков, в том числе компания Applied Biosystems. Также может быть применен любой другой способ такого синтеза; фактический синтез олигонуклеотидов зависит от потенциальных возможностей выполняющего его специалиста. Также хорошо известно, что можно применять схожие способы для получения других олигонуклеотидов, таких как фосфоротиоатные и алкилированные производные.

Иммуностимулирующие олигонуклеотиды.

Нуклеиновые кислоты, ассоциированные с липидными частицами по настоящему изобретению, могут быть иммуностимулирующими, в том числе иммуностимулирующими олигонуклеотидами (ISS; одно- или двухцепочечными), способными индуцировать иммунный ответ при введении субъекту, который может являться млекопитающим или другим пациентом. ISS включают, например, некоторые палиндромные последовательности, приводящие к образованию шпилечных вторичных структур (см. Yamamoto S., et al. (1992), J. Immunol. 148:4072-4076), или CpG-мотивы, а также другие известные характерные элементы ISS (такие как мульти-G домены, см. WO 96/11266).

Иммунный ответ может быть врожденным или адаптивным иммунным ответом. Иммунная система подразделяется в большей степени на врожденную иммунную систему и приобретенную адаптивную иммунную систему позвоночных, последняя из которых дополнительно подразделяется на гуморальный и клеточный компоненты. В некоторых вариантах воплощения иммунный ответ может быть мукозным.

В некоторых вариантах воплощения иммуностимулирующая нуклеиновая кислота является иммуностимулирующей только при введении в сочетании с липидной частицей и не является иммуностимулирующей при введении в ее "свободной форме". В соответствии с настоящим изобретением такой олигонуклеотид считается иммуностимулирующим.

Полагают, что иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты являются не специфичными к последовательности, если для провоцирования иммунного ответа не требуется, чтобы они специфично связывались с целевым полинуклеотидом и снижали его экспрессию. Таким образом, некоторые иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты могут содержать последовательность, соответствующую области гена или мРНК природного происхождения, но тем не менее считаться не специфичными к последовательности иммуностимулирующими нуклеиновыми кислотами.

В одном из вариантов воплощения, иммуностимулирующая нуклеиновая кислота или олигонуклеотид содержат по меньшей мере один динуклеотид CpG. Олигонуклеотид или динуклеотид CpG могут быть метилированными или метилированными. В другом варианте воплощения настоящего изобретения иммуностимулирующая нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере один динуклеотид CpG, имеющий метилированный цитозин. В одном из вариантов воплощения нуклеиновая кислота содержит один динуклеотид CpG, при этом цитозин в упомянутом динуклеотиде CpG метилирован. В конкретном примере воплощения нуклеиновая кислота содержит последовательность 5' TAACGTTGAGGGGCAT 3'.

В соответствии с другим вариантом воплощения нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере два динуклеотида CpG, при этом по меньшей мере один цитозин в динуклеотидах CpG метилирован. В дополнительном варианте воплощения каждый цитозин в динуклеотидах CpG, присутствующих в последовательности, метилирован. В другом варианте воплощения настоящего изобретения нуклеиновая кислота содержит множество динуклеотидов CpG, при этом по меньшей мере один из упомянутых динуклеотидов CpG содержит метилированный цитозин.

В конкретном примере воплощения нуклеиновая кислота содержит последовательность 5' TTCCATGACGTTTCCTGACGT 3'.

В еще одном конкретном примере воплощения последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность 5' TCCATGACGTTTCCTGACGT 3', при этом два цитозина, выделенные жирным шрифтом, метилированы. В некоторых вариантах воплощения ODN выбран из группы ODN, состоящей из ODN 1, ODN 2, ODN 3, ODN 4, ODN 5, ODN 6, ODN 7, ODN 8 и ODN 9, как показано ниже.

Таблица 3

Примеры иммуностимулирующих олигонуклеотидов (ODN)

НАЗВАНИЕ ODN	EQ ID	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ODN (5'-3').
ODN 1 с-мус человека		5'-ТААСГТТГАГГГГКАТ-3'
* ODN 1m		5'-ТААЗГТТГАГГГГКАТ-3'
ODN 2		5'-ТССАТГАСГТТССТГАСГТТ-3'
* ODN 2m		5'-ТСС АТГАЗГТТССТГАЗГТТ-3'
ODN 3		5'-ТААГС АТАСГГГГТГТ-3'
ODN 5		5'-ААСГТТ-3'
ODN 6		5'-ГАТГСТГТГТССГГГТСТССГГГС-3'
ODN 7		5'-ТСГТСГТТТТГТСГТТТТГТСГТТ-3'
ODN 7m		5'-ТЗГТЗГТТТТГТЗГТТТТГТЗГТТ-3'
ODN 8		5'-ТСС АСГАСТТСТСТСАГГТТ-3'
ODN 9		5'-ТСТССАСГТГСГСС АТ-3'
ODN 10 внутриклеточная молекула адгезии-1 мыши		5'-ТГС АТССССАСГССАССАТ-3'
ODN 11 внутриклеточная молекула адгезии-1 человека		5'-СССААСГТГСАТСССГТА-3'
ODN 12 внутриклеточная молекула адгезии-1 человека		5'-СССААСГТГСАТСССГТА-3'
ODN 13 erb-B-2 человека		5'-ГГТ ГСТСАСТГС ГГС-3'
ODN 14 с-мус человека		5'-ААСС ГТТ ГАГ ГГГ КАТ-3'
ODN 15 с-мус человека		5'-ТАТ ГСТ ГТГ ССГ ГГГ ТСТ ТСГ ГГС-3'
ODN 16		5'-ГТГСССГ ГГГТСТТССГГГС-3'
ODN 17 рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 человека		5'-ГГАССТСТСТСССГАСС-3'
ODN 18 рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 человека		5'-ТСС ТСС ГГА ССС АГА СТТ-3'
ODN 19 рецептор эпидермального фактора роста человека		5'-ААС ГТТ ГАГ ГГГ КАТ-3'
ODN 20 рецептор эпидермального фактора роста		5'-СССГТГГТСА ТГСТСС-3'
ODN 21 фактор роста эндотелия сосудов человека		5'-САГ ССТГГСТСАССС ССТГГГ-3'
ODN 22 Фосфокиназа С - α мыши		5'-САГ ССА ТГГ ТТС ССС ССА АС-3'
ODN 23		5'-ГТТ СТС ГСТ ГГТ ГАГ ТТТ СА-3'
ODN 24 Bcl-2 человека		5'-ТСТ СССАСГТГСГССАТ-3'
ODN 25 C-Raf-s человека		5'-ГТГ СТС КАТ ТГА ТГС-3'
ODN №26 рецептор-1 фактора роста эндотелия сосудов человека		5'-ГАГУУСГАУГАСГССГААААГГ-ССГАААГУСГУ-3'
ODN №27		5'-РРСГYY-3'
ODN №28		5'-ААСГТТГАГГГГКАТ-3'
ODN №29		5'-СААСГТТАТГГГГГАГА-3'
ODN №30 с-мус человека		5'-ТААСГТТГАГГГГКАТ-3'

"Z" обозначает метилированный остаток цитозина. ODN 14 является 15-мерным олигонуклеотидом, а ODN 1 является тем же олигонуклеотидом, содержащим тимидин, добавленный на 5'-конец, в результате чего ODN 1 становится 16-мером. Различий в биологической активности между ODN 14 и ODN 1 не обнаружено, и они оба проявляют схожую иммуностимулирующую активность (Mui et al., 2001).

Дополнительные последовательности олигонуклеотидов (ODN) специфичных нуклеиновых кислот, пригодные для применения в композициях и способах согласно изобретению, описаны в Raney et al., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298:1185-1192 (2001). В некоторых воплощениях ODN, применяемые в композициях и способах по настоящему изобретению, имеют фосфодиэфирный ("PO") остов или фосфоротиоатный ("PS") остов и/или по меньшей мере один метилированный остаток цитозина в составе мотива CpG.

Олигонуклеотиды-ловушки.

Так как транскрипционные факторы распознают свои относительно короткие последовательности для связывания даже в отсутствие окружающей их геномной ДНК, то короткие олигонуклеотиды, несущие консенсусную последовательность связывания специфичного транскрипционного фактора, могут применяться в качестве инструмента для управления экспрессией гена в живых клетках. Эта стратегия включает внутриклеточную доставку таких "олигонуклеотидов-ловушек", которые после этого распознаются и связываются своими целевыми факторами. Занятие ДНК-связывающего сайта транскрипционного фактора ловушкой делает транскрипционный фактор неспособным к последующему связыванию с промоторными областями целевых генов. Ловушки могут применяться в качестве терапевтических агентов, либо для ингибирования экспрессии генов, активируемых транскрипционным фактором, либо для повышения экспрессии генов, которые подавляются связыванием транскрипционного фактора. Примеры применения олигонуклеотидов-ловушек можно найти в работе Mann et al., *J. Clin. Invest.*, 2000, 106: 1071-1075, содержание которой специально целиком включено в описание в качестве ссылки.

Супермир.

Супермир обозначает одноцепочечный, двухцепочечный или частично двухцепочечный олигомер или полимер рибонуклеиновой кислоты (РНК) или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или обеих или их модификаций, который имеет нуклеотидную последовательность, в существенной мере идентичную miРНК и являющуюся антисмысловой относительно ее мишени. Этот термин включает олигонуклеотиды, состоящие из природного происхождения нуклеоснований, сахаров и ковалентных межнуклеозидных (остовных) связей и содержащие по меньшей мере одну часть неприродного происхождения, которая выполняет схожие функции. Такие модифицированные или замещенные олигонуклеотиды имеют превосходство над нативными формами благодаря требуемым свойствам, таким как, например, более интенсивное поглощение клетками, повышенная аффинность к целевой нуклеиновой кислоте и повышенная стабильность в присутствии нуклеаз. В предпочтительном воплощении супермир не содержит смысловой цепи, а в еще одном предпочтительном воплощении, супермир не обладает свойством самогибридизации в существенной степени. Супермир, являющийся особенностью настоящего изобретения, может иметь вторичную структуру, но он является в существенной мере одноцепочечным в физиологических условиях. Супермир, который является в существенной мере одноцепочечным, является одноцепочечным в такой степени, что менее чем примерно 50% (например, менее чем примерно 40, 30, 20, 10 или 5%) супермира образует дуплексы внутри молекулы. Супермир может содержать шпильчатый сегмент, например последовательность, предпочтительно на 3'-конце, может самогибридизоваться и образовывать дуплексную область, например дуплексную область длиной по меньшей мере 1, 2, 3 или 4 и предпочтительно менее чем 8, 7, 6 или n нуклеотидов, например 5 нуклеотидов. Дуплексная область может быть присоединена с помощью линкера, например нуклеотидного линкера, например, 3, 4, 5 или 6 остатков dT, например модифицированных остатков dT. В другом варианте воплощения настоящего изобретения супермир образует дуплекс с более коротким олиго, например длиной 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, например, на одном или обоих 3'- и 5'-концах или на одном конце и в не терминальной или срединной части супермира.

Миметики miРНК.

Миметики miРНК представляют класс молекул, которые могут применяться для имитации способности одной или нескольких miРНК вызывать сайленсинг генов. Таким образом, термин "миметик микроРНК" представляет синтетические некодирующие РНК (т.е. miРНК получены не с помощью очистки из источника эндогенных miРНК), которые способны вступать в сигнальный путь РНКi и регулировать экспрессию генов. Миметики miРНК могут быть сконструированы в виде зрелых молекул (например, одноцепочечных) или предшественников миметиков (например, при- или пре-miРНК). Миметики miРНК могут состоять из нуклеиновой кислоты (модифицированных или немодифицированных нуклеиновых кислот), включая олигонуклеотиды, содержащие, но не ограничиваясь этим, РНК, модифицированную РНК, ДНК, модифицированную ДНК, запертые нуклеиновые кислоты или нуклеиновые кислоты с 2'-О,4'-С-этиленовыми мостиками (ЕНА) или любую комбинацию вышеуказанного (в том числе ДНК-РНК гибриды). Кроме того, миметики miРНК могут содержать конъюгаты, влияющие на доставку, внутриклеточную компартиментализацию, стабильность, специфичность, функциональность, предпочтительное использование цепи, и/или активность. В одном из вариантов конструкции миметики miРНК являются двухцепочечными молекулами (например, с дуплексной областью длиной от примерно 16 до примерно 31 нуклеотида) и содержат одну или несколько последовательностей, обладающих идентичностью со зрелой цепью данной miРНК. Модификации могут включать 2'-модификации (в том числе 2'-О-метил модификации и 2'-F-модификации) на одной или обеих цепях молекулы и межнуклеотидные

модификации (например, фосфоротиоатные модификации), которые усиливают стабильность и/или специфичность нуклеиновой кислоты. Кроме того, миметики miРНК могут содержать "липкие" концы. "Липкие" концы могут состоять из 1-6 нуклеотидов на любом из 3'- или 5'-концов любой цепи и могут быть модифицированы для повышения стабильности или усиления функциональности. В одном из вариантов воплощения миметик miРНК содержит дуплексную область длиной от 16 до 31 нуклеотида и одну или несколько из следующих схем химических модификаций: смысловая цепь содержит 2'-О-метильные модификации нуклеотидов 1 и 2 (считая от 5'-конца смыслового олигонуклеотида) и всех остатков С и U; модификации антисмысловой цепи могут содержать 2'-F-модификацию всех остатков С и U, фосфорилирование 5'-конца олигонуклеотида и стабилизированные межнуклеотидные связи, ассоциированные с "липким" концом 3' из 2 нуклеотидов.

Антимиры или ингибиторы miРНК.

Термины "антимир", "ингибитор микроРНК", "ингибитор miR" или "ингибитор" являются синонимами и означают олигонуклеотиды или модифицированные олигонуклеотиды, которые препятствуют активности специфичных miРНК. В общем случае ингибиторы являются нуклеиновой кислотой или модифицированными нуклеиновыми кислотами по природе, включая олигонуклеотиды, содержащие РНК, модифицированную РНК, ДНК, модифицированную ДНК, запертые нуклеиновые кислоты (LNA) или любую комбинацию вышеуказанного. Модификации включают 2'-модификации (в том числе 2'-О-алкил модификации и 2'-F-модификации) и межнуклеотидные модификации (например, фосфоротиоатные модификации), которые могут влиять на доставку, стабильность, специфичность, внутриклеточную компартиментализацию или активность. Кроме того, ингибиторы miРНК могут содержать конъюгаты, влияющие на доставку, внутриклеточную компартиментализацию, стабильность и/или активность. Ингибиторы могут принимать различные конфигурации, включая одноцепочечную, двухцепочечную (РНК/РНК или РНК/ДНК дуплексы) и шпилечную структуры, в общем случае, ингибиторы miРНК содержат одну или несколько последовательностей или частей последовательностей, которые комплементарны или частично комплементарны зрелой цепи (или цепям) целевой miРНК, кроме того, ингибитор miРНК может также содержать дополнительные последовательности, расположенные с 5'- или 3'-стороны от последовательности, являющейся обратно-комплементарной для зрелой miРНК. Дополнительные последовательности могут быть обратно-комплементарными последовательностям, которые расположены рядом со зрелой miРНК в рgi-miРНК, из которой происходит зрелая miРНК, или дополнительные последовательности могут быть случайными последовательностями (являющимися смесью остатков А, G, С или U). В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения одна или обе дополнительные последовательности являются случайными последовательностями, способными образовывать шпильки. Таким образом, в некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения, последовательность, являющаяся обратно-комплементарной к miРНК, фланкирована с 5'-стороны и с 3'-стороны шпилечными структурами. Ингибиторы микроРНК, если они являются двухцепочечными, могут содержать пары с нарушением комплементарности между нуклеотидами в противоположенных цепях. Дополнительно, ингибиторы микроРНК могут быть соединены с остатками конъюгатов для облегчения поглощения ингибитора клеткой. Например, ингибитор микроРНК может быть соединен с холестерил-5-(бис-(4-метоксифенил)-(фенил)метокси)-3-гидроксипентилкарбаматом), который делает возможным пассивное поглощение ингибитора микроРНК клеткой. Ингибиторы микроРНК, включая шпилечные ингибиторы miРНК, подробно описаны в Vermeulen et al., "Double-Stranded Regions Are Essential Design Components Of Potent Inhibitors of RISC Function", RNA, 13:723-730 (2007) и в WO 2007/095387 и WO 2008/036825, содержание каждой из которых целиком включено в описание в качестве ссылок. Специалист в данной области может выбрать последовательность из базы данных для требуемой miРНК и сконструировать ингибитор, полезный для способов, описанных в этом документе.

U1-адаптор.

U1-адапторы ингибируют полиА-сайты и представляют собой бифункциональные олигонуклеотиды с целевым доменом, комплементарным сайту в составе терминального экзона целевого гена и "U1-домена", который связывается с U1 малой ядерной РНК, являющейся компонентом U1 мяРНК (Goracznik, et al., 2008, Nature Biotechnology, 27(3), 257-263, содержание которой специально целиком включено в описание в качестве ссылки). U1 мяРНК является рибонуклеопротеиновым комплексом, который функционирует в основном при осуществлении ранних этапов образования сплайсосомы путем связывания с экзон-интронной границей пре-мРНК (Brown and Simpson, 1998, Annu Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 49:77-95). Нуклеотиды 2-11 на 5'-конце U1 мяРНК связываются путем спаривания оснований с 5'-одноцепочечным участком пре-мРНК. В одном из вариантов воплощения, олигонуклеотиды согласно изобретению являются U1-адапторами. В одном из вариантов воплощения, U1-адаптер может вводиться в сочетании по меньшей мере с одним другим агентом, представленным iРНК.

Модификации олигонуклеотидов.

Немодифицированные олигонуклеотиды могут быть не оптимальными для некоторых применений, например, немодифицированные олигонуклеотиды могут быть склонны к деградации, например, клеточными нуклеазами. Нуклеазы способны гидролизовать фосфодиэфирные связи нуклеиновых кислот. Однако химические модификации олигонуклеотидов могут придать улучшенные свойства и, например, мо-

гут сделать олигонуклеотиды более стабильными к нуклеазам.

Так как олигонуклеотиды являются полимерами, состоящими из субъединиц или мономеров, многие модификации, описанные ниже, происходят по позиции, которая повторяется в олигонуклеотиде, например, модификация основания, сахара, фосфатного остатка или не входящего в состав мостиков атома кислорода фосфатного остатка. Не требуется, чтобы все позиции в данном олигонуклеотиде были однородно модифицированы, и фактически более одной из вышеупомянутых модификаций может быть вовлечено в одном олигонуклеотиде или даже в одном нуклеозиде в пределах олигонуклеотида.

В некоторых случаях модификация будет происходить по всем рассматриваемым позициям в олигонуклеотиде, но во многих, фактически в большинстве, случаев этого происходить не будет. В качестве примера модификация может происходить только по 3'- или 5'-терминальной позиции, может происходить только во внутренней области, может происходить только в терминальных областях, например, в позиции терминального нуклеотида или в крайних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах олигонуклеотида. Модификация может происходить в двухцепочечной области, одноцепочечной области или в обеих.

Модификация может происходить только в области, охватывающей две цепи двухцепочечного олигонуклеотида, или может происходить только в области, охватывающей одну цепь двухцепочечного олигонуклеотида. Например, фосфоротиоатная модификация в позиции не входящего в состав мостиков атома кислорода может происходить только на одном или на обоих концах, может происходить только в терминальных областях, например в позиции на терминальном нуклеотиде или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах цепи, или может происходить в областях, охватывающих две цепи или одну цепь, в частности, на концах; 5'-конец или концы могут быть фосфорилированы.

Модификация, описанная в этом документе, может являться единственной модификацией или единственным типом модификации, включенной во множество нуклеотидов, или модификация может сочетаться с одной или несколькими другими модификациями, описанными в этом документе. Модификации, описанные в этом документе, могут также сочетаться в олигонуклеотиде, например различные нуклеотиды одного олигонуклеотида могут иметь различные модификации, описанные в этом документе.

В некоторых вариантах воплощения особенно предпочтительно, например, для повышения стабильности включать некоторые нуклеос основания в "липкие" концы или включать модифицированные нуклеотиды или заменители нуклеотидов в одноцепочечные "липкие" концы, например в 5' или 3' "липкий" конец или в оба. Например, может быть желательно включение пуриновых нуклеотидов в "липкие" концы. В некоторых вариантах воплощения все или некоторые основания в 3' или 5' "липком" конце будут модифицированы, например, с участием модификации, описанной в этом документе. Модификации могут включать, например, применение модификаций по 2' ОН-группе сахара рибозы, например применение дезоксирибонуклеотидов, например дезокситимидина, вместо рибонуклеотидов, и модификаций фосфатной группы, например фосфоротиоатных модификаций. "Липкие" концы могут быть не гомологичны целевой последовательности.

Специфичные модификации обсуждаются более подробно ниже.

Фосфатная группа.

Фосфатная группа несет отрицательный заряд. Заряд равномерно распределен между двумя не входящими в состав мостика атомами кислорода. Однако фосфатная группа может быть модифицирована путем замены одного из атомов кислорода другим заместителем. Одним из результатов такой модификации может быть повышенная устойчивость фосфатных остовов РНК олигорибонуклеотида к нуклеолитической деградации. Таким образом, не следуя какой-то определенной теории, в некоторых вариантах воплощения может быть желательным введение изменений, приводящих либо к незаряженным линкерам, либо к заряженным линкерам с несимметричным распределением заряда.

Примеры модифицированных фосфатных групп включают фосфоротиоат, фосфороселенаты, боранофосфаты, боранофосфатные эфиры, Н-фосфонаты, фосфорамидаты, алкил- или арилфосфонаты и фосфотриэфиры. В некоторых воплощениях один из не входящих в состав мостика атомов кислорода фосфатной группы в остатке фосфатного остова может быть замещен любым из следующих остатков: S, Se, BR₃ (R - атом водорода, алкил, арил), C (т.е. алкильной группой, арильной группой и т.д.), H, NR₂ (R - атом водорода, алкил, арил) или OR (R - алкил или арил). Атом фосфора в немодифицированной фосфатной группе не является хиральным. Однако замена одного из не входящих в состав мостика атомов кислорода одним из перечисленных выше атомов или групп атомов превращает атом фосфора в хиральный; иначе говоря, атом фосфора в фосфатной группе, модифицированной таким способом, является стереогенным центром. Стереогенный атом фосфора может обладать либо "R"-конфигурацией (в этом документе - R_p), либо "S"-конфигурацией (в этом документе - S_p).

В фосфородитиоатах оба не входящие в состав мостика атома кислорода заменены на серу. Центральный атом фосфора в фосфородитиоатах не является хиральным, что предотвращает образование диастереомеров олигорибонуклеотидов. Таким образом, не следуя какой-то определенной теории, модификации обоих не входящих в состав мостика атомов кислорода, при которых не появляется хиральный центр, например, образование фосфородитиоатов, могут быть желательны благодаря тому, что при этом не будут получаться смеси диастереомеров. Таким образом, не входящие в состав мостика атомы кисло-

рода могут быть независимо заменены на любой атом или группу из S, Se, B, C, H, N или OR (R - алкил или арил).

Фосфатный линкер также может быть модифицирован путем замены входящего в состав мостика атома кислорода (т.е. атома кислорода, соединяющего фосфат с нуклеозидом) на атом азота (образующие мостик фосфорамидаты), атом серы (образующие мостик фосфоротиоаты) и атом углерода (образующие мостик метиленофосфонаты). Может происходить замена как любого из входящих в состав мостика атомов кислорода, так и обоих входящих в состав мостика атомов кислорода. Когда входящий в состав мостика атом кислорода является 3'-атомом кислорода нуклеозида, предпочтительной является замена на атом углерода. Когда входящий в состав мостика атом кислорода является 5'-атомом кислорода нуклеозида, предпочтительной является замена на атом азота.

Замена фосфатной группы.

Фосфатная группа может быть заменена на соединяющие группы, не содержащие атом фосфора. Не следуя какой-то определенной теории, полагают, что так как заряженная фосфодиэфирная группа является реакционным центром при нуклеолитической деградации, то ее замена на нейтральный структурный миметик должна придать повышенную стабильность к нуклеазам. С другой стороны, не следуя какой-то определенной теории, может быть желательно в некоторых вариантах воплощения ввести изменения, при которых заряженную фосфатную группу заменяют на нейтральный остаток.

Примеры остатков, которые могут заменять фосфатную группу, включают метилфосфонат, гидроксиламино, силексан, карбонат, карбоксиметил, карбамат, амид, тиозфир, этиленоксидный линкер, сульфонат, сульфонамид, тиоформацеталь, формацеталь, оксим, метиленимино, метиленметилямино, метиленгидразо, метилендиметилгидразо и метиленоксиметилямино. Предпочтительные замены включают метиленкарбониламино и метиленметилямино группы.

Модифицированные фосфатные межнуклеозидные связи, где по меньшей мере один из атомов кислорода, присоединенных к фосфату, был заменен или фосфатная группа была заменена на не содержащую фосфор группу, также называют "не фосфодиэфирные связи остова".

Замена рибофосфатного остова.

Могут также быть сконструированы остовы, имитирующие структуру олигонуклеотида, где фосфатный линкер и сахар рибоза заменены на устойчивые к нуклеазам заменители нуклеозидов или нуклеотидов. Не следуя какой-то определенной теории, полагают, что отсутствие повторяющихся заряженных групп в остове снижает связывание с белками, которые распознают полианионы (например, с нуклеазами). С другой стороны, не следуя какой-то определенной теории, может быть желательно в некоторых вариантах воплощения ввести изменения, при которых основания соединены нейтральным остовом из заменителей. Примеры включают мофилино, циклобутил, пирролидин-заменители нуклеозидов и заменитель на основе пептидо-нуклеиновой кислоты (PNA). Предпочтительным является заменитель на основе PNA.

Модификации концов молекулы.

3' и 5'-концы олигонуклеотида могут быть модифицированы. Такие модификации могут происходить по 3'-концу, 5'-концу или по обоим концам молекулы. Они включают модификацию или замену конечного фосфата целиком или одного или нескольких атомов фосфатной группы. Например, 3'- и 5'-концы олигонуклеотида могут быть конъюгированы с другими функциональными молекулами, такими как остатки для мечения, например флуорофоры (например, пирен, TAMRA, флуоресцеин, красители Су3 или Су5), или защитные группы (на основе например, серы, силикона, бора или сложного эфира). Функциональные молекулы могут быть присоединены к сахару через фосфатную группу и/или линкер. Концевой атом линкера может присоединяться к соединительному атому фосфатной группы или C-3', или C-5' O, N, S, или C групп сахара или замещать их. В соответствии с другим вариантом линкер может присоединяться к конечному атому заменителя нуклеотида (например, PNA) или замещать его.

Если соединенные в ряд линкер/фосфат-функциональная молекула-линкер/фосфат расположены между двумя цепями двухцепочечной РНК, этот ряд может заменить петлю РНК-шпильки в РНК-агенте со структурой типа "шпилька".

Модификации концов молекулы, полезные для модуляции активности, включают модификацию 5'-конца фосфатом или аналогами фосфата. Например, в предпочтительных вариантах воплощения антисмысловые цепи двухцепочечной РНК являются фосфорилированными по 5'-концу или содержат фосфорильный аналог на 5'-конце. 5'-Фосфатные модификации включают модификации, которые совместимы с опосредованным RISC сайленсингом генов. Пригодные модификации включают 5'-монофосфат $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-5')$; 5'-дифосфат $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5')$; 5'-трифосфат $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5')$; 5'-гуанозиновый кэп (7-метилированный или неметилированный) $(7\text{m-G-O}-5'-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5')$; 5'-аденозиновый кэп (Appp) или любую структуру кэпа из модифицированного или немодифицированного нуклеотида $(\text{N}-\text{O}-5'-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5')$; 5'-монотиофосфат (фосфоротиоат; $(\text{HO})_2(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$); 5'-монодитиофосфат (фосфородитиоат; $(\text{HO})(\text{HS})(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$); 5'-фосфоротиолат $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{S}-5')$; любую дополнительную комбинацию замены атомов кислорода/серы в монофосфате, дифосфате или трифосфате (например, 5'- α -тиотрифосфат, 5'- γ -тиотрифосфат и т.д.), 5'-фосфорамидаты $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{NH}-5'$,

(HO)(NH₂)(O)P-O-5'), 5'-алкилфосфонаты (R = алкил = метил, этил, изопропил, пропил и т.д., например, RP(OH)(O)-O-5'-, (OH)₂(O)P-5'-CH₂-), 5'-алкилэфирные фосфонаты (R = алкилэфир = метоксиметил (MeOCH₂-), этоксиметил и т.д., например RP(OH)(O)-O-5'-).

Модификации концов молекулы также могут быть полезны для проведения мониторинга распределения, и в таких случаях предпочтительные для добавления группы включают флуорофоры, например флуоресцеин или краситель Alexa, например Alexa 488. Модификации концов молекулы также могут быть полезны для повышения поглощения, полезные для этого модификации включают холестерин. Модификации концов молекулы также могут быть полезны для поперечной сшивки РНК-агента с другим остатком; полезные для этого модификации включают митомицин С.

Нуклеосомы.

Аденин, гуанин, цитозин и урацил являются самыми распространенными основаниями, обнаруженными в РНК. Эти основания могут быть модифицированы или заменены для придания РНК улучшенных свойств. Например, устойчивые к нуклеазам олигорибонуклеотиды можно приготовить с применением этих оснований или синтетических и природных нуклеосомований (например, инозина, тимина, ксантина, гипоксантина, нубуларина, изогуанидина или туберцидина) и любой из вышеуказанных модификаций. В соответствии с другим вариантом может применяться замещенный или модифицированный аналог любого из вышеупомянутых оснований, например "нестандартные основания", "модифицированные основания", "неприродные основания" и "универсальные основания", описанные в этом документе. Неограничивающие примеры включают 2-аминоаденин, 6-метил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 5-галоурацил и цитозин, 5-пропинил-урацил и цитозин, 6-азоурацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 5-галоурацил, 5-(2-аминопропил)урацил, 5-аминоаллилурацил, 8-гало-, amino-, тиол-, тиоалкил-, гидроксил- и другие замещенные по 8 положению аденины и гуанины, 5-трифторометил- и другие замещенные по 5 положению урацилы и цитозины, 7-метилгуанин, замещенные по 5 положению пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и O-6-замещенные пурины, в том числе 2-аминопропиладенин, 5-пропилилурацил и 5-пропилицитозин, дигидроурацил, 3-деаза-5-азацитозин, 2-аминопурин, 5-алкилурацил, 7-алкилгуанин, 5-алкилцитозин, 7-деазааденин, N⁶,N⁶-диметиладенин, 2,6-диаминопурин, 5-аминоаллилурацил, N3-метилурацил, замещенные 1,2,4-триазолы, 2-пиридинон, 5-нитроиндол, 3-нитропиррол, 5-метоксиурацил, урацил-5-оксиуксусная кислота, 5-метоксикарбонилметилурацил, 5-метил-2-тиоурацил, 5-метоксикарбонилметил-2-тиоурацил, 5-метиламинометил-2-тиоурацил, 3-(3-амино-3-карбоксыпропил)урацил, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N⁴-ацетилцитозин, 2-тиоцитозин, N⁶-метиладенин, N⁶-изопентиладенин, 2-метилтио-N⁶-изопентениладенин, N-метилгуанины или O-алкилированные основания. Дополнительные пурины и пиримидины включают таковые, описанные в патенте США № 3687808, таковые, описанные в Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, и таковые, описанные в работе Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613.

Катионные группы.

Модификации олигонуклеотидов также могут включать присоединение одной или нескольких катионных групп к сахару, основанию и/или атому фосфора в составе фосфата или остатка модифицированного фосфатного остова. Катионная группа может быть присоединена к любому атому, способному к замещению, в составе природного, нестандартного или универсального основания. Предпочтительной позицией является позиция, которая не препятствует гибридизации, т.е. не препятствует образованию взаимодействий в виде водородных связей, необходимых для образования пар оснований. Катионная группа может быть присоединена, например, через C2'-позицию сахара или аналогичную позицию в циклическом или ациклическом заместителе сахара. Катионные группы могут включать, например, протонированные аминогруппы, производные например O-AMINE (AMINE = NH₂; алкиламино, диалкиламино, гетероцикл, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамин, полиамино); аминоалкокси, например O(CH₂)_nAMINE, (например, AMINE = NH₂; алкиламино, диалкиламино, гетероцикл, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамин, полиамино); амино (например, NH₂; алкиламино, диалкиламино, гетероцикл, ариламино, диариламино, гетероариламино, дигетероариламино или аминокислота) или NH(CH₂CH₂NH)_nCH₂CH₂-AMINE (AMINE = NH₂; алкиламино, диалкиламино, гетероцикл, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино).

Расположение в пределах олигонуклеотида.

Некоторые модификации могут предпочтительно включаться в состав олигонуклеотида в определенных положениях, например во внутренней части цепи или на 5'- или 3'-конце олигонуклеотида. Предпочтительное положение модификации в составе олигонуклеотида может придавать предпочтительные свойства агенту. Например, предпочтительные места расположения некоторых модификаций могут придавать оптимальные свойства в обеспечении сайленсинга генов или повышенную устойчивость к эндонуклеазной или экзонуклеазной активности.

Один или несколько нуклеотидов в составе олигонуклеотида могут иметь соединение 2'-5'. Один или несколько нуклеотидов в составе олигонуклеотида могут иметь инвертированное соединение, на-

пример соединения 3'-3', 5'-5', 2'-2' или 2'-3'.

Двухцепочечные олигонуклеотиды могут включать по меньшей мере один динуклеотид 5'-уридин-аденин-3' (5'-UA-3'), при этом уридин является 2'-модифицированным нуклеотидом, или концевой динуклеотид 5'-уридин-гуанин-3' (5'-UG-3'), при этом 5'-уридин является 2'-модифицированным нуклеотидом, или концевой динуклеотид 5'-цитидин-аденин-3' (5'-CA-3'), при этом 5'-цитидин является 2'-модифицированным нуклеотидом, или концевой динуклеотид 5'-уридин-уридин-3' (5'-UU-3'), при этом 5'-уридин является 2'-модифицированным нуклеотидом, или концевой динуклеотид 5'-цитидин-цитидин-3' (5'-CC-3'), при этом 5'-цитидин является 2'-модифицированным нуклеотидом, или концевой динуклеотид 5'-цитидин-уридин-3' (5'-CU-3'), при этом 5'-цитидин является 2'-модифицированным нуклеотидом, или концевой динуклеотид 5'-уридин-цитидин-3' (5'-UC-3'), при этом 5'-уридин является 2'-модифицированным нуклеотидом. Двухцепочечные олигонуклеотиды, содержащие эти модификации, особенно стабильны к эндонуклеазной активности.

Общие ссылки.

Олигорибонуклеотиды и олигорибонуклеозиды, применяемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть синтезированы с применением твердофазного синтеза, см., например, "Oligonucleotide synthesis, a practical approach", Ed. M.J. Gait, IRL Press, 1984; "Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach", Ed. F. Eckstein, IRL Press, 1991 (особенно Глава 1, Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis, Глава 2, Oligoribonucleotide synthesis, Глава 3, 2'-O-Methyloligoribonucleotides: synthesis and applications, Глава 4, Phosphorothioate oligonucleotides, Глава 5, Synthesis of oligonucleotide phosphorodithioates, Глава 6, Synthesis of oligo-2'-deoxyribonucleoside methylphosphonates, и Глава 7, Oligodeoxynucleotides containing modified bases. Другие, особенно полезные способы синтеза, реагенты, блокирующие группы и условия проведения реакций описаны в Martin, P., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504; Beaucage, S.L. and Iyer, R.P., *Tetrahedron*, 1992, 48, 2223-2311 and Beaucage, S.L. and Iyer, R.P., *Tetrahedron*, 1993, 49, 6123-6194, или работах, на которые даны ссылки в этих публикациях. Модификации, описанные в WO 00/44895, WO 01/75164 или WO 02/44321, могут применяться в этом документе. Раскрытие всех публикаций, патентов и опубликованных заявок на патент, перечисленных в этом документе, включено в описание в качестве ссылок.

Ссылки по фосфатным группам.

Получение фосфинатных олигорибонуклеотидов описано в патенте США № 5508270. Получение алкилфосфонатных олигорибонуклеотидов описано в патенте США № 4469863. Получение фосфорамидных олигорибонуклеотидов описано в патентах США № 5256775 или 5366878. Получение фосфотриэфирных олигорибонуклеотидов описано в патенте США № 5023243. Получение боранофосфатных олигорибонуклеотидов описано в патентах США № 5130302 и 5177198. Получение 3'-дезоксигуанидин-3'-амино фосфорамидатных олигорибонуклеотидов описано в патенте США № 5476925. 3'-Дезокси-3'-метиленфосфонатные олигорибонуклеотиды описаны в An, H., et al., *J. Org. Chem.* 2001, 66, 2789-2801. Получение соединенных серосодержащими мостиками нуклеотидов описано в Sproat et al. *Nucleosides Nucleotides* 1988, 7, 651 и Crosstick et al. *Tetrahedron Lett.* 1989, 30, 4693.

Ссылки по группам сахара.

Модификации, относящиеся к 2'-модификациям, можно найти в Verma, S. et al. *Annu. Rev. Biochem.* 1998, 67, 99-134 и ссылках, приведенных в этой работе. Специфичные модификации рибозы можно найти в следующих работах: 2'-фторо- (Kawasaki et. al., *J. Med. Chem.*, 1993, 36, 831-841), 2'-МОЕ (Martin, P. *Helv. Chim. Acta*, 1996, 79, 1930-1938), "LNA" (Wengel, J. *Acc. Chem. Res.* 1999, 32, 301-310).

Ссылки по замене фосфатной группы.

Метиленметилямино-сшитые олигорибонуклеозиды, также называемые в этом документе MMI-сшитыми олигорибонуклеозидами, метилендиметилгидразо-сшитые олигорибонуклеозиды, также называемые в этом документе MDH-сшитыми олигорибонуклеозидами, и метиленкарбониламино-сшитые олигонуклеозиды, также называемые в этом документе амидо-3-сшитыми олигорибонуклеозидами, и метиленаминокарбонил-сшитые олигонуклеозиды, также называемые в этом документе амидо-4-сшитыми олигорибонуклеозидами, а также соединения со смешанным остовом, содержащие, например, чередующиеся MMI и PO или PS связи, могут быть получены, как описано в патентах США № 5378825, 5386023, 5489677 и в опубликованных РСТ заявках на патент РСТ/US92/04294 и РСТ/US92/04305 (опубликованных как WO 92/20822 и WO 92/20823 соответственно). Формацеталь- и тиоформацеталь-сшитые олигорибонуклеозиды могут быть получены, как описано в патентах США № 5264562 и 5264564. Этиленоксид-сшитые олигорибонуклеозиды могут быть получены, как описано в патентах США № 5223618. Замены на силоксан описаны в Cormier, J.F. et al., *Nucleic Acids Res.* 1988, 16, 4583. Замены на карбонат описаны в Tittensor, J.R. *J. Chem. Soc.* p. 1971, 1933. Замены на карбоксиметил описаны в Edge, M.D. et al., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1972, 1991. Замены на карбамат описаны в Stirchak, E.P. *Nucleic Acids Res.* 1989, 17, 6129.

Ссылки по замене фосфато-рибозного остова.

Соединения циклобутилового заместителя сахара могут быть получены, как описано в патенте США № 5359044. Пирролидиновый заместитель сахара может быть получен, как описано в патенте США № 5519134. Морфолиновый заместитель сахара может быть получен, как описано в патентах США

№ 5142047 и 5235033, и в раскрытиях других родственных патентов. Пептидо-нуклеиновые кислоты (PNA) известны как таковые и могут быть получены в соответствии с любым из множества способов, указанных в Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, Properties and Potential Applications, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1996, 4, 5-23. Они также могут быть получены в соответствии с патентом США № 5539083.

Ссылки по модификациям концов молекул.

Модификации концов молекул описаны в Manoharan, M. et al. Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 12, 103-128 (2002) и ссылках, приведенных в этой работе.

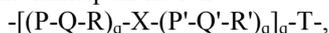
Ссылки по нуклеосообразованиям.

N-2-Замещенные пуриновые нуклеозид амидиты могут быть получены, как описано в патенте США № 5459255. 3-Деазапуриновые нуклеозид амидиты могут быть получены, как описано в патенте США № 5457191. 5,6-Замещенные пиримидиновые нуклеозид амидиты могут быть получены, как описано в патенте США № 5614617. 5-Пропинил пиримидиновые нуклеозид амидиты могут быть получены, как описано в патенте США № 5484908.

Линкеры.

Термин "линкер" означает органический остаток, который соединяет две части соединения. В типичном случае линкеры содержат прямую связь или атом, такой как атом кислорода или атом серы, структурную единицу, такую как NR^1 , $\text{C}(\text{O})$, $\text{C}(\text{O})\text{NH}$, SO , SO_2 , SO_2NH или цепочку атомов, такую как замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный акинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклилалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкениларилалкил, алкениларилалкенил, алкениларилалкинил, алкиниларилалкил, алкиниларилалкенил, алкиниларилалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкенилгетероарилалкил, алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкиларил, алкениларил, алкиниларил, алкилгетероарил, алкенилгетероарил, алкинилгетероарил, где один или несколько остатков метилена могут прерываться или заканчиваться атомом или группой O, S, S(O), SO_2 , $\text{N}(\text{R}^1)_2$, $\text{C}(\text{O})$, расщепляемой линкерной группой, замещенным или незамещенным арилом, замещенным или незамещенным гетероарилом, замещенным или незамещенным гетероциклом; где R^1 - это атом водорода, ацил, алифатическая или замещенная алифатическая группа.

В одном из вариантов воплощения линкер является



где P, R, T, P', R' и T каждый независимо для каждого случая отсутствует, является CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH_2 , CH_2NH , CH_2O , $\text{NHCH}(\text{R}^a)\text{C}(\text{O})$, $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}(\text{R}^a)-$, NH-, $\text{CH}=\text{N}-\text{O}$,



Q и Q' каждый независимо для каждого случая отсутствует, является $-(\text{CH}_2)_n-$, $-\text{C}(\text{R}^1)(\text{R}^2)(\text{CH}_2)_n-$, $-(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{R}^1)(\text{R}^2)-$, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2-$, или $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$;

X - отсутствует или является расщепляемой линкерной группой;

R^a является H или боковой цепью аминокислоты;

R^1 и R^2 каждый независимо для каждого случая является H, CH_3 , OH, SH или $\text{N}(\text{R}^N)_2$;

R^N независимо для каждого случая является H, метилом, этилом, пропилом, изопропилом, бутилом или бензилом;

q, q' и q'' каждый независимо для каждого случая равняется 0-20, и при этом повторяющаяся единица может быть той же самой или иной;

n независимо для каждого случая равняется 1-20;

m независимо для каждого случая равняется 0-50.

В одном из вариантов воплощения линкер содержит по меньшей мере одну расщепляемую линкерную группу.

В некоторых воплощениях линкер является разветвленным линкером. Точка ветвления разветвленного линкера может быть по меньшей мере трехвалентным, но может быть тетравалентным, пентавалентным или гексавалентным атомом или группой, обеспечивающей такие множественные валентности. В некоторых воплощениях точка ветвления представлена -N-, -N(Q)-C-, -O-C-, -S-C-, -SS-C-, -C(O)N(Q)-C-, -OC(O)N(Q)-C-, -N(Q)C(O)-C или -N(Q)C(O)O-C; где Q независимо для каждого случая является H или необязательно замещенным алкилом. В другом варианте воплощения точка ветвления является глицерином или производным глицерина.

Расщепляемые линкерные группы.

Расщепляемая линкерная группа - это группа, которая в существенной мере стабильна вне клетки,

но при попадании в целевую клетку расщепляется с высвобождением двух частей, которые линкер удерживает вместе. В предпочтительном воплощении расщепляемая линкерная группа расщепляется по меньшей мере в 10 раз или более, предпочтительно по меньшей мере в 100 раз быстрее в целевой клетке или при первом стандартном условии (которое может, например, быть выбрано для моделирования или создания образца внутриклеточных условий), чем в крови субъекта, или при втором стандартном условии (которое может, например, быть выбрано для моделирования или создания образца условий, обнаруженных в крови или сыворотке).

Расщепляемые линкерные группы чувствительны к расщепляющим агентам, например рН, окислительно-восстановительному потенциалу или присутствию способствующих деградации молекул. В общем случае расщепляющие агенты или в большей степени преобладают или обнаруживаются с более высоким уровнем содержания или активностей внутри клетки, чем в сыворотке или крови. Примеры таких деградирующих агентов включают: окислительно-восстановительные агенты, которые выбраны для конкретных субстратов или которые не имеют субстратной специфичности, включая, например, окислительные или восстановительные ферменты или восстановительные агенты, такие как меркаптаны, присутствующие в клетке, которые могут деградировать чувствительную к окислительно-восстановительному потенциалу расщепляемую линкерную группу путем восстановления; эстеразы; эндосомы или агенты, способные создавать кислые условия окружающей среды, например таковые, приводящие к показателю рН пять или ниже; ферменты, способные гидролизовать или деградировать расщепляемую в кислых условиях линкерную группу по механизму общего кислотного катализа, пептидазы (которые могут быть субстрат-специфичными) и фосфатазы.

Расщепляемая линкерная группа, такая как дисульфидная связь, может быть чувствительной к рН. Сыворотка человека имеет рН 7,4, в то время как среднее значение рН внутри клетки немного ниже, в диапазоне примерно 7,1-7,3. В эндосомах значение рН более кислое, в диапазоне 5,5-6,0, а лизосомы имеют еще более кислый рН со значением около 5,0. Некоторые линкеры содержат расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется при предпочтительном значении рН, посредством этого высвобождая катионный липид от лиганда внутри клетки или внутри требуемого компартмента клетки.

Линкер может включать расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется конкретным ферментом. Тип расщепляемой линкерной группы, внедренной в линкер, может зависеть от целевой клетки. Например, лиганды направленного действия на клетки печени могут быть присоединены к катионным липидам через линкер, который содержит сложнэфирную группу. В клетках печени содержится много эстераз, по этой причине линкер будет расщепляться более эффективно в клетках печени, чем в типах клеток, не богатых содержанием эстераз. Другие типы клеток, богатых эстеразами, включают клетки легкого, коркового вещества почки и семенников.

Линкеры, содержащие пептидные связи, могут применяться, если направленное действие осуществляется на типы клеток, богатые пептидазами, такие как клетки печени и синовиоциты.

В общем случае пригодность кандидатной расщепляемой линкерной группы можно оценить с помощью испытания способности деградирующего агента (или условия) расщеплять кандидатную линкерную группу. Также желательно дополнительно испытать кандидатную расщепляемую линкерную группу на способность быть устойчивой к расщеплению в крови или при контакте с другими не целевыми тканями. Таким образом, можно определить относительную чувствительность к расщеплению при первом и втором условии, при этом первое выбрано так, чтобы оно моделировало расщепление в целевой клетке, а второе выбрано таким образом, чтобы оно моделировало расщепление в других тканях или биологических жидкостях, например в крови или сыворотке. Оценку можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в культуре клеток, в органной или тканевой культуре или на целом организме животного. Может оказаться полезным провести начальную оценку в условиях бесклеточной системы или культуры и подтвердить ее путем дополнительной оценки на целом организме животного. В предпочтительных воплощениях полезные кандидатные соединения расщепляются по меньшей мере в 2, 4, 10 или 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных так, чтобы они моделировали внутриклеточные условия) по сравнению с кровью или сывороткой (или в условиях *in vitro*, выбранных так, чтобы они моделировали условия внеклеточной среды).

Чувствительные к окислительно-восстановительному потенциалу расщепляемые линкерные группы.

Один класс расщепляемых линкерных групп представлен чувствительными к окислительно-восстановительному потенциалу расщепляемыми линкерными группами, которые расщепляются при восстановлении или окислении. Примером расщепляемой при восстановлении линкерной группы является дисульфидная линкерная группа (-S-S-). Чтобы определить, является ли кандидатная расщепляемая линкерная группа пригодной "расщепляемой при восстановлении линкерной группой" или, например, пригодной для применения с конкретным остатком интерферирующей РНК и конкретным агентом направленного действия, можно ориентироваться на способы, описанные в этом документе. Например, кандидатную группу можно оценить путем инкубирования с дитиотреитолом (ДТТ) или с другим восстанавливающим агентом, применяя известные специалисту в данной области реагенты, что воспроизводит скорость расщепления, которая наблюдалась бы в клетке, например в целевой клетке. Кандидатную

группу также можно оценить в условиях, которые выбраны так, чтобы они моделировали условия в крови или сыворотке. В предпочтительном воплощении кандидатные соединения расщепляются в крови не более чем на 10%. В предпочтительных воплощениях полезные кандидатные соединения деградируют по меньшей мере в 2, 4, 10 или 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных так, чтобы они моделировали внутриклеточные условия) по сравнению с кровью (или в условиях *in vitro*, выбранных так, чтобы они моделировали условия внеклеточной среды). Скорость расщепления кандидатных соединений можно определить с применением стандартного анализа ферментативной кинетики в условиях, выбранных так, чтобы они моделировали внутриклеточную среду, и в сравнении с условиями, выбранными таким образом, чтобы они моделировали внеклеточную среду.

Расщепляемые линкерные группы на основе фосфата.

Расщепляемые линкерные группы на основе фосфата расщепляются агентами, которые деградируют или гидролизуют фосфатную группу. Примером агента, расщепляющего фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как клеточные фосфатазы. Примерами линкерных групп на основе фосфата являются -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-S-, -O-P(S)(Rk)-S-. Предпочтительными воплощениями являются -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S-, -O-P(S)(H)-S-. Предпочтительным воплощением является -O-P(O)(OH)-O-. Эти кандидатные соединения можно оценить с применением способов, аналогичных описанным выше.

Расщепляемые под действием кислоты линкерные группы.

Расщепляемые под действием кислоты линкерные группы являются линкерными группами, которые расщепляются в кислых условиях. В предпочтительных воплощениях расщепляемые под действием кислоты линкерные группы расщепляются в кислой среде со значением pH около 6,5 или ниже (например, около 6,0, 5,5, 5,0 или ниже) или под действием агентов, таких как ферменты, которые могут действовать по общему кислотному механизму. В клетке специфичные органеллы с низким pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечивать способствующее расщеплению окружение для расщепляемых под действием кислоты линкерных групп. Неограничивающие примеры расщепляемых под действием кислоты линкерных групп включают гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Расщепляемые под действием кислоты группы могут иметь общую формулу -C=NN-, C(O)O или -OC(O). В предпочтительном воплощении атом углерода, присоединенный к атому кислорода сложного эфира (алкоксигруппа), принадлежит арильной группе, замещенной алкильной группе или третичной алкильной группе, такой как диметилпентил или трет-бутил. Эти кандидатные соединения можно оценить с применением способов, аналогичных описанным выше.

Линкерные группы на основе сложного эфира.

Линкерные группы на основе сложного эфира, которые подлежат расщеплению, расщепляются в клетках ферментами, такими как эстеразы и амидазы. Неограничивающие примеры расщепляемых линкерных групп на основе сложного эфира включают сложные эфиры алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп. Расщепляемые линкерные группы на основе сложного эфира имеют общую формулу -C(O)O- или -OC(O)-. Эти кандидатные соединения можно оценить с применением способов, аналогичных описанным выше.

Расщепляемые группы на основе пептида.

Расщепляемые линкерные группы на основе пептида расщепляются в клетках ферментами, такими как пептидазы и протеазы. Расщепляемые линкерные группы на основе пептида представляют собой пептидные связи, сформированные между аминокислотами с образованием олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т.д.) и полипептидов. Расщепляемые группы на основе пептида не включают амидогруппу (-C(O)NH-). Амидогруппа может образовываться между любым алкиленом, алкениленом или алкиниленом. Пептидная связь является особым типом амидной связи, сформированной между аминокислотами с образованием пептидов и белков. Расщепляемая группа на основе пептида в общем случае ограничена пептидной связью (т.е. амидной связью), сформированной между аминокислотами с образованием пептидов и белков, и не включает полностью функциональную амидогруппу. Расщепляемые линкерные группы на основе пептида имеют общую формулу -NHCHR^AC(O)NHCHR^BC(O)-, где R^A и R^B - R-группы двух соседних аминокислот. Эти кандидатные соединения можно оценить с применением способов, аналогичных описанным выше.

Лиганды.

Широкое разнообразие молекул может быть присоединено к олигонуклеотидам и липидам по настоящему изобретению. Предпочтительными остатками являются лиганды, которые присоединяют, предпочтительно ковалентно, либо непосредственно, либо опосредованно через вставочный элемент.

В предпочтительных воплощениях лиганд изменяет распределение, направление действия или время существования молекулы, в которую он внедрен. В предпочтительных воплощениях лиганд обеспечивает повышенную аффинность к выбранной мишени, например к молекуле, клетке или типу клеток, компартменту, например клеточному или органному компартменту, к ткани, органу или области тела,

например, при сравнении с формой, лишенной такого лиганда. Лиганды, обеспечивающие повышенную аффинность к выбранной мишени, также называют нацеливающими лигандами. Предпочтительными лигандами для конъюгации с липидами по настоящему изобретению являются лиганды направленного действия.

Некоторые лиганды могут обладать эндосомолитическими свойствами. Эндосомолитические лиганды способствуют лизису эндосомы и/или транспорту композиции согласно изобретению, или ее компонентов, из эндосомы в цитоплазму клетки. Эндосомолитический лиганд может являться полианионным пептидом или пептидомиметиком, демонстрирующим pH-зависимую мембранную активность и фузогенность. В некоторых воплощениях эндосомолитический лиганд приобретает свою активную конформацию при эндосомальном значении pH. "Активная" конформация - это конформация, при которой эндосомолитический лиганд обеспечивает лизис эндосомы и/или транспорт композиции согласно изобретению, или ее компонентов, из эндосомы в цитоплазму клетки. Примеры эндосомолитических лигандов включают GALA-пептид (Subbarao et al., *Biochemistry*, 1987, 26:2964-2972), EALA-пептид (Vogel et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118:1581-1586) и их производные (Turk et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 2002, 1559:56-68). В некоторых воплощениях эндосомолитический компонент может содержать химическую группу (например, аминокислоту), которая будет претерпевать изменение заряда или протонирование в ответ на изменение pH. Эндосомолитический компонент может быть линейным или разветвленным. Примеры первичных последовательностей эндосомолитических лигандов на основе пептидов показаны в табл. 4.

Таблица 4
Список пептидов, обладающих эндосомолитической активностью

Название	Последовательность (от N- к C-концу)	Ссылка
GALA	AALEALAEALEALAEALAEAAAAGGC	1
EALA	AALAEALAEALAEALAEALAAAAGGC	2
	ALEALAEALEALAEA	3
INF-7	GLFEAIEGFIENGWEGMIWDYG	4
Inf HA-2	GLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYG	5
diINF-7	GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGWYGC GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGWYGC	5
diINF3	GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGGC GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGGC	6
GLF	GLFGALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAAGGSC	6
GALA-INF3	GLFEAIEGFIENGWEGLAELAEALAEALAAGGSC	6
INF-5	GLF EAI EGFI ENGW EGNl DG K GLF EAI EGFI ENGW EGNl DG	4

n, норлейцин.

Ссылки.

1. Subbarao et al., *Biochemistry*, 1987, 26: 2964-2972.
2. Vogel et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 1581-1586
3. Turk, M. J., Reddy, J. A. et al. (2002). Characterization of a novel pH-sensitive peptide that enhances drug release from folate-targeted liposomes at endosomal pHs. *Biochim. Biophys. Acta* 1559, 56-68.
4. Plank, C., Oberhauser, B., Mechtler, K., Koch, C., Wagner, E. (1994). The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems, *J. Biol. Chem.* 269 12918-12924.
5. Mastrobattista, E., Koning, G. A. et al. (2002). Functional characterization of an endosome-disruptive peptide and its application in cytosolic delivery of immunoliposome-entrapped proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 27135-43.
6. Oberhauser, B., Plank, C. et al. (1995). Enhancing endosomal exit of nucleic acids using pH-sensitive viral fusion peptides. *Deliv. Strategies Antisense Oligonucleotide Ther.* 247-66.

Предпочтительные лиганды могут улучшать свойства, связанные с транспортом, гибридизацией и специфичностью, и также могут улучшать устойчивость к нуклеазам получившегося в результате природного или модифицированного олигорибонуклеотида или полимерной молекулы, содержащей любую комбинацию мономеров, описанных в этом документе, и/или природные или модифицированные рибонуклеотиды.

В целом, лиганды могут содержать терапевтические модификаторы, например, для усиления поглощения; диагностические соединения или репортерные группы, например, для мониторинга распределения; агенты для поперечной сшивки и остатки, придающие устойчивость к нуклеазам. Основные примеры включают липиды, стероиды, витамины, сахара, белки, пептиды, полиамины и миметики пептидов.

Лиганды могут включать субстанцию природного происхождения, такую как белок (например, сы-

вороточный альбумин человека (HSA), липопротеин низкой плотности (ЛНП), липопротеин высокой плотности (ЛВП) или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновая кислота) или липид. Лиганд также может являться рекомбинантной или синтетической молекулой, такой как синтетический полимер, например синтетическая полиаминокислота или олигонуклеотид (например, аптамер). Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновую кислоту, поли-L-глутаминовую кислоту, сополимер стиреновой кислоты с малеиновым ангидридом, поли-(L-лактид-ко-гликолевый) сополимер, сополимер дивинилового эфира с малеиновым ангидридом, N-(2-гидроксипропил)метакриламидный сополимер (НМРА), полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли-(2-этилакриловую кислоту), N-изопропилакриламидные полимеры или полифосфазин. Примеры полиаминов включают полиэтиленмин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, пептидомиметический полиамин, дендримерный полиамин, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичную соль полиамина или α -спиральный пептид.

Лиганды также могут включать группы направленного действия, например, агенты направленного действия на клетку или ткань, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, связывающееся с определенным типом клеток, таким как клетки почки. Группа направленного действия может являться тиротропином, меланотропином, лектином, гликопротеином, сурфактантным белком А, углеводом муцина, мультивалентной лактозой, мультивалентной галактозой, N-ацетил-галактозамином, N-ацетил-глюкозамином, мультивалентной маннозой, мультивалентной фукозой, гликозилированными полиаминокислотами, мультивалентной галактозой, трансферрином, бисфосфонатом, полиглутаматом, полиаспаратом, липидом, холестерином, стероидом, жёлчной кислотой, фолатом, витамином В12, биотином, RGD-пептидом, миметиком RGD-пептида или аптамером. В табл. 5 показаны некоторые примеры лигандов направленного действия и ассоциированных с ними рецепторов.

Таблица 5

Лиганды направленного действия и ассоциированные с ними рецепторы

Клетки печени	Лиганд	Рецептор
1) Паренхимная клетка (PC) (гепатоциты)	Галактоза	ASGP-R (рецептор асиологликопротеинов)
	Gal NAc (N-ацетил-галактозамин)	ASPG-R Рецептор Gal NAc
	Лактоза	
	Асиалофетуин	ASPG-г
2) Синусоидальная эндотелиальная клетка (SEC)	Гиалуроновая кислота	Рецептор гиалуроновой кислоты
	Про-коллаген	Рецептор про-коллагена
	Отрицательно заряженные молекулы	Фагоцитарные рецепторы
	Манноза	Рецепторы маннозы
	N-ацетил-глюкозамин	Фагоцитарные рецепторы
	Иммуноглобулины	Рецептор Fc
	Липополисахарид	Рецептор CD14
	Инсулин	Рецептор-опосредованный трансцитоз
	Трансферрин	Рецептор-опосредованный трансцитоз
	Альбумины	Неспецифичные
	Конъюгаты сахаров с альбуминами	
	Маннозо-6-фосфат	Рецептор маннозо-6-фосфата
3) Клетка Купфера (KC)	Манноза	Рецепторы маннозы
	Фукоза	Рецепторы фукозы
	Альбумины	Неспецифичные
	Конъюгаты маннозы с альбуминами	

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие агенты (например, акридины), поперечные шивки (например, псорален, митомицин С), порфирины (TRPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), не природные эндонуклеазы (например, ЭДТА), липофильные молекулы, например холестерин, холевую кислоту, адамантан-уксусную кислоту, 1-пирен-масляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)-глицерин, геранилоксигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, ОЗ-(олеоил)литохолевую кислоту, ОЗ-(олеоил)холевую кислоту, конъюгаты диметокситритила или феноксазина с пептидом (например, пептидом antennapedia, Tat-пептидом), алкилирующие агенты, фосфат, amino-, меркапто-, ПЭГ (например, ПЭГ-40К), МПЭГ, [МПЭГ]₂, полиамино-, алкил, замещенный алкил, радиоактивно меченые маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), соединения, способствующие транспорту/всасыванию (например, аспирин, витамин Е, фолевую кислоту), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бис-имидазол, гистамин, кластеры имидазола, конъюгаты акридина и имидазола, Eu³⁺ комплексы тетраазамакроциклов), динитрофенил, HRP или AP.

Лиганды могут быть белками, например гликопротеинами, или пептидами, например молекулами, имеющими специфичную аффинность к ко-лиганду, или антителами, например антителом, связываю-

щимся со специфичным типом клеток, таким как раковая клетка, эндотелиальная клетка или клетка кости. Лиганды также могут включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать непептидные молекулы, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, мультивалентная лактоза, мультивалентная галактоза, N-ацетил-галактозамин, N-ацетил-глюкозамин, мультивалентная манноза, мультивалентная фукоза или аптамеры. Лиганд может являться, например, липополисахаридом, активатором р38 MAP-киназы или активатором NF-κB.

Лиганд может быть субстанцией, например лекарственным веществом, которое может повышать поглощение агента, участвующего в РНКi, клеткой, например, путем разрушения цитоскелета клетки, например, посредством разрушения клеточных микротрубочек, микрофиламентов и/или промежуточных филаментов. Лекарственное вещество может быть, например, таксоном, винкристином, винбластином, цитохалазином, нокодазолом, ясплакинолидом, латрункулином А, фаллоидином, свинхолидом А, инданоцином или миосервином.

Лиганд может повышать поглощение агента, участвующего в РНКi, клеткой путем, например, активации воспалительного ответа. Примеры лигандов, которые могли бы оказывать такое действие, включают фактор некроза опухолей α (TNF-α), интерлейкин-1β или γ-интерферон.

В одном из вариантов настоящего изобретения, лиганд является липидом или молекулой на основе липида. Такой липид или молекула на основе липида предпочтительно связываются с белком сыворотки, например сывороточным альбумином человека (HSA). HSA-связывающий лиганд делает возможным распределение конъюгата к целевой ткани, например, не входящей в состав почек целевой ткани организма. Например, целевая ткань может быть тканью печени, включая паренхимные клетки печени. Другие молекулы, связывающиеся с HSA, также могут применяться в качестве лигандов. Например, могут применяться непростин или аспирин. Липид или лиганд на основе липида может (а) повышать устойчивость конъюгата к деградации, (б) усиливать направленное действие или транспорт в целевую клетку или к клеточной мембране и/или (в) может применяться для регулировки связывания с белком сыворотки, например HSA.

Лиганд на основе липида может применяться для модуляции, например, для контроля связывания конъюгата с целевой тканью. Например, липид или лиганд на основе липида, который связывается с HSA более сильно, с меньшей вероятностью будет направлен на почки и, следовательно, с меньшей вероятностью будет выводиться из организма. Липид или лиганд на основе липида, который связывается с HSA менее сильно, может применяться для направленного действия конъюгата на почки.

В предпочтительном воплощении лиганд на основе липида связывается с HSA. Предпочтительно он связывается с HSA с существенной аффинностью таким образом, что конъюгат будет предпочтительно распределяться к не входящим в состав почек тканям. Однако предпочтительно, чтобы аффинность не была настолько сильной, что связывание HSA с лигандом было бы необратимым.

В другом предпочтительном воплощении лиганд на основе липида связывается с HSA слабо или не связывается вовсе таким образом, что конъюгат будет предпочтительно распределяться к почкам. Другие остатки, направленные к клеткам почек, также могут применяться вместо или совместно с лигандом на основе липида.

Еще одной особенностью является то, что лиганд представлен остатком, например витамином, который захватывается целевой клеткой, например пролиферирующей клеткой. Это, в частности, полезно для лечения нарушений, характеризующихся нежелательной пролиферацией клеток, например, злокачественного или не злокачественного типа, например опухолевых клеток. Примеры витаминов включают витамины А, Е и К. Другие примеры витаминов включают витамины группы В, например фолевую кислоту, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль или другие витамины или питательные вещества, поглощаемые опухолевыми клетками. Сюда также относятся HAS, липопротеин низкой плотности (ЛНП) и липопротеин высокой плотности (ЛВП).

Еще одной особенностью является то, что лиганд представлен проникающим в клетку агентом, предпочтительно спиральным проникающим в клетку агентом. Предпочтительно агент является амфипатичным. Примером агента служит пептид, такой как tat или antennopodia. Если агент является пептидом, он может быть модифицирован, в том числе, пептидилмиметиком, инвертомерами, непептидными или псевдопептидными линкерами или применением D-аминокислот. Спиральный агент предпочтительно является α-спиральным агентом, который предпочтительно имеет липофильную и липофобную фазу.

Лиганд может быть пептидом или пептидомиметиком. Пептидомиметик (также называемый в этом документе олигопептидомиметиком) - это молекула, способная сворачиваться в определенную трехмерную структуру, схожую со структурой природного пептида. Остаток пептида или пептидомиметика может иметь длину примерно 5-50 аминокислот, например длину около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот (например, см. табл. 6).

Таблица 6

Примеры проникающих в клетку пептидов

Проникающий в клетку пептид	Аминокислотная последовательность	Ссылка
Пенетратин	RQIKIWFQNRRMKWKK	Derossi <i>et al.</i> , J. Biol. Chem. 269:10444, 1994
Tat-фрагмент (48-60)	GRKKRRQRRRPPQC	Vives <i>et al.</i> , J. Biol. Chem., 272:16010, 1997
Пептид на основе сигнальной последовательности	GALFLGWLG A AGS TMG A WS QPKKKR KV	Chaloin <i>et al.</i> , Biochem. Biophys. Res. Commun., 243:601, 1998
PVEC	LLIILRRRIRKQ AH AH S K	Elmqvist <i>et al.</i> , Exp. Cell Res., 269:237, 2001
Транспортан	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL	Pooga <i>et al.</i> , FASEB J., 12:67, 1998
Амфифильный модельный пептид	KLALKLALKALKAAALKLA	Oehlke <i>et al.</i> , Mol. Ther., 2:339, 2000
Arg ₉	RRRRRRRRR	Mitchell <i>et al.</i> , J. Pept. Res., 56:318, 2000
Проникающий через бактериальную клеточную стенку	KFFKFFKFFK	
LL-37	LLGDFRKS KEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES	
Цекропин P1	SWLSKTAKKLENSAKKRISGIAIAIQGGPR	
α-дефенсин	ACYCRIPACIAGERRYGTCIYQRLWAFCC	
β-дефенсин	DHYNVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCYRGKAKCCK	
Бактенецин	RKCRIVVIRVCR	
PR-39	RRRPRPYLPRPRPPFPRLPPRPPGFPPRFPPFPGR-NH ₂	
Индолицидин	ILPWKWPWWPWR-NH ₂	

Пептид или пептидомиметик может являться, например, проникающим в клетку пептидом, катионным пептидом, амфипатическим пептидом или гидрофобным пептидом (например, состоящим в основном из Туг, Тгр или Phe). Пептидный остаток может быть дендримерным пептидом, пептидом с ограниченной конформационной свободой или пептидом с поперечной сшивкой. В соответствии с другим вариантом пептидный остаток может включать гидрофобную последовательность для транслокации через мембрану (MTS). Примером пептида, содержащего гидрофобную MTS, является RFGF, имеющий аминокислотную последовательность AAVALLPAVLLALLAP.

Аналог RFGF (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP), содержащий гидрофобную MTS, может также быть остатком направленного действия. Пептидный остаток может являться пептидом "доставки", который переносит крупные полярные молекулы, в том числе пептиды, олигонуклеотиды и белки, через клеточные мембраны.

Например, было обнаружено, что последовательности из Tat-белка ВИЧ (GRKKRRQRRRPPQ) и белка Antennapedia дрозофилы (RQIKIWFQNRRMKWKK) способны функционировать в качестве пептидов доставки. Пептид или пептидомиметик может кодироваться случайной последовательностью ДНК, например, пептид, идентифицированный в составе библиотеки на основе фагового дисплея, или комбинаторной библиотеки "один-шарик-одно-соединение" (ОВОС) (Lam *et al.*, Nature, 354:82-84, 1991). Предпочтительно пептид или пептидомиметик, присоединенный к агенту, участвующему в РНК_i, через внедренную мономерную единицу, является пептидом направленного действия, таким как пептид аргинин-глицин-аспарагиновая кислота (RGD) или миметик RGD. Пептидный остаток может иметь длину в диапазоне от примерно 5 до примерно 40 аминокислот. Пептидные остатки могут иметь структурную модификацию, такую, которая повышает стабильность или влияет на конформационные свойства. Могут применяться любые структурные модификации, описанные ниже.

Остаток RGD-пептида может применяться для направленного действия на опухолевую клетку, такую как эндотелиальная опухолевая клетка или клетка раковой опухоли груди (Zitzmann *et al.*, Cancer

Res., 62:5139-43, 2002). RGD-пептид может облегчать направление действия агента, участвующего в РНКi, на опухоли множества других тканей, включая легкие, почки, селезенку или печень (Aoki et al., Cancer Gene Therapy, 8:783-787, 2001). Предпочтительно RGD-пептид будет облегчать направление действия агента, участвующего в РНКi, на почку. RGD-пептид может быть линейным или циклическим и может быть модифицирован, например гликозилирован или метилирован, для облегчения направления действия на специфичные ткани. Например, гликозилированный RGD-пептид может доставлять агент, участвующий в РНКi, к опухолевой клетке, экспрессирующей $\alpha\beta 3$ (Haubner et al., Jour. Nucl. Med., 42:326-336, 2001).

Могут применяться пептиды, которые направлены на маркеры, которыми обогащены пролиферирующие клетки. Например, RGD-содержащие пептиды и пептидомиметики могут быть направлены на раковые клетки, в частности клетки, экспонирующие интегрин $\alpha\beta 3$. Таким образом, можно применять RGD-пептиды, циклические пептиды, содержащие RGD, RGD-пептиды, содержащие D-аминокислоты, а также синтетические миметики RGD. В дополнение к RGD, можно применять другие остатки, которые направлены на лиганд интегрин $\alpha\beta 3$. В общем случае такие лиганды могут применяться для контроля пролиферирующих клеток и ангиогенеза. Предпочтительные конъюгаты лигандов этого типа направлены на PECAM-1, VEGF или другие опухолевые гены, например опухолевые гены, описанные в этом документе.

"Проникающий в клетку пептид" способен проникать в клетку, например микробную клетку, такую как бактериальная клетка или клетка гриба, или в клетку млекопитающего, такую как клетка человека. Проникающий в бактериальную клетку пептид может являться, например, α -спиральным линейным пептидом (например, LL-37 или Церопином PI), содержащим дисульфидную связь пептидом (например, α -дефенсином, β -дефенсином или бактенецином), или пептидом, содержащим только одну или две доминирующие аминокислоты (например, PR-39 или индолицидином). Проникающий в клетку пептид может также содержать сигнал ядерной локализации (NLS). Например, проникающий в клетку пептид может являться двухчастным амфипатическим пептидом, таким как MPG, который получен слиянием пептидного домена ВИЧ-1 gp41 и NLS большого Т-антигена вируса SV40 (Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

В одном из вариантов воплощения пептид направленного действия, присоединенный к агенту, участвующему в РНКi, и/или олигомеру-носителю, может быть амфипатическим α -спиральным пептидом. Неограничивающие примеры амфипатических α -спиральных пептидов включают цекропины, ликотоксины, парадаксины, буфорин, CPF, бомбинин-подобный пептид (BLP), кателицидины, цератотоксины, пептиды *S. clava*, кишечные антимикробные пептиды миксины (HFIAP), магаинины, бревинины-2, дермасептины, мелиттины, плейроцидин, H₂A-пептиды, пептиды Xenopus, эскулентинис-1 и каерины. Ряд факторов должны предпочтительно учитываться для сохранения целостности стабильной спирали. Например, будет применяться максимальное количество стабилизирующих спираль остатков (например, Leu, Ala или Lys) и минимальное количество дестабилизирующих спираль остатков (например, пролина или циклических мономерных единиц). Следует учитывать кэспирующий остаток (например, Gly является примером N-кэспирующего остатка) и/или может применяться C-концевое амидирование для обеспечения дополнительной водородной связи с целью стабилизации спирали. Образование солевых мостиков между остатками с противоположными зарядами, разделенными $i\pm 3$ или $i\pm 4$ позициями, может обеспечить стабильность. Например, катионные остатки, такие как лизин, аргинин, гомо-аргинин, орнитин или гистидин, могут образовывать солевые мостики с анионными остатками глутаматом и аспаратом.

Пептидные и пептидомиметические лиганды включают таковые с пептидами естественного происхождения или модифицированными, например D- или L-пептиды; α -, β - или ω -пептиды; N-метилпептиды; азапептиды; пептиды, имеющие один или несколько амидогрупп, т.е. пептиды, у которых связи между мономерами заменены одной или несколькими связями на основе мочевины, тиомочевины, карбамата, или сульфонилмочевины; или циклические пептиды.

Лиганд направленного действия может быть любым лигандом, способным оказывать действие на специфичный рецептор. Примерами являются: фолат, GalNAc, галактоза, манноза, маннозо-6-фосфат, кластеры сахаров, такие как кластер GalNAc, маннозный кластер, галактозный кластер, или аптамер. Кластер - это комбинация двух или нескольких единиц сахаров. Лиганды направленного действия также включают лиганды интегриновых рецепторов, лиганды хемокиновых рецепторов, трансферрин, биотин, лиганды серотониновых рецепторов, PSMA, эндотелии, GCP II, соматостатин, лиганды ЛНП и ЛВП. Лиганды также могут быть на основе нуклеиновой кислоты, например, аптамер. Аптамер может быть немодифицированным или нести любую комбинацию модификаций, описанных в этом документе.

Агенты высвобождения из эндосом включают имидазолы, поли- или олигоимидазолы, PEI, пептиды, фузогенные пептиды, поликарбоксилаты, поликатионы, маскированные олиго- или поли-катионы или анионы, ацетали, полиацетали, кетали/поликетали, ортоэфир, полимеры с маскированными или не маскированными катионными или анионными зарядами, дендримеры с маскированными или не маскированными катионными или анионными зарядами.

ФК-модулятор обозначает фармакокинетический модулятор. ФК-модулятор включает липофиль-

ные молекулы, желчные кислоты, стероиды, аналоги фосфолипидов, пептиды, агенты, связывающиеся с белками, ПЭГ, витамины и т.п. Неограничивающие примеры ФК-модуляторов включают холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицерид, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин и т.д. Известно, что олигонуклеотиды, которые содержат несколько фосфоротиоатных связей, также связываются с белком сыворотки, поэтому короткие олигонуклеотиды, например олигонуклеотиды длиной примерно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие множество фосфоротиоатных связей в остове, также пригодны для настоящего изобретения в качестве лигандов (например, ФК-модулирующих лигандов).

Кроме того, аптамеры, которые связываются с компонентами сыворотки (например, белками сыворотки), также пригодны для настоящего изобретения в качестве ФК-модулирующих лигандов.

Другие лиганды, пригодные для настоящего изобретения, описаны в находящихся в процессе одновременного рассмотрения заявках USSN: 10/916185, поданной 10 августа 2004 г.; USSN: 10/946873, поданной 21 сентября 2004 г.; USSN: 10/833934, поданной 3 августа 2007 г.; USSN: 11/115989, поданной 27 апреля 2005 г., и USSN: 11/944227, поданной 21 ноября 2007 г., которые фактически включены в описание полностью в качестве ссылок.

Когда присутствуют два или несколько лигандов, то лиганды могут все иметь одинаковые свойства, все иметь разные свойства или некоторые лиганды могут иметь одинаковые свойства, в то время как другие - иметь разные свойства. Например, лиганд может иметь направленные свойства, иметь эндосомолитическую активность или иметь ФК-модулирующие свойства. В предпочтительном воплощении все лиганды имеют разные свойства.

Лиганды могут быть присоединены к олигонуклеотидам в различных положениях, например к 3'-концу, 5'-концу и/или в позиции внутри последовательности. В предпочтительных воплощениях лиганд присоединен к олигонуклеотидам через промежуточную структуру. Лиганд или присоединенный через промежуточную структуру лиганд может присутствовать на мономере, когда названный мономер вовлекается в растущую цепь. В некоторых вариантах воплощения лиганд может быть вовлечен путем соединения с мономером-"предшественником" после того, как названный мономер-"предшественник" был вовлечен в растущую цепь. В качестве примера мономер, имеющий, например, промежуточную соединительную структуру с аминоконцом (т.е. не содержащий ассоциированного лиганда), например, TAP-(CH₂)NNH₂, может быть вовлечен в растущую смысловую или антисмысловую цепь. На последующем этапе, т.е. после вовлечения мономера-предшественника в цепь, лиганд, имеющий электрофильную группу, например пентафторофенил-эфирную или альдегидную группу, может быть впоследствии присоединен к мономеру-предшественнику путем взаимодействия электрофильной группы лиганда с концевой нуклеофильной группой соединительной структуры мономера-предшественника.

В случае двухцепочечных олигонуклеотидов лиганды могут быть присоединены к одной или обеим цепям. В некоторых вариантах воплощения двухцепочечный агент, участвующий в РНКi, содержит лиганд, конъюгированный со смысловой цепью. В других вариантах воплощения двухцепочечный агент, участвующий в РНКi, содержит лиганд, конъюгированный с антисмысловой цепью.

В некоторых вариантах воплощения лиганд может быть конъюгирован с азотистыми основаниями, остатками сахара или межнуклеозидными связями молекулы нуклеиновой кислоты. Конъюгация с пуриновыми азотистыми основаниями или их производными может происходить по любой позиции, включая эндоциклические и экзоциклические атомы. В некоторых вариантах воплощения 2-, 6-, 7- или 8-позиции пуринового азотистого основания соединены с конъюгирующим остатком. Конъюгация с пиримидиновыми азотистыми основаниями или их производными также может происходить по любой позиции. В некоторых вариантах воплощения 2-, 5- и 6-позиции пиримидинового азотистого основания могут быть замещены конъюгирующим остатком. Конъюгация с остатками сахара в составе нуклеозида может происходить по любому атому углерода. Примеры атомов углерода в составе остатка сахара, к которым может быть присоединен конъюгирующий остаток, включают 2', 3' и 5' атомы углерода. Позиция 1' также может быть соединена с конъюгирующим остатком, например, в случае отсутствия азотистого основания. Межнуклеозидные связи также могут нести конъюгированные остатки. В случае фосфорсодержащих связей (например, фосфодиэфирной, фосфоротиоатной, фосфородитиоатной, фосфорамидатной и т.п.) конъюгирующий остаток может быть присоединен непосредственно к атому фосфора или к атому O, N или S, связанному с атомом фосфора. В случае амино- или амидосодержащих межнуклеозидных связей (например, PNA) конъюгирующий остаток может быть присоединен к атому азота амино- или амидогруппы или к соседнему атому углерода.

Существует множество способов получения конъюгатов олигомерных соединений. В общем случае олигомерное соединение присоединяют к конъюгирующему остатку посредством взаимодействия реакционно-способной группы (например, OH, SH, амино-, карбоксильной, альдегидной и т.п.) на олигомерном соединении с реакционно-способной группой на конъюгирующем остатке. В некоторых вариантах воплощения одна реакционно-способная группа является электрофильной, а другая - нуклеофильной.

Например, электрофильная группа может быть карбонилсодержащей функциональной группой, а нуклеофильная группа может быть амино- или тиольной группой. Способы конъюгации нуклеиновых кислот и родственных олигомерных соединений с участием или без участия линкерных групп подробно

описаны в литературных источниках, таких как, например, работа Manoharan в *Antisense Research and Applications*, Crooke and LeBleu, eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1993, Chapter 17, содержание которой полностью включено в описание в качестве ссылки.

Примеры патентов США, которые описывают получение олигонуклеотидных конъюгатов, включают в качестве неограничивающих примеров патенты США № 4828979, 4948882, 5218105, 5525465, 5541313, 5545730, 5552538, 5578717, 5580731, 55891584, 5109124, 5118802, 5138045, 5414077, 5486603, 5512439, 5578718, 5608046, 4587044, 4605735, 4667025, 4762779, 4789737, 3824941, 4835263, 4876335, 4904582, 4958013, 5082830, 5112963, 5214136, 5149782, 5214136, 245022, 5254469, 5258506, 5262536, 5272250, 5292873, 5317098, 5371241, 5391723, 5416203, 5451463, 5510475, 5512667, 5514785, 5565552, 5567810, 5574142, 5585481, 5587371, 5595726, 5597696, 5599923, 5599928, 5672662, 5688941, 5714166, 6153737, 6172208, 6300319, 6335434, 6335437, 6395437, 6444806, 6484308, 6525031, 6528631, 6559279, содержание каждого из которых включено в описание в качестве ссылки.

Определения

Для удобства ниже приведены значения некоторых терминов и фраз, использованных в описании изобретения, примерах и прилагаемой формуле изобретения. При возникновении очевидного противоречия между использованием термина в других частях настоящего описания изобретения и описанием, приведенным в данном разделе, определение из данного раздела имеет преимущественную силу.

Символы "G", "C", "A" и "U" каждый в общем случае обозначает нуклеотид, содержащий в качестве основания гуанин, цитозин, аденин и урацил соответственно. Однако понятно, что термин "рибонуклеотид" или "нуклеотид" также может относиться к модифицированному нуклеотиду, как подробно описано далее, или к заменяющему его суррогатному остатку. Специалисту в данной области понятно, что гуанин, цитозин, аденин и урацил могут быть заменены другими остатками без существенного изменения свойств спаривания оснований олигонуклеотида, включая и нуклеотид, несущий такой заменяющий остаток. Например, в частности, нуклеотид, включающий инозин в качестве основания, может образовывать пару оснований с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Следовательно, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин, могут быть заменены в нуклеотидной последовательности согласно изобретению на нуклеотид, содержащий, например, инозин. Последовательности, содержащие такие заменяющие остатки, являются воплощениями настоящего изобретения.

При использовании в этом документе "фактор VII" означает мРНК, белок, пептид или полипептид фактора VII. В качестве синонимов термина "фактор VII" специалистам в данной области известны термины A1132620, Cf7, предшественник фактора свертывания крови VII, фактор свертывания крови VII, FVII, акселератор конверсии сывроточного протромбина, коагуляционный белок FVII и эптаког а.

При использовании в этом документе "целевая последовательность" означает непрерывную часть нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образующейся во время транскрипции гена, включая мРНК, являющуюся продуктом РНК-процессинга первичного продукта транскрипции.

При использовании в этом документе термин "цепь, содержащая последовательность" означает олигонуклеотид, содержащий цепочку нуклеотидов, расположенных в соответствии с названной последовательностью, указанной с применением стандартной номенклатуры нуклеотидов.

При использовании в этом документе и если не указано иначе, термин "комплементарный", используемый в контексте пары нуклеотидов, означает классическую Уотсон-Криковскую пару, т.е. GC, AT или AU. Он также распространяется на классическое Уотсон-Криковское спаривание, при котором один или оба нуклеотида были модифицированы, как описано в этом документе, например путем модификации рибозы или модификации фосфатного остова. Он также включает спаривание с инозином или другой молекулой, при котором свойства спаривания оснований существенно не изменяются.

При использовании в этом документе и если не указано иначе, термин "комплементарный", при использовании для описания первой нуклеотидной последовательности относительно второй нуклеотидной последовательности, относится к способности олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, гибридизоваться и образовывать дуплексную структуру в определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, как это понятно специалисту в данной области. Комплементарность может включать полную комплементарность, существенную степень комплементарности и достаточную степень комплементарности для гибридизации в физиологических условиях, например, в физиологически значимых условиях, которые могут иметь место внутри организма. Полная комплементарность означает комплементарность, как описано выше для отдельной пары, всех пар первой и второй последовательности. Когда последовательность "в существенной степени комплементарна" относительно второй последовательности, при использовании в этом документе, две последовательности могут быть полностью комплементарны, или они могут образовывать одну или несколько, но в общем случае не более 4, 3 или 2 пар с нарушением комплементарности оснований при гибридизации, при этом сохраняя способность гибридизоваться в условиях, более соответствующих их основному применению. Существенная степень комплементарности также может быть определена как гибридизация в жестких условиях, при этом жесткие условия могут включать: 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM ЭДТА, 50 или 70°C в течение 12-16 ч с последующими отмытками. Специалист в данной области сможет определить набор условий,

наиболее подходящих для испытания комплементарности двух последовательностей в соответствии с основным применением гибридизуемых нуклеотидов.

Однако, если два олигонуклеотида сконструированы таким образом, чтобы при гибридизации формировались один или несколько одноцепочечных "липких" концов, такие "липкие" концы не должны рассматриваться как пары с нарушением комплементарности при определении комплементарности. Например, двухцепочечная РНК, содержащая один олигонуклеотид длиной 21 нуклеотид и другой олигонуклеотид длиной 23 нуклеотида, при этом более длинный олигонуклеотид содержит последовательность длиной 21 нуклеотид, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, может тем не менее считаться "полностью комплементарной" для целей настоящего изобретения.

"Комплементарные" последовательности, при использовании в этом документе, могут также включать или полностью состоять из не-Уотсон-Криковских пар оснований и/или пар оснований, образованных не природными и модифицированными нуклеотидами, если соблюдаются указанные выше требования в отношении их способности гибридизоваться.

Термины "комплементарный", "полностью комплементарный", "в существенной степени комплементарный" и комплементарность, достаточная для гибридизации в физиологических условиях, например в физиологически значимых условиях, которые могут иметь место внутри организма, могут использоваться в этом документе в отношении спаривания оснований между смысловой цепью и антисмысловой цепью двухцепочечной РНК или между антисмысловой цепью двухцепочечной РНК и целевой последовательностью, как будет ясно из контекста их использования.

При использовании в этом документе полинуклеотид, который "комплементарен", например в существенной степени комплементарен, по меньшей мере части молекулы матричной РНК (мРНК), означает полинуклеотид, который комплементарен, например в существенной степени комплементарен, непрерывной части рассматриваемой мРНК (например, кодирующей фактор VII). Например, полинуклеотид комплементарен по меньшей мере части мРНК фактора VII, если последовательность в существенной степени комплементарна непрерывной части мРНК, кодирующей фактор VII.

Термин "двухцепочечная РНК" или "дцРНК", при использовании в этом документе, означает молекулу рибонуклеиновой кислоты или комплекс молекул рибонуклеиновой кислоты, имеющий дуплексную структуру, включающий две антипараллельные и в существенной степени комплементарные, как описано выше, цепи нуклеиновой кислоты. Две цепи, образующие дуплексную структуру, могут являться разными частями одной более крупной молекулы РНК, или они могут быть отдельными молекулами РНК. В случае, если две цепи являются частями одной более крупной молекулы и по этой причине соединены непрерывной цепочкой нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей второй цепи, образующих дуплексную структуру, соединительная цепочка РНК называется "петлей шпильки". В случае, если две цепи соединены ковалентно иным способом, чем непрерывная цепочка нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей второй цепи, образующих дуплексную структуру, соединительная структура называется "линкером". Цепи РНК могут содержать одинаковое или разное количество нуклеотидов. Максимальное количество пар оснований равно количеству нуклеотидов в самой короткой цепи дцРНК. В дополнение к дуплексной структуре, дцРНК может содержать один или несколько нуклеотидных "липких" концов. дцРНК, при использовании в этом документе, также называется "малой ингибиторной РНК", "siРНК", "siРНК-агентом", "агентом, участвующим в РНК-интерференции" или "агентом, участвующим в РНКi".

При использовании в этом документе "нуклеотидный "липкий" конец" означает неспаренный нуклеотид или нуклеотиды, которые выступают из дуплексной структуры дцРНК, когда 3'-конец одной цепи дцРНК простирается за пределы 5'-конца другой цепи, или наоборот. "Тупой" или "тупой конец" означает, что на конце дцРНК отсутствуют неспаренные нуклеотиды, т.е. отсутствует нуклеотидный "липкий" конец. дцРНК "с тупыми концами" - это дцРНК, которая является двухцепочечной по всей ее длине, т.е. нуклеотидный "липкий" конец отсутствует на обоих концах молекулы.

Термин "антисмысловая цепь" означает цепь дцРНК, которая включает область, в существенной степени комплементарную целевой последовательности. При использовании в этом документе термин "область комплементарности" означает область на антисмысловой цепи, которая в существенной степени комплементарна последовательности, например целевой последовательности, как определено в этом документе. Если область комплементарности не полностью комплементарна целевой последовательности, пары с нарушением комплементарности в наибольшей степени допустимы в концевых областях и, если присутствуют, в общем случае в концевой области или областях, например, в пределах 6, 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов 5'- и/или 3'-конца.

Термин "смысловая цепь", при использовании в этом документе, означает цепь дцРНК, которая включает область, в существенной степени комплементарную области антисмысловой цепи.

Термин "идентичность" означает отношение между двумя или несколькими полинуклеотидными последовательностями, определенное сравнением этих последовательностей. Идентичность также означает степень схожести последовательности между полинуклеотидными последовательностями, определенную путем выравнивания цепочек таких последовательностей. Хотя существует несколько способов измерения идентичности между двумя полинуклеотидными последовательностями, термин хорошо

известен специалистам в данной области (см., например, Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press (1987); и Sequence Analysis Primer, Gribskov., M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991)). "В существенной степени идентичный", при использовании в этом документе, означает, что существует очень высокая степень гомологии (предпочтительно 100% идентичность последовательностей) между смысловой цепью дцРНК и соответствующей частью целевого гена. Однако в изобретении могут применяться дцРНК, имеющие идентичность последовательности более 90 или 95%, и, следовательно, допускаются вариации последовательности, появление которых можно ожидать из-за генетических мутаций, полиморфизма цепей или эволюционной дивергенции. Хотя предпочтительной является идентичность на 100%, дцРНК может содержать случайные одиночные или множественные пары с нарушением комплементарности между РНК и целевым геном.

"Внедрение в клетку", если относится к дцРНК, означает облегчение поглощения или абсорбции клеткой, как понятно специалисту в данной области. Абсорбция или поглощение дцРНК может происходить в ходе процессов пассивной диффузии или активного клеточного транспорта или с помощью дополнительных агентов или приспособлений. Значение этого термина не ограничено клетками в системе *in vitro*; дцРНК также может быть "внедрена в клетку", если клетка является частью живого организма. В таком случае внедрение в клетку будет включать доставку в организм. Например, для доставки *in vivo* дцРНК может быть инъецирована в область ткани или введена системно. Внедрение в клетку *in vitro* включает способы, известные специалистам в данной области, такие как электропорация и липофекция.

Термины "подавлять путем сайленсинга" и "ингибировать экспрессию", если они относятся к гену фактора VII, в этом документе означают по меньшей мере частичное подавление экспрессии гена фактора VII, что выражается в снижении количества мРНК, образующейся с гена фактора VII, которая может быть выделена из первой клетки или группы клеток, в которой транскрибируется ген фактора VII, и которая была обработана таким образом, чтобы экспрессия гена фактора VII была ингибирована, в сравнении со второй клеткой или группой клеток, в существенной степени идентичной первой клетке или группе клеток, но которая не была обработана таким образом (контрольные клетки). Степень ингибирования обычно выражают следующим образом:

$$\frac{(\text{мРНК в контрольных клетках}) - (\text{мРНК в обработанных клетках})}{(\text{мРНК в контрольных клетках})} \rightarrow 100 \%$$

В соответствии с другим вариантом степень ингибирования может быть представлена в исчислении снижения показателя, который функционально связан с транскрипцией гена фактора VII, например, количества белка, кодируемого геном фактора VII и секретируемого клеткой, или количества клеток, демонстрирующих определенный фенотип, например, апоптоз. По существу, сайленсинг гена фактора VII можно определить в любой клетке, экспрессирующей мишень, конститутивно или в результате манипуляций геномной инженерии, и любым соответствующим аналитическим способом. Однако, если необходима справочная информация для определения того, ингибирует ли данная дцРНК экспрессию гена фактора VII в определенной степени, и, следовательно, является дцРНК по настоящему изобретению, в качестве такой справочной информации должен служить способ анализа, приведенный в примерах ниже.

Например, в некоторых случаях экспрессия гена фактора VII подавляется по меньшей мере примерно на 20, 25, 35, 40 или 50% введением двухцепочечного олигонуклеотида согласно изобретению. В одном из вариантов воплощения ген фактора VII подавляется по меньшей мере примерно на 60, 70 или 80% введением двухцепочечного олигонуклеотида согласно изобретению. В более предпочтительном варианте воплощения, ген фактора VII подавляется по меньшей мере примерно на 85, 90 или 95% введением двухцепочечного олигонуклеотида согласно изобретению.

Термины "лечить", "лечение" и им подобные означают избавление от болезни или нарушения или смягчение их течения. В контексте настоящего изобретения, в той мере, пока это относится к любому из других состояний, перечисленных в этом документе ниже (например, опосредованных фактором VII состояний, отличных от тромботического нарушения), термины "лечить", "лечение" и им подобные означают избавление от или смягчение по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с таким состоянием, или замедление или обращение прогрессирования такого состояния.

"Терапевтически значимая" композиция может смягчать течение болезни или нарушения или симптом болезни или нарушения при введении в соответствующей дозировке.

При использовании в этом документе термин "опосредованное фактором VII состояние или заболевание" и родственные ему термины и фразы означают состояние или заболевание, характеризующееся отклоняющейся от нормальной, например выше нормальной, активностью фактора VII. Отклоняющаяся от нормальной функциональная активность фактора VII может быть результатом экспрессии фактора VII в клетках, которые в норме не экспрессируют фактор VII, или повышенной экспрессии фактора VII (ведущей, например, к симптому вирусной геморрагической лихорадки или к образованию тромба). Опосредованное фактором VII состояние или заболевание может быть полностью или частично опосредовано отклоняющейся от нормальной функциональной активностью фактора VII. Однако опосредованное фактором VII состояние или заболевание - это такое состояние или заболевание, при котором модуляция фактора VII приводит к определенному эффекту на лежащее в основе состояние или заболевание (на-

пример, ингибитор фактора VII приводит к определенному улучшению благополучия пациента, по меньшей мере, у некоторых пациентов).

"Геморрагическая лихорадка" включает комбинацию заболеваний, вызванных вирусной инфекцией. Лихорадка и желудочно-кишечные симптомы обычно сопровождаются капиллярным кровотечением.

"Коагулопатия" - это любое нарушение механизма свертывания крови у субъекта.

При использовании в этом документе "тромботическое нарушение" - это любое нарушение, предположительно являющееся результатом нежелательной экспрессии FVII, включая любое нарушение, характеризующееся нежелательной свертываемостью крови.

При использовании в этом документе фразы "терапевтически эффективное количество" и "профилактически эффективное количество" означают количество, обеспечивающее терапевтическую пользу при лечении, профилактике или оказании помощи при вирусной геморрагической лихорадке, или выраженном симптоме такого нарушения, например, кровотечении, лихорадке, слабости, мышечной боли, головной боли, воспалении или циркуляторном шоке. Специфичное количество, являющееся терапевтически эффективным, может легко определить практикующий врач, и оно может варьировать в зависимости от факторов, известных специалистам в данной области, таких как, например, тип тромботического нарушения, история болезни и возраст пациента, стадия заболевания и введение других агентов.

При использовании в этом документе "фармацевтическая композиция" включает фармакологически эффективное количество дцРНК и фармацевтически приемлемый носитель. При использовании в этом документе "фармакологически эффективное количество", "терапевтически эффективное количество" или просто "эффективное количество" означает количество РНК, эффективное для получения требуемого фармакологического, терапевтического или профилактического результата. Например, если данный клинический способ лечения считается эффективным, если имеет место по меньшей мере 25% снижение значения измеряемого параметра, ассоциированного с заболеванием или нарушением, терапевтически эффективное количество лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения - это количество, необходимое для достижения по меньшей мере 25%-ного снижения значения этого параметра.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает носитель для введения терапевтического агента. Такие носители включают в качестве неограничивающих примеров раствор натрия хлорида, буферный раствор натрия хлорида, декстрозу, воду, глицерин, этанол и их комбинации. Из термина специально исключена среда для культуры клеток. Для лекарственных средств, вводимых перорально, фармацевтически приемлемые носители включают в качестве неограничивающих примеров фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как инертные разбавители, способствующие распадаемости агенты, связывающие агенты, смазывающие агенты, агенты-подсластители, вкусовые агенты, красящие агенты и консерванты. Пригодные инертные разбавители включают натрия и кальция карбонат, натрия и кальция фосфат и лактозу, в то время как кукурузный крахмал и альгиновая кислота являются пригодными агентами, способствующими распадаемости. Связывающие агенты могут включать крахмал и желатин, а смазывающие агенты, если присутствуют, в основном будут представлены магнезия стеаратом, стеариновой кислотой или тальком. Если необходимо, таблетки могут быть покрыты оболочкой из таких материалов как глицерил моностеарат или глицерил дистеарат, чтобы отсрочить всасывание в желудочно-кишечном тракте.

При использовании в этом документе "трансформированная клетка" - это клетка, в которую был внедрен вектор, с которого может экспрессироваться молекула дцРНК.

Характеристика липидо-нуклеиновых частиц.

В некоторых воплощениях изобретение относится к способам и композициям для получения частиц, инкапсулированных в липиды нуклеиновых кислот, в которых нуклеиновые кислоты инкапсулированы внутри липидного слоя. Такие липидо-нуклеиновые частицы, содержащие олигонуклеотиды siРНК, охарактеризовывают с применением различных биофизических параметров, включая (1) соотношение лекарственного средства и липида; (2) эффективность инкапсулирования и (3) размер частицы. Высокие значения соотношения лекарственного средства и липида, высокая эффективность инкапсулирования, хорошая устойчивость к нуклеазам и стабильность в сыворотке и контролируемый размер частицы, в общем случае менее 200 нм в диаметре, являются желательными характеристиками. Кроме того, важна природа полимера нуклеиновой кислоты, так как модификация нуклеиновых кислот с целью придать устойчивость к нуклеазам, увеличивает стоимость лечения, при этом во многих случаях обеспечивая лишь ограниченную устойчивость. Если не указано иначе, эти критерии вычисляются в настоящем описании изобретения следующим образом.

Соотношение нуклеиновой кислоты и липида равно количеству нуклеиновой кислоты в определенном объеме получения, деленному на количество липида в том же объеме. Показатель можно выражать как соотношение молей на моль, массы на массу или массы на моль. Для окончательной, готовой для введения композиции соотношение нуклеиновая кислота:липид вычисляют после того как с применением диализа, хроматографии и/или переваривания ферментами (например, нуклеазами) было удалено максимально возможное количество не инкапсулированной нуклеиновой кислоты.

Эффективность инкапсулирования равна соотношению лекарственного средства и липида в началь-

ной смеси, деленному на соотношение лекарственного средства и липида в окончательной, пригодной для введения композиции. Это является мерой относительной эффективности. Для измерения абсолютной эффективности необходимо вычислить суммарное количество от нуклеиновой кислоты, добавленной в начальную смесь, которое окажется в пригодной для введения композиции. Также может быть вычислено количество липида, потерянное во время процесса получения композиции. Эффективность является мерой потери и стоимости композиции.

Размер указывает размер (диаметр) образующихся частиц. Распределение размеров можно определить с применением квазиупругого рассеивания света (QELS) на субмикронном анализаторе размера частиц Nicomp, модель 370. Частицы размером менее 200 нм являются предпочтительными для распределения в неоваскуляризованных (с повышенной проницаемостью) тканях, таких как неоплазмы и области воспаления.

Способы получения липидных частиц.

В способах и композициях согласно изобретению применяют определенные катионные липиды, синтез, получение и характеристика которых описаны ниже и в сопутствующих примерах. Кроме того, настоящее изобретение направлено на создание способов получения липидных частиц, включая таковые, ассоциированные с терапевтическим агентом, например с нуклеиновой кислотой. В способах, описанных в этом документе, смесь липидов объединяют с буферизированным водным раствором нуклеиновой кислоты для получения промежуточной смеси, содержащей нуклеиновую кислоту, инкапсулированную в липидных частицах, при этом инкапсулированные нуклеиновые кислоты присутствуют в соотношении нуклеиновая кислота/липид, равном примерно от 3 до примерно 25 мас.%, предпочтительно от 5 до 15 мас.%. Промежуточную смесь необязательно можно подвергнуть разделению по размерам частиц для получения частиц инкапсулированной в липиды нуклеиновой кислоты, где липидные части являются однослойными везикулами, предпочтительно имеющими диаметр от 30 до 150 нм, более предпочтительно примерно от 40 до 90 нм. После этого повышают значение pH, чтобы нейтрализовать по меньшей мере часть поверхностных зарядов на липидо-нуклеиновых частицах, обеспечив тем самым, чтобы композиция нуклеиновой кислоты, инкапсулированной в липиды, содержала по меньшей мере частично нейтральные поверхности.

Как описано выше, некоторые из этих катионных липидов являются аминолипидами, которые несут заряды при значениях pH ниже значения pKa аминокислотной группы, и в существенной степени нейтральны при значениях pH выше значения pKa. Такие катионные липиды называют титруемыми катионными липидами, и они могут применяться в композициях согласно изобретению с помощью двухэтапного способа. На первом этапе липидные везикулы формируются при пониженных значениях pH из титруемых катионных липидов и других компонентов везикул в присутствии нуклеиновых кислот. Таким образом, везикулы инкапсулируют и удерживают нуклеиновые кислоты. На втором этапе поверхностный заряд новообразованных везикул можно нейтрализовать повышением значения pH среды до уровня выше значения pKa присутствующих титруемых катионных липидов, т.е. до физиологического значения pH или выше. В частности, выгодные особенности этого способа включают как легкое удаление любой адсорбированной на поверхности нуклеиновой кислоты, так и получение в результате для доставки нуклеиновой кислоты везикулы, которая имеет нейтральную поверхность. Полагают, что липосомы или липидные частицы, имеющие нейтральную поверхность, избегают быстрого клиренса из кровеносной системы и не будут иметь определенных токсических свойств, которые ассоциированы с препаратами катионных липосом. Дополнительное подробное описание этих применений подобных титруемых катионных липидов в композиции липидо-нуклеиновых частиц приведены в патентах США № 6287591 и 6858225, включенных в этот документ в качестве ссылки.

Дополнительно отмечается, что везикулы, образованные таким способом, обеспечивают композиции с везикулами однородного размера с высоким содержанием нуклеиновых кислот. Дополнительно, везикулы имеют диапазон размеров от примерно 30 до примерно 150 нм, более предпочтительно от примерно 30 до примерно 90 нм.

Не следуя какой-то определенной теории, полагают, что очень высокая эффективность инкапсуляции нуклеиновой кислоты является результатом электростатического взаимодействия при низких значениях pH. При кислых значениях pH (например, pH 4,0) поверхность везикулы заряжена и связывает часть нуклеиновых кислот посредством электростатических взаимодействий. Когда внешний кислотный буферный раствор заменяют на более нейтральный буферный раствор (например, с pH 7,5), поверхность липидной частицы или липосомы нейтрализуется, позволяя удалять любую внешнюю нуклеиновую кислоту. Более подробная информация о способе получения рецептур представлена в различных публикациях (например, в патентах США № 6287591 и 6858225).

С учетом вышесказанного настоящее изобретение направлено на создание способов получения липидо-нуклеиновых композиций. В способах, описанных в этом документе, смесь липидов объединяют с буферизированным водным раствором нуклеиновой кислоты для получения промежуточной смеси, содержащей нуклеиновую кислоту, инкапсулированную в липидных частицах, например, где инкапсулированные нуклеиновые кислоты присутствуют в соотношении нуклеиновая кислота/липид, равном примерно от 10 до примерно 20 мас.%. Промежуточную смесь необязательно можно подвергнуть разделе-

нию по размерам частиц для получения частиц инкапсулированной в липиды нуклеиновой кислоты, где липидные части являются однослойными везикулами, предпочтительно имеющими диаметр от 30 до 150 нм, более предпочтительно примерно от 40 до 90 нм. После этого повышают значение pH, чтобы нейтрализовать по меньшей мере часть поверхностных зарядов на липидо-нуклеиновых частицах, обеспечив тем самым, чтобы композиция нуклеиновой кислоты, инкапсулированной в липиды, содержала по меньшей мере частично нейтральные поверхности.

В некоторых воплощениях смесь липидов содержит по меньшей мере два липидных компонента: первый аминоллипидный компонент по настоящему изобретению, который выбран из липидов, имеющих такую pK_a , что липид является катионным при значениях pH ниже pK_a и нейтральным при значениях pH выше pK_a , и второй липидный компонент, который выбран из липидов, предотвращающих агрегацию частиц во время формирования липидо-нуклеиновых частиц. В некоторых вариантах воплощения аминоллипид является новым катионным липидом по настоящему изобретению.

При получении липидо-нуклеиновых частиц согласно изобретению смесь липидов в типичном случае является раствором липидов в органическом растворителе. Эта смесь липидов в последующем может быть высушена с образованием тонкой пленки или лиофилизована с образованием порошка перед гидратацией водным буферным раствором для образования липосом. В соответствии с другим вариантом в предпочтительном способе липидная смесь может быть солюбилизована в смешивающемся с водой спирте, таком как этанол, и этот раствор в этаноле добавляют к водному буферному раствору, что приводит к спонтанному образованию липосом. В большинстве вариантов воплощения спирт применяют в том виде, в котором он доступен для приобретения. Например, этанол может применяться в виде абсолютного этанола (100%), или в виде 95% этанола, при этом оставшаяся часть является водой. Этот способ описан более подробно в патенте США № 5976567.

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения смесь липидов является смесью катионных липидов, нейтральных липидов (отличных от катионного липида), стерина (например, холестерина) и ПЭГ-модифицированного липида (например, ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-сDMA) в спиртовом растворителе. В предпочтительных воплощениях липидная смесь в существенной степени состоит из катионного липида, нейтрального липида, холестерина и ПЭГ-модифицированного липида в спирте, более предпочтительно в этаноле. В дополнительных предпочтительных воплощениях первый раствор состоит из вышеуказанной липидной смеси с молярными соотношениями примерно 20-70% катионного липида:5-45% нейтрального липида:20-55% холестерина:0,5-15% ПЭГ-модифицированного липида. В еще более предпочтительных вариантах воплощения первый раствор в существенной степени состоит из липида, выбранного из табл. 1, ДСФХ, холестерина и ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-сDMA, более предпочтительно в молярном соотношении примерно 20-60% катионного липида:5-25% ДСФХ:25-55% холестерина:0,5-15% ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-сDMA. В некоторых вариантах воплощения молярное соотношение липидов составляет примерно 50/10/38,5/1,5 (мол.% катионного липида/ДСФХ/холестерина/ПЭГ-ДМГ, ПЭГ-ДСГ или ПЭГ-ДПГ), 57,2/7,1/34,3/1,4 (мол.% катионного липида/ДПФХ/холестерина/ПЭГ-сDMA), 40/15/40/5 (мол.% катионного липида/ДСФХ/холестерина/ПЭГ-ДМГ), 50/10/35/4,5/0,5 (мол.% катионного липида/ДСФХ/холестерина/ПЭГ-ДСГ или GalNAc3-ПЭГ-ДСГ), 50/10/35/5 (катионного липида/ДСФХ/холестерина/ПЭГ-ДМГ), 40/10/40/10 (мол.% катионного липида/ДСФХ/холестерина/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-сDMA), 35/15/40/10 (мол.% катионного липида/ДСФХ/холестерина/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-сDMA) или 52/13/30/5 (мол.% катионного липида/ДСФХ/холестерина/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-сDMA). В другой группе предпочтительных вариантов воплощения нейтральный липид в этих композициях заменен на ПОФХ, ДПФХ, ДОФЭ или СМ.

В соответствии с изобретением липидную смесь смешивают с буферизированным водным раствором, который может содержать нуклеиновые кислоты. Буферизированный водный раствор в типичном случае является раствором, в котором буфер имеет значение pH ниже значения pK_a способного к протонированию липида в составе липидной смеси. Примеры пригодных буферных растворов включают цитратный, фосфатный, ацетатный и MES-буферы. Особенно предпочтительным буферным раствором является цитратный буфер. Предпочтительные буферные растворы будут иметь концентрацию в диапазоне 1-1000 мМ по аниону, в зависимости от химических свойств нуклеиновой кислоты, которую инкапсулируют, и оптимизация концентрации буфера может являться существенным этапом для достижения высоких уровней нагрузки (см., например, патенты США № 6287591 и 6858225).

В соответствии с другим вариантом может быть полезна чистая вода, подкисленная до pH 5-6 хлоридом, сульфатом или им подобным соединением. В этом случае может быть применимо добавление 5% глюкозы или другого неионного растворенного вещества, которое сбалансирует осмотический потенциал на мембране частиц при проведении диализа частиц для удаления этанола, повышения pH или при смешивании с фармацевтически приемлемым носителем, таким как изотонический раствор натрия хлорида. Количество нуклеиновой кислоты в буферном растворе может варьировать, но в типичном случае будет составлять от примерно 0,01 до примерно 200 мг/мл, более предпочтительно от примерно 0,5 до примерно 50 мг/мл.

Смесь липидов и буферизированный водный раствор терапевтических нуклеиновых кислот объединяют для получения промежуточной смеси. Промежуточная смесь в типичном случае является смесью

липидных частиц, несущих инкапсулированные нуклеиновые кислоты.

Дополнительно, промежуточная смесь может также содержать некоторую часть нуклеиновых кислот, которые присоединены к поверхности липидных частиц (липосом или липидных везикул) благодаря ионному взаимодействию отрицательно заряженных нуклеиновых кислот и положительно заряженных липидов на поверхности липидной частицы (аминолипиды или другие липиды, составляющие способный к протонированию первый липидный компонент, положительно заряжены в буферном растворе, имеющем значение pH ниже, чем значение pKa протонируемой группы липида). В одной группе предпочтительных вариантов воплощения смесь липидов является спиртовым раствором липидов, и объемы каждого из растворов скорректированы таким образом, чтобы при объединении конечное содержание спирта составляло от примерно 20 до примерно 45% по объему. Способ объединения смесей может включать любое разнообразие способов, часто в зависимости от масштаба получения композиции. Например, если суммарный объем равен примерно 10-20 мл или менее, растворы можно объединить в пробирке и смешать с применением вихревой мешалки. Крупномасштабное смешивание можно проводить в пригодной стеклянной посуде для промышленного производства.

Необязательно, комплексы инкапсулированного липидами терапевтического агента (например, нуклеиновой кислоты), которые получены смешиванием липидной смеси и буферизованного водного раствора терапевтического агента (нуклеиновых кислот), могут быть отсортированы по размеру для достижения требуемого диапазона размеров и относительно узкого распределения размеров липидных частиц. Дополнительно, композиции, описанные в этом документе, будут отсортированы по размеру частиц со средним диаметром от примерно 70 до примерно 200 нм, более предпочтительно от примерно 90 до примерно 130 нм. Доступно несколько способов сортировки липосом по размеру для получения требуемого размера. Один способ сортировки по размеру описан в патенте США № 4737323, включенном в этот документ в качестве ссылки. Обработка липосомной суспензии ультразвуком, либо в бане, либо с помощью зонда, приводит к прогрессивному уменьшению размеров вплоть до маленьких однослойных везикул (SUV) размером менее чем примерно 0,05 мкм. Гомогенизация является еще одним способом, основанным на применении энергии сдвигового деформирования для фрагментации крупных липосом с образованием малых. При типичном способе гомогенизации, многослойные везикулы рециркулируют через стандартный гомогенизатор для эмульсий до достижения выбранных размеров липосом, в типичном случае от примерно 0,1 до 0,5 мкм. При обоих способах распределение размера частиц можно контролировать стандартным определением размера частиц с помощью лазерного луча. Для некоторых способов в этом документе применяется экструзия для получения однородных по размеру везикул.

Экструзия липосомных композиций через мелкопористую поликарбонатную мембрану или асимметрическую керамическую мембрану приводит к относительно четко определенному распределению по размерам. В типичном случае суспензия циркулирует через мембрану один или несколько раз, до достижения требуемого распределения липосомных комплексов по размеру. Липосомы могут быть экструдированы через последовательные мембраны с уменьшающимся размером пор для достижения постепенного уменьшения размера липосом. В некоторых случаях формирующиеся липидо-нуклеиновые композиции могут быть применены без разделения по размеру.

В некоторых вариантах воплощения способы по настоящему изобретению дополнительно включают этап нейтрализации, по меньшей мере, некоторых поверхностных зарядов на липидной части липидо-нуклеиновых композиций. Нейтрализуя, по меньшей мере частично, поверхностные заряды, достигается высвобождение не инкапсулированной нуклеиновой кислоты с поверхности липидной частицы, и она может быть удалена из композиции с применением стандартных способов. Предпочтительно не инкапсулированные и абсорбированные на поверхности нуклеиновые кислоты удаляют из конечной композиции путем замены буферных растворов. Например, замена цитратного буфера (значение pH примерно 4,0, применяется при формировании композиции) на HEPES-буферизованный раствор натрия хлорида (HBS, значение pH примерно 7,5) приводит к нейтрализации поверхности липосом и высвобождению нуклеиновой кислоты с поверхности. Высвобожденная нуклеиновая кислота после этого может быть удалена хроматографией с применением стандартных методов, с последующим переходом на буфер со значением pH выше значения pKa используемого липида.

Необязательно, липидные везикулы (т.е. липидные частицы) могут быть сформированы гидратацией в водном буферном растворе и отсортированы по размеру с применением способов, описанных выше, перед добавлением нуклеиновой кислоты. Как описано выше, водный буферный раствор должен иметь значение pH ниже значения pKa аминокислоты. Раствор нуклеиновых кислот может добавляться к этим отсортированным по размеру, предварительно сформированным везикулам. Для того чтобы произошло инкапсулирование нуклеиновых кислот в эти "предварительно сформированные" везикулы, смесь должна содержать спирт, такой как этанол. В случае этанола он должен присутствовать в концентрации от примерно 20 до примерно 45 мас./об.%. Кроме того, может быть необходимо подогреть смесь предварительно сформированных везикул и нуклеиновой кислоты в смеси водного буферного раствора и этанола до температуры от примерно 25 до примерно 50°C, в зависимости от композиции липидных везикул и природы нуклеиновой кислоты. Специалисту в данной области будет понятно, что оптимизация способа инкапсулирования для достижения требуемого уровня содержания нуклеиновой кислоты в липидных

везикулах потребует изменения таких переменных как концентрация этанола и температура. Примеры пригодных условий для инкапсуляции нуклеиновой кислоты представлены в разделе "Примеры". После того как нуклеиновые кислоты инкапсулированы внутри предварительно сформированных везикул, значение внешнего pH можно повысить, чтобы нейтрализовать, по меньшей мере частично, поверхностный заряд. После этого не инкапсулированные и абсорбированные на поверхности нуклеиновые кислоты можно удалить, как описано выше.

Способ применения.

Липидные частицы согласно изобретению могут применяться для доставки терапевтического агента в клетку, *in vitro* или *in vivo*. В некоторых вариантах воплощения терапевтический агент является нуклеиновой кислотой, которая доставляется в клетку с применением липидо-нуклеиновых частиц согласно изобретению. Хотя следующее описание различных способов применения липидных частиц и родственных фармацевтических композиций согласно изобретению использует в качестве примеров описание, относящееся к липидо-нуклеиновым частицам, при этом понимается, что эти способы и композиции могут быть легко адаптированы для доставки любого терапевтического агента для лечения любого заболевания или нарушения, при котором такое лечение будет полезно.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение направлено на создание способов внедрения нуклеиновой кислоты в клетку. Предпочтительными нуклеиновыми кислотами для внедрения в клетки являются siРНК, иммуностимулирующие олигонуклеотиды, плазмиды, антисмысловые олигонуклеотиды и рибозимы. Эти способы могут осуществляться путем контакта частиц или композиций согласно изобретению с клетками в течение периода времени, достаточного для прохождения внутриклеточной доставки.

Композиции согласно изобретению могут адсорбироваться практически любым типом клеток, например, линиями опухолевых клеток, включая в качестве неограничивающих примеров клеточные линии HeLa, HCT116, A375, MCF7, B16F10, Hep3b, HUH7, HepG2, Skov3, U87 и PC3. После адсорбции липидо-нуклеиновые частицы могут либо поглощаться путем эндоцитоза частью клеток, либо обмениваться липидами с клеточными мембранами, либо сливаться с клетками. Перенос или внедрение части комплекса, представленной нуклеиновой кислотой, может происходить по любому из этих путей. Не ограничиваясь только объемом настоящего изобретения, полагают, что в случае попадания частиц в клетку путем эндоцитоза, частицы после этого взаимодействуют с эндосомальной мембраной, что приводит к дестабилизации эндосомальной мембраны, возможно, через формирование не-бислоиных фаз, что в результате приводит к внедрению инкапсулированной нуклеиновой кислоты в цитоплазму клетки. Схожим образом, в случае прямого слияния частиц с плазматической мембраной клетки, если такое слияние имеет место, мембрана липосомы интегрируется в клеточную мембрану, и содержимое липосомы смешивается с внутриклеточной жидкостью. Контакт между клетками и липидо-нуклеиновыми композициями, если он происходит *in vitro*, будет иметь место в биологически совместимой среде. Концентрация композиций может широко варьировать, в зависимости от конкретного применения, но в общем случае составляет от примерно 1 мкМ до примерно 10 мМ. В некоторых воплощениях обработка клеток липидо-нуклеиновыми композициями в общем случае будет проводиться при физиологических значениях температуры (примерно 37°C) в течение периода времени от примерно 1 до 24 ч, предпочтительно от примерно 2 до 8 ч. В случае применения *in vitro* доставка нуклеиновых кислот может осуществляться в любую клетку, выращиваемую в культуре, как растительного, так и животного происхождения, клетку позвоночного или беспозвоночного, из любой ткани и любого типа. В предпочтительных воплощениях клетки будут являться клетками животного, более предпочтительно клетками млекопитающего и наиболее предпочтительно клетками человека.

В одной группе вариантов воплощения суспензию липидо-нуклеиновых частиц добавляют к культивируемым на чашках клеткам с конfluence 60-80%, имеющим плотность клеток от примерно 10^3 до примерно 10^5 клеток/мл, более предпочтительно примерно 2×10^4 клеток/мл. Концентрация суспензии, добавляемой к клеткам, предпочтительно составляет от примерно 0,01 до 20 мкг/мл, более предпочтительно примерно 1 мкг/мл.

Типичные примеры применения включают применение хорошо известных способов обеспечения внутриклеточной доставки siРНК для нокаута или сайленсинга специфичных клеточных мишеней. В соответствии с другим вариантом применения включают доставку последовательностей ДНК или мРНК, кодирующих терапевтически полезные полипептиды. В этом случае обеспечивается терапия генетических заболеваний путем поставки дефицитных или отсутствующих продуктов генов (т.е. для дистрофии Дюшенна, см. Kunkel, et al., Brit. Med. Bull., 45(3):630-643 (1989), и для муковисцидоза, см. Goodfellow, Nature, 341:102-103 (1989)). Другие применения композиций согласно изобретению включают внедрение антисмысловых олигонуклеотидов в клетки (см. Bennett, et al., Mol. Pharm. 41:1023-1033, 1992).

В соответствии с другим вариантом композиции согласно изобретению могут также применяться для доставки нуклеиновых кислот в клетки *in vivo*, с применением способов, известных специалисту в данной области. Что касается применения настоящего изобретения для доставки последовательностей ДНК или мРНК, работа Zhu, et al., Science, 261:209-211 (1993), включенная в этот документ в качестве ссылки, описывает внутривенную доставку экспрессирующей плазмиды, несущей вставку цитомегало-

вирусный промотор (CMV) - ген хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT), с применением комплексов DOTMA-ДОФЭ. В работе Hyde, et al., Nature, 362:250-256 (1993), включенной в этот документ в качестве ссылки, описывается доставка гена трансмембранного регуляторного белка муковисцидоза (CFTR) в эпителий дыхательных путей и в альвеолы в легких мыши с применением липосом. В работе Brigham, et al., Am. J. Med. Sci. 298:278-281 (1989), включенной в этот документ в качестве ссылки, описывается трансфекция *in vivo* клеток легких мыши функционально активным прокариотическим геном, кодирующим внутриклеточный фермент, хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT). Таким образом, композиции согласно изобретению могут применяться для лечения инфекционных заболеваний.

Таким образом, другой особенностью композиций согласно изобретению является то, что они могут применяться для сайленсинга или модуляции целевого гена, неограничивающимися примерами которого являются FVII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, ген PDGF β , ген Erb-B, ген Src, ген CRK, ген GRB2, ген RAS, ген MEKK, ген JNK, ген RAF, ген Erk1/2, ген PCNA(p21), ген MYB, ген JUN, ген FOS, ген BCL-2, ген циклина D, ген VEGF, ген EGFR, ген циклина A, ген циклина E, ген WNT-1, ген β -катенина, ген c-MET, ген PKC, ген NFkB, ген STAT3, ген сурвивина, ген Her2/Neu, ген топоизомеразы I, ген топоизомеразы II a, ген p73, ген p21(WAF1/CIP1), ген p27(KIP1), ген PPM1D, ген RAS, ген кавеолина I, ген MIB I, ген MTAI, ген M68, гены опухолевых супрессоров, ген опухолевого супрессора APC1, ген опухолевого супрессора BRCA1, ген опухолевого супрессора PTEN, химерный ген mLL, химерный ген BCR/ABL, химерный ген TEL/AML1, химерный ген EWS/FLI1, химерный ген TLS/FUS1, химерный ген PAX3/FKHR, химерный ген AML1/ETO, ген α v-интегрин, ген рецептора Flt-1, ген тубулина, ген папилломавируса человека, ген, необходимый для репликации папилломавируса человека, ген вируса иммунодефицита человека, ген, необходимый для репликации вируса иммунодефицита человека, ген вируса гепатита A, ген, необходимый для репликации вируса гепатита A, ген вируса гепатита B, ген, необходимый для репликации вируса гепатита B, ген вируса гепатита C, ген, необходимый для репликации вируса гепатита C, ген вируса гепатита D, ген, необходимый для репликации вируса гепатита D, ген вируса гепатита E, ген, необходимый для репликации вируса гепатита E, ген вируса гепатита F, ген, необходимый для репликации вируса гепатита F, ген вируса гепатита G, ген, необходимый для репликации вируса гепатита G, ген вируса гепатита H, ген, необходимый для репликации вируса гепатита H, ген респираторно-синцитиального вируса, ген, необходимый для репликации респираторно-синцитиального вируса, ген вируса простого герпеса, ген, необходимый для репликации вируса простого герпеса, ген цитомегаловируса герпеса, ген, необходимый для репликации цитомегаловируса герпеса, ген вируса герпеса Эпштейна-Барр, ген, необходимый для репликации вируса герпеса Эпштейна-Барр, ген вируса герпеса, ассоциированного к саркомой Капоши, ген, необходимый для репликации вируса герпеса, ассоциированного к саркомой Капоши, ген вируса JC, ген человека, необходимый для репликации вируса JC, ген миксовируса, ген, необходимый для репликации гена миксовируса, ген риновируса, ген, необходимый для репликации риновируса, ген коронавируса, ген, необходимый для репликации коронавируса, ген вируса Западного Нила, ген, необходимый для репликации вируса Западного Нила, ген вируса энцефалита Сент-Луис, ген, необходимый для репликации вируса энцефалита Сент-Луис, ген вируса клещевого энцефалита, ген, необходимый для репликации вируса клещевого энцефалита, ген вируса энцефалита долины Муррея, ген, необходимый для репликации вируса энцефалита долины Муррея, ген вируса денге, ген, необходимый для репликации гена вируса денге, ген вакуолизирующего обезьяньего вируса 40, ген, необходимый для репликации вакуолизирующего обезьяньего вируса 40, ген лимфотропного Т-клеточного вируса человека, ген, необходимый для репликации лимфотропного Т-клеточного вируса человека, ген вируса мышинного лейкоза Молони, ген, необходимый для репликации вируса мышинного лейкоза Молони, ген вируса энцефаломиокардита, ген, необходимый для репликации вируса энцефаломиокардита, ген вируса кори, ген, необходимый для репликации вируса кори, ген вируса ветряной оспы, ген, необходимый для репликации вируса ветряной оспы, ген аденовируса, ген, необходимый для репликации аденовируса, ген вируса желтой лихорадки, ген, необходимый для репликации вируса желтой лихорадки, ген полиовируса, ген, необходимый для репликации полиовируса, ген поксвируса, ген, необходимый для репликации поксвируса, ген Plasmodium, ген, необходимый для репликации Plasmodium, ген *Mycobacterium ulcerans*, ген, необходимый для репликации *Mycobacterium ulcerans*, ген *Mycobacterium tuberculosis*, ген, необходимый для репликации *Mycobacterium tuberculosis*, ген *Mycobacterium leprae*, ген, необходимый для репликации *Mycobacterium leprae*, ген *Staphylococcus aureus*, ген, необходимый для репликации *Staphylococcus aureus*, ген *Streptococcus pneumoniae*, ген, необходимый для репликации *Streptococcus pneumoniae*, ген *Streptococcus pyogenes*, ген, необходимый для репликации *Streptococcus pyogenes*, ген *Chlamydia pneumoniae*, ген, необходимый для репликации *Chlamydia pneumoniae*, ген *Mycoplasma pneumoniae*, ген, необходимый для репликации *Mycoplasma pneumoniae*, ген интегрин, ген селектина, ген системы комплемента, ген хемокина, ген хемокинового рецептора, ген GCSF, ген Gro1, ген Gro2, ген Gro3, ген PF4, ген MIG, ген про-тромбоцитарного основного белка, ген MIP-1I, ген MIP-1J, ген RANTES, ген MCP-1, ген MCP-2, ген MCP-3, ген SMBKR1, ген SMBKR2, ген SMBKR3, SMBKR5v, ген AIF-1, ген 1-309, ген компонента ионного канала,

ген рецептора нейротрансмиттера, ген нейротрансмиттерного лиганда, ген амилоидного семейства, ген пресенилина, ген HD, ген DRPLA, ген SCA1, ген SCA2, ген MJD1, ген CACNL1A4, ген SCA7, ген SCA8, аллельный ген, обнаруженный в клетках ЛОН или один аллельный ген из семейства полиморфных генов.

В случае ведения *in vivo*, фармацевтические композиции вводят парентерально, т.е. внутрисуставно, внутривенно, интраперитонеально, подкожно или внутримышечно. В некоторых вариантах воплощения фармацевтические композиции вводят внутривенно или интраперитонеально с помощью инъекции ударной дозы вещества. Один из примеров см. в Stadler, et al., патент США № 5286634, содержание которого включено в описание в качестве ссылки. Внутриклеточная доставка нуклеиновых кислот также обсуждалась в Straubinger, et al., *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York. 101:512-527 (1983); Mannino, et al., *Biotechniques*, 6:682-690 (1988); Nicolau, et al., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 6:239-271 (1989) и Behr, *Acc. Chem. Res.* 26:274-278 (1993). Дополнительные способы введения терапевтических средств на основе липидов описаны, например, в Rahman et al., патент США № 3993754; Sears, патент США № 4145410; Parahadjopoulos et al., патент США № 4235871; Schneider, патент США № 4224179; Lenk et al., патент США № 4522 803 и Fountain et al., патент США № 4588 578.

При других способах фармацевтические препараты могут приходить в контакт с целевой тканью путем прямого приложения препарата к ткани. Приложение может производиться с применением местного, "открытого" или "закрытого" способа. Под "местным" подразумевается прямое приложение фармацевтического препарата к ткани, экспонированной в окружающую среду, такой как кожа, глотка, наружный слуховой проход и т.п.

"Открытые" способы - это способы, которые включают рассечение кожи пациента и прямого зрительного наблюдения подлежащей ткани, к которой будут приложены фармацевтические препараты. Обычно это достигается хирургическими процедурами, такими как торакотомия для доступа к легким, абдоминальная лапаротомия для доступа к внутренним органам брюшной полости или другим прямым хирургическим способом доступа к целевой ткани.

"Закрытые" способы - это инвазивные способы, при которых внутренние целевые ткани не наблюдаются непосредственно визуально, но доступ к ним достигается посредством проникновения инструментов через небольшие ранки в коже. Например, препараты можно вводить в брюшину путем лаважа с применением иглы. Схожим образом, фармацевтические препараты можно вводить в мягкие мозговые оболочки или в спинной мозг инфузией во время люмбальной пункции, после которой пациента располагают в соответствующей позе, как стандартно практикуется при проведении спинальной анестезии или обследовании спинного мозга с использованием метразамида. В соответствии с другим вариантом, препараты можно вводить через эндоскопические изделия.

Липидо-нуклеиновые композиции также можно вводить в составе аэрозоля, вдыхаемого в легкие (см. Brigham, et al., *Am. J. Sci.* 298(4):278-281 (1989)), или прямой инъекцией в область развития заболевания (Culver, *Human Gene Therapy*, Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, New York, p. 70-71 (1994)).

Способы согласно изобретению могут осуществляться в отношении различных организмов-хозяев. Предпочтительные организмы-хозяева включают виды млекопитающих, такие как человек, все приматы, кроме человека, собаки, кошки, крупный рогатый скот, лошади, овцы и т.п.

Дозировки частиц согласно изобретению, содержащих липид и терапевтический агент, будут зависеть от соотношения терапевтического агента и липида и мнения производящего введение врача, основанного на возрасте, массе тела и состоянии пациента.

В одном из вариантов воплощения, настоящее изобретение направлено на создание способа модуляции экспрессии целевого полинуклеотида или полипептида. Эти способы в общем случае включают контакт клетки с липидной частицей согласно изобретению, которая ассоциирована с нуклеиновой кислотой, способной модулировать экспрессию целевого полинуклеотида или полипептида. При использовании в этом документе термин "модуляция" означает изменение экспрессии целевого полинуклеотида или полипептида. В различных вариантах воплощения модуляция может означать повышение или увеличение или может означать снижение или уменьшение. Способы измерения уровня экспрессии целевого полинуклеотида или полипептида известны и доступны специалистам в данной области и включают, например, способы с применением обратной транскрипции - полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) и иммуногистохимические методики. В некоторых вариантах воплощения уровень экспрессии целевого полинуклеотида или полипептида повышается или понижается по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50 или более чем 50% по сравнению с соответствующим контрольным значением.

Например, если требуется повышенная экспрессия полипептида, нуклеиновая кислота может находиться в экспрессионном векторе, который содержит полинуклеотид, кодирующий требуемый полипептид. С другой стороны, если требуется пониженная экспрессия полинуклеотида или полипептида, то нуклеиновая кислота может являться, например, антисмысловым олигонуклеотидом, siРНК или микроРНК, включающей полинуклеотидную последовательность, которая специфично гибридизуется с полинуклеотидом, кодирующим целевой полипептид, тем самым нарушая экспрессию целевого полинуклеотида или полипептида. В соответствии с другим вариантом нуклеиновая кислота может являться плазмидой, экспрессирующей такой антисмысловый олигонуклеотид, siРНК или микроРНК.

В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение направлено на создание способа модуляции экспрессии полипептида клеткой, включающего доставку в клетку липидной частицы, которая состоит или в существенной степени состоит из катионного липида формулы I, нейтрального липида, стерина, ПЭГ или ПЭГ-модифицированного липида, например, в молярном соотношении примерно 20-65% катионного липида формулы I, 3-25% нейтрального липида, 15-55% стерина и 0,5-15% ПЭГ или ПЭГ-модифицированного липида, при этом липидная частица ассоциирована с нуклеиновой кислотой, способной модулировать экспрессию полипептида. В некоторых вариантах воплощения молярное соотношение липидов составляет примерно 60/7,5/31/1,5, 57,5/7,5/31,5/3,5, 57,2/7,1/34,3/1,4, 52/13/30/5, 50/10/38,5/1,5, 50/10/35/5, 40/10/40/10, 40/15/40/5 или 35/15/40/10 (мол.% катионного липида формулы I/ДСФХ или ДПФХ/холестерина/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-сDMA). В некоторых вариантах воплощения липидная частица также включает остаток направленного действия, такой как нацеливающий липид, описанный в этом документе (например, липидная частица в существенной мере состоит из катионного липида формулы I, нейтрального липида, стерина, ПЭГ или ПЭГ-модифицированного липида и нацеливающего остатка). В другой группе вариантов воплощения нейтральный липид в этих композициях заменен на ДПФХ, ПОФХ, ДОФЭ или СМ. В другой группе вариантов воплощения ПЭГ или ПЭГ-модифицированный липид заменен на ПЭГ-ДСГ, ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-ДПГ.

В некоторых вариантах воплощения терапевтический агент выбран из siРНК, микроРНК, антисмыслового олигонуклеотида, плазмиды, способной экспрессировать siРНК, микроРНК или антисмысловой олигонуклеотид, и при этом siРНК, микроРНК или антисмысловой олигонуклеотид содержит полинуклеотид, который специфично связывается с полинуклеотидом, кодирующим полипептид, или с комплементарным ему полинуклеотидом, таким образом, что экспрессия полипептида снижается.

В других вариантах воплощения настоящего изобретения нуклеиновая кислота является плазмидой, которая кодирует полипептид или его функциональный вариант или фрагмент, таким образом, что экспрессия полипептида или его функционального варианта или фрагмента повышена.

В родственных воплощениях настоящее изобретение направлено на создание реагентов, полезных для трансфекции клеток в культуре. Например, липидные композиции, описанные в этом документе, могут применяться для доставки нуклеиновых кислот в культивируемые клетки (например, адгезивные клетки, суспензионные клетки и т.д.)

В родственных вариантах воплощения настоящее изобретение направлено на создание способа лечения заболевания или нарушения, характеризующегося сверхэкспрессией полипептида в организме субъекта, включающего введение субъекту фармацевтической композиции согласно изобретению, при этом терапевтический агент выбирают из siРНК, микро РНК, антисмыслового олигонуклеотида и плазмиды, способной экспрессировать siРНК, микро РНК или антисмысловой олигонуклеотид, и при этом siРНК, микро РНК или антисмысловая РНК содержит полинуклеотид, который специфично связывается с полинуклеотидом, кодирующим полипептид, или с комплементарным ему полинуклеотидом.

В одном из вариантов воплощения фармацевтическая композиция содержит липидную частицу, которая состоит или в существенной степени состоит из катионного липида формулы I, ДСФХ, холестерина и ПЭГ-ДМГ, ПЭГ-с-DOMG или ПЭГ-сDMA, например, в молярном соотношении примерно 20-65% катионного липида формулы I, 3-25% нейтрального липида, 15-55% стерина и 0,5-15% ПЭГ или ПЭГ-модифицированного липида ПЭГ-ДМГ, ПЭГ-с-DOMG или ПЭГ-сDMA, при этом липидная частица ассоциирована с терапевтической нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах воплощения молярное соотношение липидов составляет примерно 60/7,5/31/1,5, 57,5/7,5/31,5/3,5, 57,2/7,1/34,3/1,4, 52/13/30/5, 50/10/38,5/1,5, 50/10/35/5, 40/10/40/10, 35/15/40/10 или 40/15/40/5 (мол.% катионного липида формулы I/ДСФХ/холестерина/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-сDMA). В некоторых вариантах воплощения липидная частица также включает нацеливающий липид, описанный в этом документе (например, липидная частица в существенной мере состоит из катионного липида формулы I, нейтрального липида, стерина, ПЭГ или ПЭГ-модифицированного липида и нацеливающего остатка (например, GalNAc3-ПЭГ-ДСГ)). В некоторых вариантах воплощения, когда нацеливающий липид содержит остаток ПЭГ и добавлен к существующей липосомной композиции, количество ПЭГ-модифицированного липида снижено таким образом, что суммарное количество ПЭГ-модифицированного липида (т.е. ПЭГ-модифицированного липида, например, ПЭГ-ДМГ, и ПЭГ-содержащего нацеливающего липида), выраженное в мольных процентах, сохраняется постоянным (например, 0,3, 1,5 или 3,5 мол.%). В другой группе вариантов воплощения нейтральный липид в этих композициях заменен на ДПФХ, ПОФХ, ДОФЭ или СМ. В другой группе вариантов воплощения ПЭГ или ПЭГ-модифицированный липид заменен на ПЭГ-ДСГ или ПЭГ-ДПГ. В другом родственном варианте воплощения настоящее изобретение включает способ лечения заболевания или нарушения, характеризующегося пониженной экспрессией полипептида в организме субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции согласно изобретению, при этом терапевтический агент является плазмидой, которая кодирует полипептид или его функциональный вариант или фрагмент.

Настоящее изобретение дополнительно направлено на создание способа индуцирования иммунного ответа у субъекта, включающего введение субъекту фармацевтической композиции согласно изобретению, при этом терапевтический агент является иммуностимулирующим олигонуклеотидом. В некоторых

воплощениях иммунный ответ является гуморальным или мукозным иммунным ответом, который состоит или в существенной степени состоит из катионного липида формулы I, ДСФХ, холестерина и ПЭГ-ДМГ, ПЭГ-С-DOMG или ПЭГ-сDMA, например, в молярном соотношении примерно 20-65% катионного липида формулы I, 3-25% нейтрального липида, 15-55% стерина и 0,5-15% ПЭГ или ПЭГ-модифицированного липида ПЭГ-ДМГ, ПЭГ-С-DOMG или ПЭГ-сDMA, при этом липидная частица ассоциирована с терапевтической нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах воплощения молярное соотношение липидов составляет примерно 60/7,5/31/1,5, 57,5/7,5/31,5/3,5, 57,2/7,1/34,3/1,4, 52/13/30/5, 50/10/38,5/1,5, 50/10/35/5, 40/10/40/10, 35/15/40/10 или 40/15/40/5 (мол.% катионного липида формулы I/ДСФХ/холестерина/ПЭГ-ДМГ или ПЭГ-сDMA). В некоторых вариантах воплощения липидная частица также включает нацеливающий липид, описанный в этом документе (например, липидная частица в существенной мере состоит из катионного липида формулы I, нейтрального липида, стерина, ПЭГ или ПЭГ-модифицированного липида и нацеливающего остатка). В некоторых вариантах воплощения, когда нацеливающий липид содержит остаток ПЭГ и добавлен к существующей липосомной композиции, количество ПЭГ-модифицированного липида снижено таким образом, что суммарное количество ПЭГ-модифицированного липида (т.е. ПЭГ-модифицированного липида, например, ПЭГ-ДМГ, и ПЭГ-содержащего нацеливающего липида), выраженное в молярных процентах, сохранялось постоянным (например, 0,3, 1,5 или 3,5 мол.%). В другой группе вариантов воплощения, нейтральный липид в этих композициях заменен на ДПФХ, ПОФХ, ДОФЭ или СМ. В другой группе вариантов воплощения, ПЭГ или ПЭГ-модифицированный липид заменен на ПЭГ-ДСГ или ПЭГ-ДПГ. В дополнительных вариантах воплощения, фармацевтическая композиция вводится субъекту в сочетании с вакциной или антигеном. Таким образом, само изобретение направлено на создание вакцин, содержащих липидную частицу согласно изобретению, которая включает иммуностимулирующий олигонуклеотид, а также ассоциирована с антигеном, к которому требуется вызвать иммунный ответ. В некоторых вариантах воплощения антиген является опухолевым антигеном или ассоциирован с инфекционным агентом, таким как, например, вирус, бактерия или паразитический организм.

Специалистам в данной области известно множество опухолевых антигенов, антигенов инфекционных агентов и антигенов, ассоциированных с другими заболеваниями, и их примеры описаны в ссылках, процитированных в этом документе. Антигены, пригодные для применения в изобретении, включают в качестве неограничивающих примеров полипептидные антигены и ДНК-антигены. Конкретными примерами антигенов являются антигены гепатита А, гепатита В, черной оспы, полиомиелита, сибирской язвы, гриппа, сыпного тифа, столбняка, кори, ротавируса, дифтерии, коклюша, туберкулеза и краснухи. В одном из вариантов воплощения антиген представлен рекомбинантным антигеном гепатита В. В другом варианте антиген представлен рекомбинантным антигеном гепатита А. В еще одном варианте антиген является опухолевым антигеном. Примерами таких ассоциированных с опухолью антигенов являются MUC-1, антиген EBV и антигены, ассоциированные с лимфомой Беркитта. Дополнительной особенностью является то, что антиген представлен рекомбинантным антигеном опухолевого антигена, родственного белку тирозиназе. Специалисту в данной области будет известно о других антигенах, пригодных для применения в изобретении.

Ассоциированные с опухолью антигены, пригодные для применения в настоящем изобретении, включают как мутированные, так и не мутированные молекулы, которые могут быть признаком одного типа опухоли, быть общими для нескольких типов опухоли и/или экспрессироваться или сверх экспрессироваться исключительно в опухолевых клетках, по сравнению с нормальными клетками. Помимо белков и гликопротеинов, были задокументированы особенности опухолеспецифичной экспрессии углеводов, ганглиозидов, гликолипидов и муцинов. Примеры ассоциированных с опухолью антигенов для применения в рассматриваемых противораковых вакцинах включают белковые продукты онкогенов, генов опухолевых супрессоров и других генов с мутациями или перестройками, характерными для опухолевых клеток, продукты реактивированных эмбриональных генов, онкофетальные антигены, тканеспецифичные (но не опухолеспецифичные) антигены дифференцировки, рецепторы факторов роста, остатки углеводов клеточной поверхности, чужеродные вирусные белки и ряд других собственных белков.

Конкретные примеры воплощения ассоциированных с опухолью антигенов включают, например, мутированные антигены, такие как белковые продукты протоонкогенов Ras p21, онкогенов опухолевых супрессоров p53 и BCR-*abl*, а также CDK4, MUM1, каспаза 8, и β катенин; сверхэкспрессированные антигены, такие как галектин 4, галектин 9, карбоангидраза, альдолаза А, PRAME, Her2/*neu*, ErbB-2 и KSA, онкофетальные антигены, такие как α -фетопротейн (AFP), хорионический гонадотропин человека (hCG); аутоантигены, такие как карциномэмбриональный антиген (CEA), и антигены дифференцировки меланоцитов, такие как Mart 1/*Melan A*, gp100, gp75, тирозиназа, TRP1 и TRP2; простатоспецифические антигены, такие как PSA, PAP, PSMA, PSM-P1 и PSM-P2; продукты реактивированных эмбриональных генов, такие как MAGE 1, MAGE 3, MAGE 4, GAGE 1, GAGE 2, BAGE, RAGE, и другие антигены, специфичные для рака яичек, такие как NY-ESO1, SSX2 и SCP1; муцины, такие как Muc-1 и Muc-2; ганглиозиды, такие как GM2, GD2 и GD3, нейтральные гликолипиды и гликопротеины, такие как Lewis (y) и глобо-N; и гликопротеины, такие как T_n, антиген Томпсона-Фриденрайха (TF) и sTn. В этот документ также вклю-

чены в качестве ассоциированных с опухолью антигенов целая клетка и лизаты опухолевых клеток, а также их иммуногенные части, а также идиотипы иммуноглобулинов, экспрессируемые моноклональными пролиферирующими В-лимфоцитами для применения против В-клеточных лимфом.

Патогены включают в качестве неограничивающих примеров инфекционные агенты, например вирусы, которые инфицируют млекопитающих, в частности человека. Примеры инфекционных вирусов включают в качестве неограничивающих примеров: Retroviridae (например, вирусы иммунодефицита человека, такие как ВИЧ-1 (также называемый HTLV-III, LAV или HTLV-III/LAV или HIV-III); и другие изоляты, такие как HIV-LP; Picornaviridae (например, вирусы полиомиелита, вирус гепатита А; энтеровирусы, вирусы Коксаки человека, риновирусы, ЕСНО-вирусы); Calciviridae (например, штаммы, вызывающие гастроэнтерит); Togaviridae (например, вирусы энцефалита лошадей, вирусы краснухи); Flaviviridae (например, вирусы денге, вирусы энцефалита, вирусы желтой лихорадки); Coronaviridae (например, коронавирусы); Rhabdoviridae (например, вирусы везикулярного стоматита, вирусы бешенства); Coronaviridae (например, коронавирусы); Rhabdoviridae (например, вирусы везикулярного стоматита, вирусы бешенства); Filoviridae (например, вирусы Эбола); Paramyxoviridae (например, вирусы парагриппа, вирус эпидемического паротита, вирус кори, респираторно-синцитиальный вирус); Orthomyxoviridae (например, вирусы гриппа); Bunyaviridae (например, вирусы Хантаан, бунгавирус, флебовирусы и найровирусы); Arenaviridae (вирусы геморрагической лихорадки); Reoviridae (например, реовирусы, орбивирусы и ротавирусы); Birnaviridae; Hepadnaviridae (вирус гепатита В); Parvoviridae (парвовирусы); Papovaviridae (вирусы папилломы, вирусы полиомы); Adenoviridae (большинство аденовирусов); Herpesviridae вирус простого герпеса (HSV) 1 и 2, вирус ветряной оспы, цитомегаловирус (CMV), вирус герпеса; Poxviridae (вирусы натуральной оспы, вирусы коровьей оспы, поксвирусы); и Iridoviridae (например, вирус африканской лихорадки свиней); и неклассифицированные вирусы (например, этиологические агенты губчатых энцефалопатий, агент дельта-гепатита (считается дефектным сателлитом вируса гепатита В), агенты не-А, не-В гепатитов (класса 1 = с внутренней передачей; класс 2 = с парентеральной передачей (т.е. гепатит С); вирус Норуолк и родственные ему вирусы и астровирусы).

Грамположительные и грамотрицательные бактерии также служат антигенами у позвоночных животных. Такие грамположительные бактерии включают в качестве неограничивающих примеров *Pasteurella species*, *Staphylococci species* и *Streptococcus species*. Грамотрицательные бактерии включают в качестве неограничивающих примеров *Escherichia coli*, *Pseudomonas species* и *Salmonella species*. Конкретные примеры инфекционных бактерий включают в качестве неограничивающих примеров *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria sps* (например, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (стрептококк группы А), *Streptococcus agalactiae* (стрептококк группы В), *Streptococcus* (группа вириданс), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (anaerobic sps.), *Streptococcus pneumoniae*, патогенные *Campylobacter sp.*, *Enterococcus sp.*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium sp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia* и *Actinomyces israelii*.

Дополнительные примеры патогенов включают в качестве неограничивающих примеров инфекционные грибы, которые инфицируют млекопитающих, и в частности, человека. Примеры инфекционных грибов включают в качестве неограничивающих примеров: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*. Примеры инфекционных паразитических организмов включают *Plasmodium*, такие как *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* и *Plasmodium vivax*. Другие инфекционные организмы (т.е. простейшие) включают *Toxoplasma gondii*.

Фармацевтические композиции.

В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение направлено на создание фармацевтических композиций, содержащих агент в виде нуклеиновой кислоты, идентифицированный с помощью модельного скрининга клеток печени, описанного в этом документе. Композиция включает агент, например дцРНК, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция полезна для лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией или активностью гена. Композицию таких фармацевтических композиций разрабатывают исходя из способа доставки. Одним примером служат композиции, композиция которых разработана для системного введения путем парентеральной доставки. Фармацевтические композиции, содержащие идентифицированный агент, вводят в дозировках, достаточных для ингибирования экспрессии целевого гена, например гена фактора VII. В общем случае пригодная доза дцРНК-агента будет находиться в диапазоне от 0,01 до 5,0 мг на 1 кг массы тела реципиента в день, обычно в диапазоне от 1 мкг до 1 мг на 1 кг массы тела в день. Фармацевтическую композицию могут вводить один раз в день или дцРНК могут вводить в виде двух, трех или нескольких субдоз через приемлемые интервалы времени в течение дня или даже с применением непрерывной инфузии или доставки с применением композиции с контролируемым высвобождением. В таком случае содержание

дцРНК в каждой субдозе должно быть соответствующим образом уменьшено, чтобы достичь суммарной ежедневной дозы. Единица дозирования может быть получена для доставки в течение нескольких дней, например, с применением традиционной композиции с замедленным высвобождением, которая обеспечивает замедленное высвобождение дцРНК в течение периода в несколько дней. Композиции с замедленным высвобождением хорошо известны специалистам в данной области и, в частности, полезны для вагинальной доставки агентов, таких как могут применяться с агентами согласно изобретению. В этом варианте воплощения единица дозирования содержит соответствующее количество ежедневных доз.

Специалисту в данной области будет понятно, что некоторые факторы могут влиять на дозировку и выбор временных периодов для эффективного лечения субъекта, включая в качестве неограничивающих примеров степень тяжести заболевания или нарушения, предшествующие способы лечения, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта, а также наличие других заболеваний. Дополнительно, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством композиции может включать разовый курс лечения или серию курсов лечения. Расчеты эффективных дозировок и периодов полувыведения *in vivo* для индивидуальных дцРНК согласно изобретению можно производить с применением стандартных методик или на основании испытаний *in vivo* с применением соответствующей модели на животном, как описано в других местах в этом документе.

В некоторых вариантах воплощения фармацевтические композиции, содержащие липидо-нуклеиновые частицы согласно изобретению, получены в соответствии со стандартными способами и дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель. В общем случае в качестве фармацевтически приемлемого носителя может использоваться изотонический раствор натрия хлорида. Другие пригодные носители включают, например, воду, буферизированную воду, 0,9% раствор натрия хлорида, 0,3% глицин и т.п., содержащие гликопротеины для повышения стабильности, такие как альбумин, липопротеин, глобулин и т.д. В композициях, включающих раствор натрия хлорида или другой содержащий соль носитель, этот носитель предпочтительно добавляют после формирования липидных частиц. Таким образом, после того как композиции липидо-нуклеиновых частиц сформировались, эти композиции можно разбавить фармацевтически приемлемыми носителями, такими как изотонический раствор натрия хлорида.

Полученные в результате фармацевтические препараты можно простерилизовать с применением стандартных, хорошо известных, методик стерилизации. После этого водные растворы можно упаковать для применения или профильтровать в стерильных условиях и лиофилировать, при этом лиофилизованный препарат перед введением должен смешиваться со стерильным водным раствором. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные субстанции, необходимые для создания условий, близких к физиологическим, такие как корректирующие значение pH и буферизирующие агенты, корректирующие тоничность агенты и т.п., например, натрия ацетат, натрия лактат, натрия хлорид, калия хлорид, кальция хлорид и т.д. Дополнительно, липидная суспензия может включать защищающие липиды агенты, которые защищают липиды при хранении от повреждений, вызванных свободными радикалами и перекисным окислением. Пригодными являются липофильные гасители свободных радикалов, такие как α -токоферол и водорастворимые железо-специфичные хелаторы, такие как ферриоксамин.

Концентрация липидной частицы или липидо-нуклеиновой частицы в фармацевтических композициях может широко варьировать, т.е. от менее чем примерно 0,01%, обычно равной или по меньшей мере примерно равной 0,05-5%, до 10-30% по массе, и будет выбираться в основном с учетом объемов жидкости, вязкости и т.д., в соответствии с конкретным выбранным способом введения. Например, концентрация может быть повышена для снижения связанной с лечением нагрузки вводимой жидкостью. Это может быть, в частности, необходимо для пациентов, имеющих ассоциированную с атеросклерозом застойную сердечную недостаточность или тяжелую форму гипертонии. В соответствии с другим вариантом комплексы, состоящие из способных вызывать воспаление липидов, могут быть разбавлены для снижения концентраций с целью уменьшения воспаления в области введения. В одной группе вариантов воплощения нуклеиновая кислота будет нести присоединенную метку и будет применяться для диагностики (указывая на присутствие комплементарной нуклеиновой кислоты). В этом случае количество введенных комплексов будет зависеть от конкретной использованной метки, диагностируемого болезненного состояния и суждения клинициста, но в общем случае будет составлять от примерно 0,01 до примерно 50 мг/кг массы тела (например, для агента в виде нуклеиновой кислоты), предпочтительно от примерно 0,1 до примерно 5 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах воплощения вводимый комплекс содержит от примерно 0,004 до примерно 50 мг/кг массы тела агента, представленного нуклеиновой кислотой (например, от примерно 0,006 до примерно 0,2 мг/кг).

Как указано выше, частицы липида с терапевтическим агентом (например, нуклеиновой кислотой) согласно изобретению могут содержать полиэтиленгликоль (ПЭГ)-модифицированные фосфолипиды, ПЭГ-церамиды или ганглиозиды, G_M1 -модифицированные липиды или другие липиды, эффективные для предотвращения или ограничения агрегации. Добавление таких компонентов не только предотвращает агрегацию комплексов. Скорее, оно может дополнительно обеспечивать способ увеличения времени существования в кровеносной системе и увеличения доставки композиции липида и нуклеиновой кислоты к целевым тканям.

Настоящее изобретение направлено на создание композиций липида и терапевтического агента в виде набора. В типичном случае набор будет состоять из контейнера, имеющего отделения для хранения различных элементов набора. Набор будет содержать частицы или фармацевтические композиции согласно изобретению, предпочтительно в дегидратированной или концентрированной форме, с инструкциями по их регидратации или разбавлению и введению. В некоторых воплощениях частицы содержат активный агент, в то время как в других вариантах воплощения не содержат.

Фармацевтические композиции, содержащие агент, идентифицированный с помощью модельного скрининга клеток печени, могут вводиться с помощью ряда способов, в зависимости от того, требуется ли местное или системное лечение и от области, к которой применяется лечение. Введение может быть местным, легочным, например, путем ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, в том числе с применением небулайзера; внутритрахеальным, интраназальным, эпидермальным или трансдермальным, пероральным или парентеральным. Способ введения может быть разработан так, чтобы в результате достичь предпочтительной локализации в конкретных тканях с применением местной доставки, например, прямой внутрисуставной инъекцией в сустав, ректальным введением для прямой доставки в кишку и кишечник, интравагинальным введением для доставки в шейку матки и вагину, интравитриальным введением для доставки в глаз. Парентеральное введение включает внутривенную, внутриартериальную, внутрисуставную, подкожную, интраперитонеальную или внутримышечную инъекцию или инфузию; или интракраниальное, например, интратекальное или интравентрикулярное введение.

Фармацевтические композиции и составы для местного введения могут включать трансдермальные пластыри, мази, примочки, кремы, гели, капли, суппозитории, аэрозоли, растворы и порошки. Стандартные фармацевтические носители, жидкие, порошкообразные или масляные основы, загустители и т.п. могут быть необходимы или желательны. Также могут быть полезны презервативы, перчатки и т.п. с покрытием. Предпочтительные местные композиции включают таковые, где дцРНК согласно изобретению находятся в смеси с компонентом для местной доставки, таким как липид, липосома, жирная кислота, сложный эфир жирной кислоты, стероид, хелатирующий агент или поверхностно-активное вещество. Предпочтительные липиды и липосомы включают нейтральные (например, диолеилфосфатидилэтаноламин (ДОФЭ), димиристоилфосфатидилхолин (ДМФХ), дистеароилфосфатидилхолин), отрицательно заряженные (например, димиристоилфосфатидилглицерин, или ДМФГ) и катионные (например, диолеилтетраметиламинопропил DOTAP и диолеилфосфатидилэтаноламин DOTMA). дцРНК согласно изобретению могут быть инкапсулированы внутри липосом или могут образовывать с ними комплексы, в частности, с катионными липосомами. В соответствии с другим вариантом дцРНК могут находиться в комплексе с липидами, в частности с катионными липидами. Предпочтительные жирные кислоты и сложные эфиры включают в качестве нелимитирующих примеров арахидоновую кислоту, олеиновую кислоту, арахидиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, диэфир каприновой кислоты, триэфир каприновой кислоты, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или сложный эфир C₁₋₁₀алкила (например, изопропилмиристинат, IPM), моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемые соли. Композиции для местного применения подробно описаны в заявке на патент США с сер. № 09/315298, поданной 20 мая 1999 г., содержание которой целиком включено в описание в качестве ссылки.

Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, микрогранулы, наногранулы, суспензии или растворы в воде или неводных средах, капсулы, желатиновые капсулы, пакеты-саше, таблетки или минитаблетки. Могут требоваться загустители, вкусовые и ароматические агенты, разбавители, эмульгирующие агенты, диспергирующие агенты или связующие вещества. Предпочтительными композициями для перорального введения являются композиции, в которых дцРНК согласно изобретению вводят в сочетании с одним или несколькими веществами, способствующими проникновению, поверхностно-активными веществами и хелатирующими агентами. Предпочтительные поверхностно-активные вещества включают жирные кислоты и/или их сложные эфиры и соли, желчные кислоты и/или их соли. Предпочтительные желчные кислоты/соли включают хенодесоксихолевую кислоту (CDCA) и урсодесоксихолевую кислоту (UDCA), холевую кислоту, дегидрохолевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, глюхолевую кислоту, глихолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту, таурохолевую кислоту, тауродезоксихолевую кислоту, натрия тауро-24,25-дигидро-фузидат и натрия гликодигидрофузидат. Предпочтительные жирные кислоты включают арахидоновую кислоту, ундекановую кислоту, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, диэфир каприновой кислоты, триэфир каприновой кислоты, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемые соли (например, натриевые). Также предпочтительными являются сочетания веществ, способствующих проникновению, например, комбинации жирных кислот/солей с желчными кислотами/солями. В частности, особо предпочтительным сочетанием является сочетание натриевой соли лауриновой кислоты, каприновой кислоты и UDCA. Дополнительные вещества, способствующие

проникновению, включают эфир полиоксиэтилен-9-лаурила, полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир.

Доставка дцРНК согласно изобретению может осуществляться перорально, в виде гранул, в том числе в виде аэрозоля сухих частиц, или в комплексе с образованием микро- и наногранул. Комплексообразующие агенты для дцРНК включают полиаминокислоты; полиимины; полиакрилаты; полиалкилакрилаты, полиокситаны, полиалкилцианоакрилаты; катионированные желатины, альбумины, крахмалы, акрилаты, полиэтиленгликоли (ПЭГ) и крахмалы; полиалкилцианоакрилаты; ДЭАЭ-производные полииминов, поллуланы, целлюлозы и крахмалы. В частности, предпочтительные комплексообразующие агенты включают хитозан, N-триметилхитозан, поли-L-лизин, полигистидин, полиорнитин, полиспермины, протамин, поливинилпиридин, политиодиэтиламинотетраэтилен P(TDAE), полиаминостирен (например, p-амино), поли(метилцианоакрилат), поли(этилцианоакрилат), поли(бутилцианоакрилат), поли(изобутилцианоакрилат), поли(изогексилцианоакрилат), ДЭАЭ-метакрилат, ДЭАЭ-гексилакрилат, ДЭАЭ-акриламид, ДЭАЭ-альбумин и ДЭАЭ-декстран, полиметилакрилат, полигексилакрилат, поли(D,L-молочная кислота), поли(сополимер D,L-молочной кислоты/гликолевой кислоты) (PLGA), альгинат и полиэтиленгликоль (ПЭГ). Композиции для перорального введения для дцРНК и их получение подробно описаны в заявках на патент США сер. № 08/886829 (поданной 1 июля 1997 г.), сер. № 09/108 673 (поданной

1 июля 1998 г.), сер. № 09/256515 (поданной 23 февраля 1999 г.), сер. № 09/082624 (поданной 21 мая 1998 г.) и сер. № 09/315298 (поданной 20 мая 1999 г.), содержание каждой из которых целиком включено в описание в качестве ссылки.

Композиции и составы для парентерального, интратекального или интравентрикулярного введения могут включать стерильные водные растворы, которые дополнительно могут содержать буферы, разбавители и другие пригодные добавки, такие как, в качестве нелимитирующих примеров, вещества, способствующие проникновению, соединения-носители и другие фармацевтически приемлемые носители или вспомогательные вещества.

Фармацевтические композиции включают в качестве неограничивающих примеров растворы, эмульсии и композиции, содержащие липосомы. Эти композиции могут быть получены из различных компонентов, включая в качестве неограничивающих примеров предварительно полученные жидкости, само-эмульгирующиеся сухие вещества и само-эмульгирующиеся полутвердые вещества.

Фармацевтические композиции, которые еще в одном варианте могут быть представлены в форме единицы дозирования, могут быть получены в соответствии со стандартными способами, хорошо известными специалистам фармацевтической промышленности. Такие способы включают этап объединения активных веществ с фармацевтическим носителем (носителями) или вспомогательным веществом (веществами). В общем случае композиции приготавливают путем смешивания до однородности и тесного взаимодействия активных веществ с жидкими носителями или тонкодисперсными твердыми носителями или с обоими и после этого, в случае необходимости, формируют продукт.

Композициям может быть придана любая из многих возможных лекарственных форм, включая в качестве неограничивающих примеров таблетки, капсулы, желатиновые капсулы, жидкие сиропы, мягкие гели, суппозитории и клизмы. Композиции согласно изобретению могут также быть получены в виде суспензий в водных, неводных или смешанных средах. Водные суспензии могут дополнительно содержать субстанции, которые повышают вязкость суспензии, включая, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбитол и/или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

В одном из вариантов воплощения изобретения фармацевтические композиции могут быть получены для применения в форме пены. Фармацевтические пены включают в качестве неограничивающих примеров такие композиции как эмульсии, микроэмульсии, кремы, желе и липосомы. Хотя они и являются в целом схожими по своей природе, эти композиции различаются по компонентам и стабильности готового продукта. Способы получения таких композиций и композиций в общем случае известны специалистам в области фармацевтики и могут применяться для композиций и композиций согласно изобретению.

Настоящее изобретение не ограничено в своих применениях особенностями получения и сборки компонентов, изложенными в следующем описании. Изобретение пригодно для других применений и может применяться на практике и выполняться различными способами. Дополнительно, фразеология и терминология, использованные в этом документе, имеют целью дать описание и не должны рассматриваться как ограничивающие. Применение слов "включающий", "содержащий" или "имеющий", "вовлекающий" и их вариантов в этом документе означает включение всех позиций, перечисленных после этого, и их эквивалентов, а также дополнительных позиций.

Примеры

Последующие примеры приведены в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения объема заявленного изобретения.

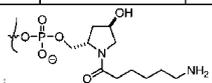
При использовании в примерах, приведенных в этом документе, термин "АроЕ" означает АроЕЗ, если не указано иначе.

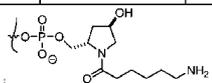
Пример 1. Дуплексы siРНК для направленного действия на Lnc и FVII.

В табл. 7 приведены примеры последовательностей для направленного действия на Lnc и FVII.

Таблица 7

Дуплекс	Смысловой/ антисмысловой	Последовательность 5'-3'	Мишень
	1000/2434	CUU ACG CUG AGU ACU UCG AdTdT U*CG AAG fUAC UCA GCG fUAA GdT*dT	Luc
	2433/1001	C*UfU ACG CUG AGfU ACU UCG AdT*dT UCG AAG UAC UCA GCG UAA GdTdT	Luc
	2433/2434	C*UfU ACG CUG AGfU ACU UCG AdT*dT U*CG AAG fUAC UCA GCG fUAA GdT*dT	Luc
	1000/1001	CUU ACG CUG AGU ACU UCG AdTdT UCG AAG UAC UCA GCG UAA GdTdT	Luc
AD- 1596		GGAUCAUCUCAAGUCUUAACdTdT GUAAGACUUGAGAUGAUCCdTdT	FVII
AD- 1661		GGAfUfCAfUfCfUfCAAGfUfCfUfUAFcDtTdT GfUAAGAfCfUfUGAGAfUGAfUfCfCdT*dT	FVII



Примечание: L8: ; строчная буква: 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, *: фосфоротионатная связь в остоле, fN: 2'-фторонуклеотид, dN: 2'-дезоксинуклеотид.

Пример 2. Оценка *in vivo* FVII с применением липосом на основе катионного липида.

Эксперименты по сайленсингу *in vivo* фактора VII и ApoB у грызунов. Мышам линии C57BL/6 (Charles River Labs, Массачусетс, США) и крысам линии Спрег-Доули (Charles River Labs, Массачусетс, США) вводили либо раствор натрия хлорида, либо siРНК в составе требуемых композиций путем инъекции в хвостовую вену в объеме 0,01 мл/г. В разных временных точках после введения животных анестезировали ингаляцией фторированного простого эфира и собирали пробы крови в пробирки для отделения сыворотки путем забора крови из ретроорбитального синуса. Содержание в сыворотке белкового фактора VII определяли в пробах с применением хромогенного анализа (Coaset Factor VII, DiaPharma Group, Огайо, США или Biophen FVII, Aniaga Corporation, Огайо, США) в соответствии с протоколами производителя. Стандартную кривую получали, используя сыворотку, собранную от животных, обработанных раствором натрия хлорида. В экспериментах, где проводилась оценка содержания мРНК в клетках печени в различных временных точках после введения, животных умерщвляли и печень извлекали и мгновенно замораживали в жидком азоте. Замороженную ткань печени растирали в порошок. Приготавливали лизаты ткани и определяли содержание мРНК фактора VII и apoB с применением метода разветвленной ДНК оценки (QuantiGene Assay, Panomics, Калифорния, США).

Пример 3. Липосомные композиции для направленного действия на FVII.

Фактор VII (FVII), известный белок, участвующий в коагуляционном каскаде, синтезируется в печени (в гепатоцитах) и секретируется в плазму. Содержание FVII в плазме можно определить с помощью простого колориметрического анализа с использованием планшетов. По существу, FVII представляет собой удобную модель для определения опосредованного siРНК подавления выработки гепатоцитами белков, а также мониторинга концентраций в плазме и распределения в тканях липидо-нуклеиновых частиц и siРНК.

Нокдаун фактора VII у мышей.

Активность FVII оценивали у животных, обработанных FVII siРНК, в точке 24 ч после внутривенной (с дозой насыщения) инъекции мышам линии C57BL/6. Содержание FVII измеряли с применением имеющегося в продаже набора для определения содержания белка в сыворотке или ткани, следуя инструкциям производителя, в масштабе микропланшета. Снижение содержания FVII определяли в сравнении с не обработанными контрольными мышами и результаты выражали как % остаточного количества FVII. В начальном скрининге каждой новой липосомной композиции использовали четыре уровня дозы (2, 5, 12,5, 25 мг/кг FVII siРНК) и расширяли количество дозировок при последующих экспериментах, основанных на результатах, которые были получены при начальном скрининге.

Определение переносимости.

Переносимость каждой новой липосомной композиции с siРНК оценивали, проводя мониторинг изменения массы, наблюдения за поведением в клетке, проводя клинический биохимический анализ и в некоторых случаях гематологический анализ. Массу животных регистрировали перед обработкой и через 24 ч после обработки. Данные регистрировали в виде % изменения массы тела. Помимо измерения массы тела, проводили полный клинический биохимический анализ, включая определение маркеров функции печени, для каждого уровня дозы (2, 5, 12,5 и 25 мг/кг siРНК) в точке 24 ч после инъекции, используя аликвоты сыворотки, собранной для анализа FVII. Пробы отсылали для проведения анализа в Центральную лабораторию ветеринарии (Langley, BC). В некоторых случаях в лечебную группу включали дополнительных мышей для сбора цельной крови для проведения гематологического анализа.

Определение терапевтического индекса.

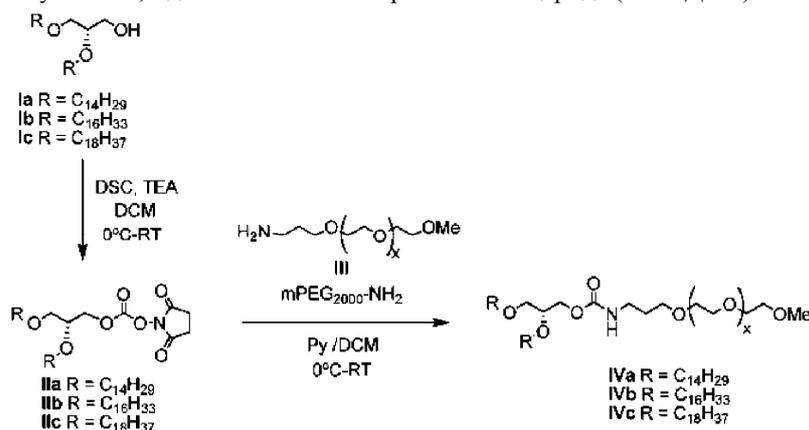
Терапевтический индекс (ТИ) - это условный параметр, получаемый сравнением показателей токсичности и активности. В ходе данных исследований, ТИ определяли как:

$TI = MTD \text{ (максимально переносимая доза)} / ED_{50}$ (доза для 50%-ного нокадауна FVII).

MTD для настоящих исследований установили как наименьшую дозу, вызывающую >7% снижение массы тела и повышение в >200 раз содержания аланинаминотрансферазы (АЛТ), клинического биохимического маркера с высокой специфичностью к повреждению печени у грызунов. ED_{50} определяли по кривым зависимости доза-активность FVII.

AD 1661 siPHK, которая представлена в примере 1, вводили в составе композиций, содержащих DLin-M-C3-DMA:ДСФХ:холестерин:ПЭГ-ДМГ в следующих молярных соотношениях, которые приготавливали и испытывали способами, описанными в примере 2: 60:7,5:31:1,5; 50:10:38,5:1,5 и 40:20:38,5:1,5. Результаты этих экспериментов *in vivo* представлены на фиг. 1, демонстрирующей способность испытанных композиций к сайленсингу.

Пример 4. Получение 1,2-ди-О-алкила-sn3-карбомоилглицерида (ПЭГ-ДМГ).



Получение IVa.

1,2-Ди-О-тетрадецил-sn-глицерид Ia (30 г, 61,80 ммоль) и N,N'-сукцинимидилкарбонат (DSC, 23,76 г, 1,5 экв.) поместили в дихлорметан (DCM, 500 мл) и перемешивали, держа в смеси льда с водой. Триэтиламин (TEA, 25,30 мл, 3 экв.) добавили в перемешиваемый раствор и после этого оставили реакционную смесь перемешиваться в течение ночи при температуре окружающей среды. За развитием реакции следили с помощью ТСХ. Реакционную смесь разбавили DCM (400 мл) и промыли органический слой водой (2 раза по 500 мл), водным раствором NaHCO₃ (500 мл), с последующим стандартным исследованием. Полученный осадок высушили при температуре окружающей среды при высоком вакууме в течение ночи. После высушивания полученный таким образом грубый карбонат IIa растворили в дихлорметане (500 мл) и перемешивали в ледяной бане. К перемешиваемому раствору в атмосфере аргона добавили mПЭГ₂₀₀₀-NH₂ (III, 103,00 г, 47,20 ммоль, приобретенный у NOF Corporation, Япония) и безводный пиридин (Py, 80 мл, в избытке). После этого оставили реакционную смесь перемешиваться в течение ночи при температуре окружающей среды. Растворители и летучие соединения удалили под вакуумом и осадок растворили в DCM (200 мл) и нанесли на колонку силикагеля, упакованного в этилацетат. Колонку сначала элюировали этилацетатом и после этого - градиентом 5-10% метанола в дихлорметане для получения требуемого ПЭГ-липида IVa в виде белого сухого вещества (105,30 г, 83%).

¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц) δ = 5,20-5,12 (m, 1H), 4,18-4,01 (m, 2H), 3,80-3,70 (m, 2H), 3,70-3,20 (m, -O-CH₂-CH₂-O-, ПЭГ-CH₂), 2,10-2,01 (m, 2H), 1,70-1,60 (m, 2H), 1,56-1,45 (m, 4H), 1,31-1,15 (m, 48H), 0,84 (t, J=6,5 Гц, 6H).

Обнаруженный диапазон масс-спектра: 2660-2836.

Получение IVb.

1,2-Ди-О-гексадецил-sn-глицерид 1b (1,00 г, 1,848 ммоль) и DSC (0,710 г, 1,5 экв.) поместили вместе в дихлорметан (20 мл) и охладили до 0°C в смеси льда с водой. Триэтиламин (1,00 мл, 3 экв.) добавили и оставили реакционную смесь перемешиваться в течение ночи. За развитием реакции следили с помощью ТСХ, разбавили DCM, промыли водой (2 раза), раствором NaHCO₃ и высушили над натрия сульфатом. Растворители удалили при пониженном давлении и полученный осадок IIb хранили под высоким вакуумом в течение ночи. Это соединение применяли непосредственно для проведения следующей реакции без дополнительной очистки. mПЭГ₂₀₀₀-NH₂ III (1,50 г, 0,687 ммоль, приобретенный у NOF Corporation, Япония) и IIb (0,702 г, 1,5 экв.) растворили в дихлорметане (20 мл) в атмосфере аргона. Реакционную смесь охладили до 0°C. Добавили пиридин (1 мл, в избытке) и перемешивали реакционную смесь в течение ночи. За развитием реакции следили с помощью ТСХ. Растворители и летучие соединения удалили под вакуумом и осадок очистили хроматографией (элюировали сперва этилацетатом, потом

градиентом 5-10% MeOH/DCM) для получения требуемого соединения IVb в виде белого сухого вещества (1,46 г, 76%).

¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц) δ = 5,17 (t, J=5,5 Гц, 1H), 4,13 (dd, J=4,00 Гц, 11,00 Гц, 1H), 4,05 (dd, J=5,00 Гц, 11,00 Гц, 1H), 3,82-3,75 (m, 2H), 3,70-3,20 (m, -O-CH₂-CH₂-O-, ПЭГ-CH₂), 2,05-1,90 (m, 2H), 1,80-1,70 (m, 2H), 1,61-1,45 (m, 6H), 1,35-1,17 (m, 56H), 0,85 (t, J=6,5 Гц, 6H).

Обнаруженный диапазон масс-спектра: 2716-2892.

Получение IVc.

1,2-Ди-О-октадецил-*sn*-глицерид Ic (4,00 г, 6,70 ммоль) и DSC (2,58 г, 1,5 экв.) поместили вместе в дихлорметан (60 мл) и охладили до 0°C в смеси льда с водой. Триэтиламин (2,75 мл, 3 экв.) добавили и оставили реакционную смесь перемешиваться в течение ночи. За развитием реакции следили с помощью ТСХ, разбавили DCM, промыли водой (2 раза), раствором NaHCO₃ и высушили над натрия сульфатом. Растворители удалили при пониженном давлении и осадок хранили под высоким вакуумом в течение ночи. Это соединение применяли непосредственно для проведения следующей реакции без дополнительной очистки. МПЭГ₂₀₀₀-NH₂ III (1,50 г, 0,687 ммоль, приобретенный у NOF Corporation, Япония) и Ic (0,760 г, 1,5 экв.) растворили в дихлорметане (20 мл) в атмосфере аргона. Реакционную смесь охладили до 0°C. Добавили пиридин (1 мл, в избытке) и перемешивали реакционную смесь в течение ночи. За развитием реакции следили с помощью ТСХ. Растворители и летучие соединения удалили под вакуумом и осадок очистили хроматографией (элюировали этилацетатом, потом градиентом 5-10% MeOH/DCM) для получения требуемого соединения IVc в виде белого сухого вещества (0,92 г, 48 %).

¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц) δ = 5,22-5,15 (m, 1H), 4,16 (dd, J=4,00 Гц, 11,00 Гц, 1H), 4,06 (dd, J=5,00 Гц, 11,00 Гц, 1H), 3,81-3,75 (m, 2H), 3,70-3,20 (m, -O-CH₂-CH₂-O-, ПЭГ-CH₂), 1,80-1,70 (m, 2H), 1,60-1,48 (m, 4H), 1,31-1,15 (m, 64H), 0,85 (t, J=6,5 Гц, 6H).

Обнаруженный диапазон масс-спектра: 2774-2948.

Пример 5. Получение DLin-M-C3-DMA (т.е. (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноата).

Раствор (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ола (0,53 г), 4-N,N-диметиламино-масляной кислоты гидрохлорида (0,51 г), 4-N,N-диметиламинопиридина (0,61 г) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида (0,53 г) в дихлорметане (5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Раствор промыли разбавленной хлористоводородной кислотой и после этого - разбавленным водным раствором натрия бикарбоната. Органические фракции высушили над безводным магнием сульфатом, профильтровали и удалили растворитель на ротонном испарителе. Остаток пропустили через колонку силикагеля (20 г), используя элюцию градиентом 1-5% метанола/дихлорметана. Фракции, содержащие очищенный продукт, объединили и удалили растворитель, получив бесцветную маслянистую жидкость (0,54 г). Соединения по настоящему изобретению могут быть синтезированы способами, описанными в следующих статьях, которые полностью включены в описание

1. Schlueter, Urs; Lu, Jun; Fraser-Reid, Bert. **Synthetic Approaches To Heavily Lipidated Phosphoglyceroinositides**. *Organic Letters* (2003), 5(3), 255-257.
2. King, J. F.; Allbutt, A. D. *Can. J. Chem.* 1970, 48, 1754-1769
3. Mach, Mateusz; Schlueter, Urs; Mathew, Felix; Fraser-Reid, Bert; Hazen, Kevin C. **Comparing n-pentenyl orthoesters and n-pentenyl glycosides as alternative glycosyl donors**. *Tetrahedron* (2002), 58(36), 7345-7354.

Пример 6. Эффективность у крыс MC3-липосом, имеющих разные липосомные композиции.

Для проверки дозозависимого эффекта MC3-содержащих липосомных композиций у крыс приготовили следующие липосомные композиции, в существенной степени, как описано в примере 2. В приведенной табл. 8 включенные компоненты указаны следующим образом: MC3-ДСФХ-холестерин-ПЭГ-S14. В табл. 8 указаны примеры испытанных композиций.

Животные: линия Спрег-Доули.

Всего: 27.

Ввод. об. (мкл): инъекция 5 мкл/г.

Таблица 8

Группа	Размер группы	Мишень	siРНК	Конц. (мг/мл)	Ввод. об. (мкл/г)	Доза (мг/кг)	Носитель
1	3				5		PBS
2	3	FVII	1661	0,06	5	0,30	50-10-38,5-1,5
3	3	FVII	1661	0,02	5	0,10	50-10-38,5-1,5
4	3	FVII	1661	0,006	5	0,03	50-10-38,5-1,5
5	3	FVII	1661	0,002	5	0,01	50-10-38,5-1,5
6	3	FVII	1661	0,06	5	0,30	40-15-40-5
7	3	FVII	1661	0,02	5	0,10	40-15-40-5
8	3	FVII	1661	0,006	5	0,03	40-15-40-5
9	3	FVII	1661	0,002	5	0,01	40-15-40-5

Как показано на фиг. 2, липосомные композиции, имеющие 50 мол.% МСЗ, демонстрировали дозозависимую кривую с эффективностью при немного более низких концентрациях siРНК, чем таковые у липосомных композиций, имеющих 40 мол.% МСЗ.

Пример 7. Эффективность МСЗ-липосом демонстрирует зависимость от АроЕ у мышей.

Для дополнительной проверки роли АроЕ в эффективности различных липосомных композиций, мышам дикого типа и нокаутным по АроЕ вводили МСЗ-липосомы, содержащие композиции AD-1661 siРНК в дозе 0,1, 0,03 и 0,01 мг/кг, в существенной мере так, как описано в примере 2. Половина липосомных композиций были предварительно смешаны с рекомбинантным белком АроЕ для определения того, может ли экзогенное добавление АроЕ восполнить отсутствие белка у мышей. В табл. 9 указаны примеры испытанных композиций.

План эксперимента.

Животные: C57BL/6 и нокаутные по АроЕ.

Всего: 42.

Ввод. об. (мкл): различный, в зависимости от массы.

Таблица 9

Группа	Размер группы	Тип мыши	Мишень	siРНК	Конц. (мг/мл)	Доза (мг/кг)	Носитель
1	3	C57BL/6				0,00	PBS
2	3	C57BL/6	FVII	1661	0,0100	0,100	МСЗ 50-10-38,5-1,5 с АроЕ
3	3	C57BL/6	FVII	1661	0,0030	0,030	МСЗ 50-10-38,5-1,5 с АроЕ
4	3	C57BL/6	FVII	1661	0,0010	0,010	МСЗ 50-10-38,5-1,5 с АроЕ
5	3	C57BL/6	FVII	1661	0,0100	0,100	МСЗ 50-10-38,5-1,5 без АроЕ
6	3	C57BL/6	FVII	1661	0,0030	0,030	МСЗ 50-10-38,5-1,5 без АроЕ
7	3	C57BL/6	FVII	1661	0,0010	0,010	МСЗ 50-10-38,5-1,5 без АроЕ
8	3	Нокаут по АроЕ				0,00	PBS
9	3	Нокаут по АроЕ	FVII	1661	0,0100	0,100	МСЗ 50-10-38,5-1,5 с АроЕ
10	3	Нокаут по АроЕ	FVII	1661	0,0030	0,030	МСЗ 50-10-38,5-1,5 с АроЕ
11	3	Нокаут по АроЕ	FVII	1661	0,0010	0,010	МСЗ 50-10-38,5-1,5 с АроЕ
12	3	Нокаут по АроЕ	FVII	1661	0,0100	0,100	МСЗ 50-10-38,5-1,5 без АроЕ
13	3	Нокаут по АроЕ	FVII	1661	0,0030	0,030	МСЗ 50-10-38,5-1,5 без АроЕ
14	3	Нокаут по АроЕ	FVII	1661	0,0010	0,010	МСЗ 50-10-38,5-1,5 без АроЕ

На фиг. 3 показано дозозависимое снижение содержания белка FVII у мышей дикого типа (правые столбцы), но не у нокаутных мышей с дефицитом АроЕ (левые столбцы), при введении МСЗ-содержащих липосом, что свидетельствует о роли АроЕ в поглощении клетками и/или доставке в печень. МСЗ-липосомы, полученные, как описано выше, содержащие 1661 siРНК, вводили в концентрациях 0,1, 0,03 и 0,01 мг/кг отдельно или в предварительно полученной смеси с липопротеином АроЕ. Однако обнаружено, что при намного более высоких дозах (например, около 1,0 мг/кг или выше) композиции, содержащие МСЗ, опосредуют сайленсинг FVII на уровне мРНК и белка (данные не приведены). Как показано на фиг. 3, испытанные липосомные композиции, содержащие МСЗ, не способны опосредовать сайленсинг FVII в нокаутных по АроЕ мышках, если не были предварительно смешаны с рекомбинантным АроЕ. Таким образом, активность может быть восстановлена в нокаутных по АроЕ мышках путем предварительного смешивания МСЗ (МСЗ-содержащей липосомы) с АроЕ.

Пример 8. Эффективность МСЗ-содержащих липосомных композиций, изменяющаяся в зависимости от мольного процента и длины хвоста фосфохолинов.

Для проверки эффекта изменения мольного процента и длины хвоста фосфохолинов на эффективность различных липосомных композиций, различные композиции, содержащие ДСФХ, ДМФХ и ДЛФХ, испытывали на эффективность в сайленсинге FVII при 0,01 и 0,03 мг/кг. В табл. 10 указаны примеры испытанных композиций.

План эксперимента.

Животные: C57BL/6.

Всего: 45.

Ввод. об. (мкл): различный, в зависимости от массы.

Таблица 10

Группа	Размер группы	Мишень	siРНК	Конц. (мг/мл)	Доза (мг/кг)	Носитель
1	3				0,00	PBS
2	3	FVII	1661	0,0010	0,010	МСЗ 50-10-38,5-1,5 1661 ДСФХ
3	3	FVII	1661	0,0003	0,003	МСЗ 50-10-38,5-1,5 1661 ДСФХ
4	3	FVII	1661	0,0010	0,010	МСЗ 50-10-38,5-1,5 1661 ДМФХ
5	3	FVII	1661	0,0003	0,003	МСЗ 50-10-38,5-1,5 1661 ДМФХ
6	3	FVII	1661	0,0010	0,010	МСЗ 50-10-38,5-1,5 1661 ДЛФХ
7	3	FVII	1661	0,0003	0,003	МСЗ 50-10-38,5-1,5 1661 ДЛФХ
8	3	FVII	1661	0,0010	0,010	МСЗ 40-20-38,5-1,5 1661 ДСФХ
9	3	FVII	1661	0,0003	0,003	МСЗ 40-20-38,5-1,5 1661 ДСФХ
10	3	FVII	1661	0,0010	0,010	МСЗ 40-20-38,5-1,5 1661 ДМФХ
11	3	FVII	1661	0,0003	0,003	МСЗ 40-20-38,5-1,5 1661 ДМФХ
12	3	FVII	1661	0,0010	0,010	МСЗ 40-20-38,5-1,5 1661 ДЛФХ
13	3	FVII	1661	0,0003	0,003	МСЗ 40-20-38,5-1,5 1661 ДЛФХ
14	3	FVII	1661	0,0010	0,010	МСЗ 30-30-38,5-1,5 1661 ДМФХ
15	3	FVII	1661	0,0003	0,003	МСЗ 30-30-38,5-1,5 1661 ДМФХ

На фиг. 4 показаны эффекты изменений мольного процента МСЗ, например, при сравнении 50 и 40 мол.% и в случае ДМФХ-содержащей композиции 50, 40 и 30 мол.%. На фиг. 4 также демонстрируется эффект замены нейтрального липида, и можно видеть различие результатов для МСЗ-липосомных композиций, содержащих ДСФХ, ДМФХ и ДЛФХ.

Пример 9. Включение GalNAc-липидов в липосомные композиции.

Для исследования возможности альтернативных способов доставки были проведены эксперименты *in vivo* с применением липосомных композиций, содержащих липиды, конъюгированные с N-ацетилгалактозаминном (GalNAc). GalNAc был выбран в качестве возможного нацеливающего лиганда, поскольку известно, что рецептор GalNAc, как полагают, имеет высокий уровень экспрессии в печени. По этой причине провели на мышах и крысах исследования по испытанию эффективности МСЗ-содержащих липосомных композиций, дополнительно содержащих липид GalNAc3-ПЭГ-ДСГ формулы III, в существенной мере как описано в примере 2. Во всех экспериментах суммарное количество ПЭГ-конъюгированных липидов сохраняли постоянным (например, там, где добавляли 0,5 мол.% GalNAc3-ПЭГ, соответствующее количество ПЭГ-ДСГ снижали на 0,5 мол.%). В эксперименте использовали четырех животных в каждой из девяти групп на генотип.

В табл. 11 представлены экспериментальные параметры способов, включавших применение МСЗ-содержащих липосом с 5% концентрацией ПЭГ-липидов, где композиции испытывали на мышах линии C57BL6. Липосомы содержали следующие молярные соотношения: 50/10/35/5 МСЗ/ДСФХ/холестерин/ПЭГ-ДСГ. Там, где добавляли 0,5% GalNAc3-ПЭГ, соответствующее количество ПЭГ-ДСГ снижали до 4,5%.

План эксперимента.

Животные: C57BL6.

Всего: 36.

Ввод. об. (мкл): различный, в зависимости от массы.

Таблица 11

Группа	Размер группы	Мишень	siРНК	Конц. (мг/мл)	Ввод. об. (мкл/г)	Доза (мг/кг)	Носитель
1	4				10		PBS
2	4	FVII	1661	0,1	10	1,00	50/10/35/5
3	4	FVII	1661	0,05	10	0,50	50/10/35/5
4	4	FVII	1661	0,025	10	0,25	50/10/35/5
5	4	FVII	1661	0,0125	10	0,125	50/10/35/5
6	4	FVII	1661	0,1	10	1,00	50/10/35/4,5 с 0,5% GalNAc-липидом
7	4	FVII	1661	0,05	10	0,50	50/10/35/4,5 с 0,5% GalNAc-липидом
8	4	FVII	1661	0,025	10	0,25	50/10/35/4,5 с 0,5% GalNAc-липидом
9	4	FVII	1661	0,0125	10	0,125	50/10/35/4,5 с 0,5% GalNAc-липидом

В табл. 12 представлены экспериментальные параметры способов, включавших применение МСЗ-содержащих липосом с концентрацией ПЭГ-ДСГ-липидов 10 мол.%, где композиции испытывали на мышах линии C57BL6. Липосомы содержали следующие молярные соотношения: 50/10/30/10 МСЗ/ДСФХ/холестерин/ПЭГ-ДСГ. Там, где добавляли 0,5% GalNAc3-ПЭГ, соответствующее количество ПЭГ-ДСГ снижали до 9,5%.

План эксперимента.

Животные: C57BL6.

Всего: 36.

Ввод. об. (мкл): различный, в зависимости от массы.

Таблица 12

Группа	Размер группы	Мишень	siРНК	Конц. (мг/мл)	Ввод. об. (мкл/г)	Доза (мг/кг)	Носитель
1	4				10		PBS
2	4	FVII	1661	0,5	10	5,00	50/10/30/10
3	4	FVII	1661	0,25	10	2,50	50/10/30/10
4	4	FVII	1661	0,125	10	1,25	50/10/30/10
5	4	FVII	1661	0,0625	10	0,625	50/10/30/10
6	4	FVII	1661	0,5	10	5	50/10/30/9,5 с 0,5% GalNAc-липидом
7	4	FVII	1661	0,25	10	2,50	50/10/30/9,5 с 0,5% GalNAc
8	4	FVII	1661	0,125	10	1,25	50/10/30/9,5 с 0,5% GalNAc
9	4	FVII	1661	0,0625	10	0,63	50/10/30/9,5 с 0,5% GalNAc

На фиг. 5 показаны эффекты, при которых усиление ПЭГ-экранирования подавляет не-GalNAc-опосредованный сайленсинг у мышей линии C57BL6. Это продемонстрировано у мышей линии C57BL6 для концентраций ПЭГ как 5%, так и 10%. Включение C₁₈-ПЭГ (т.е. ПЭГ-ДСГ) в концентрации 10 мол.% эффективно ингибирует сайленсинг, и этот эффект может быть преодолен при помощи замены 0,5 мол.% ПЭГ-липида на эквивалентное количество GalNAc-липида (т.е. GalNAc3-ПЭГ-ДСГ формулы III). Следовательно, усиление ПЭГ-экранирования (например, с 5 до 10 мол.%), по-видимому, подавляет не-GalNAc-опосредованный сайленсинг, а также общую эффективность.

Схожие эксперименты также были проведены на крысах, при этом ПЭГ-липид (тоже ПЭГ-ДСГ) включали в липосомы в двух концентрациях - 5 и 10 мол.%. В табл. 13 представлены экспериментальные параметры способов, включавших применение МСЗ-содержащих липосом с 5% концентрацией ПЭГ-липидов, где композиции испытывали на крысах. Липосомы содержали следующие молярные соотношения: 50/10/35/5 МСЗ/ДСФХ/холестерин/ПЭГ-ДСГ. Там, где добавляли 0,5% GalNAc3-ПЭГ, соответст-

вующее количество ПЭГ-ДСГ снижали до 4,5%.

План эксперимента.

Животные: крысы линии Спрег-Доули.

Всего: 36.

Ввод. об. (мкл): инъекция ударной дозы вещества.

Таблица 13

Группа	Размер группы	Мишень	siРНК	Конц. (мг/мл)	Ввод. об. (мкл/г)	Доза (мг/кг)	Носитель
1	4				5		PBS
2	4	FVII	1661	0,2	5	1,00	50/10/35/5
3	4	FVII	1661	0,1	5	0,50	50/10/35/5
4	4	FVII	1661	0,05	5	0,25	50/10/35/5
5	4	FVII	1661	0,025	5	0,125	50/10/35/5
6	4	FVII	1661	0,2	5	1,00	50/10/35/4,5 с 0,5% GalNAc-липидом
7	4	FVII	1661	0,1	5	0,50	50/10/35/4,5 с 0,5% GalNAc-липидом
8	4	FVII	1661	0,05	5	0,25	50/10/35/4,5 с 0,5% GalNAc-липидом
9	4	FVII	1661	0,025	5	0,125	50/10/35/4,5 с 0,5% GalNAc-липидом

В табл. 14 представлены экспериментальные параметры способов, включавших применение МСЗ-содержащих липосом с 10% концентрацией ПЭГ-липидов, где композиции испытывали на крысах. Липосомы содержали следующие молярные соотношения: 50/10/30/10 МСЗ/ДСФХ/холестерин/ПЭГ-ДСГ. Там, где добавляли 0,5% GalNAc3-ПЭГ, соответствующее количество ПЭГ-ДСГ снижали до 9,5%.

План эксперимента.

Животные: Спрег-Доули.

Всего: 36.

Ввод. об. (мкл): инъекция ударной дозы вещества.

Таблица 14

Группа	Размер группы	Мишень	siРНК	Конц. (мг/мл)	Ввод. об. (мкл/г)	Доза (мг/кг)	Носитель
1	4				5		PBS
2	4	FVII	1661	1	5	5,00	50/10/30/10
3	4	FVII	1661	0,5	5	2,50	50/10/30/10
4	4	FVII	1661	0,25	5	1,25	50/10/30/10
5	4	FVII	1661	0,125	5	0,625	50/10/30/10
6	4	FVII	1661	1	5	5,00	50/10/30/9,5 с 0,5% GalNAc-липидом
7	4	FVII	1661	0,5	5	2,50	50/10/30/9,5 с 0,5% GalNAc-липидом
8	4	FVII	1661	0,25	5	1,25	50/10/30/9,5 с 0,5% GalNAc-липидом
9	4	FVII	1661	0,125	5	0,625	50/10/30/9,5 с 0,5% GalNAc-липидом

На фиг. 6 показаны результаты для МСЗ-композиций, содержащих С₁₈ ПЭГ в количестве 5 мол.% и 10 мол.%, вводимых крысам в указанных дозировках. Композиции, содержащие 10 мол.% ПЭГ-ДСГ, демонстрируют незначительный уровень сайленсинга в испытанных концентрациях (0,625-5 мг/кг) у крыс. Однако включение 0,5 мол.% GalNAc3-ПЭГ-ДСГ формулы III (т.е. замена 0,5 мол.% С₁₈-ПЭГ),

восстанавливает эффект нокдауна FVII. Следовательно, при сравнении с данными для мышей у крыс композиции с более высоким экранированием в общем случае лучше сохраняют эффективность, что видно по разнице результатов для концентраций 5 и 10 мол.% ПЭГ.

Пример 10. Оценка вариаций мольного процента компонентов МС3-содержащих липосомных композиций с включением или без включения 0,5 мол.% GalNAc3-ПЭГ-ДСГ.

Для определения эффективности МС3-содержащих липосом, имеющих различный мольный процент компонентов, с добавлением или без добавления GalNAc3-ПЭГ-ДСГ, приготовили и испытали на мышцах линии C57BL6, в существенной степени как описано в примере 2 выше, следующие липосомные композиции. Компоненты, указанные в таблице, представлены в следующем порядке: МС3/ДСФХ/холестерин/ПЭГ-ДСГ. Там, где добавляли 0,5% GalNAc3-ПЭГ, соответствующее количество ПЭГ-ДСГ снижали до 4,5%, как показано в табл. 15.

Животные: C57BL6.

Всего: 33.

Ввод. об. (мкл): различный, в зависимости от массы.

Таблица 15

Группа	Размер группы	Мишень	siРНК	Конц. (мг/мл)	Ввод. об. (мкл/г)	Доза (мг/кг)	Носитель
1	3				10		PBS
2	3	FVII	1661	0,1	10	1,00	50/10/35/5
3	3	FVII	1661	0,1	10	1,00	50/10/35/4,5 с 0,5% GalNAc-липидом
4	3	FVII	1661	0,1	10	1,00	40/15/40/5
5	3	FVII	1661	0,1	10	1,00	40/15/40/4,5 с 0,5% GalNAc-липидом
6	3	FVII	1661	0,1	10	1,00	30/25/40/5
7	3	FVII	1661	0,1	10	1,00	30/25/40/4,5 с 0,5% GalNAc-липидом
8	3	FVII	1661	0,1	10	1,00	20/35/40/5
9	3	FVII	1661	0,1	10	1,00	20/35/40/4,5 с 0,5% GalNAc-липидом

Как показано на фиг. 7, добавление GalNAc к липосомным композициям усиливает сайленсинг FVII каждой композиции, т.е. где МС3 присутствует в количестве 50, 40 и 30 мол.%.

Пример 11. Эффективность МС3- и GalNAc-содержащих липосом в мышцах дикого типа (WT) и нокаутных по гену ASGPR.

Для проверки роли ASGPR в эффективности различных липосомных композиций, мышам дикого типа и нокаутным по гену ASGPR вводили МС3-липосомы, содержащие композицию AD-1661 siРНК в дозе 3, 1 и 0,3 мг/кг, как описано в примере 1. Компоненты, указанные в таблице, представлены в следующем порядке: МС3/ДСФХ/холестерин/ПЭГ-ДСГ. Там, где добавляли 0,5% GalNAc3-ПЭГ, соответствующее количество ПЭГ-ДСГ снижали до 9,5%, как показано в табл. 16.

План эксперимента.

Животные: C57BL6 и нокаутные по гену ASGPR.

Всего: 25 + 15.

Ввод. об. (мкл): различный, в зависимости от массы.

Таблица 16

Группа	Размер группы	Мишень	siРНК	Конц. (мг/мл)	Ввод. об. (мкл/г)	Доза (мг/кг)	Носитель
1	5				10		PBS
2	5	FVII	1661	0,3	10	3,00	50/10/30/10
3	5	FVII	1661	0,3	10	3,00	50/10/30/9,5 с 0,5% GalNAc-липидом
4	5	FVII	1661	0,1	10	1,00	50/10/30/9,5 с 0,5% GalNAc-липидом
5	5	FVII	1661	0,03	10	0,300	50/10/30/9,5 с 0,5% GalNAc-липидом
6	5				10		PBS
7	5	FVII	1661	0,3	10	3,00	50/10/30/10
8	5	FVII	1661	0,3	10	3,00	50/10/30/9,5 с 0,5% GalNAc-липидом

На фиг. 8 приведены результаты данных экспериментов, демонстрирующие, что для композиций, содержащих C_{18} ПЭГ, восстановление нокдауна FVII путем включения липида GalNAc3-ПЭГ-ДСГ не происходит при введении линии мышей, дефицитных по рецептору асиалогликопротеинов (ASGPR), который является предполагаемым рецептором для направленного действия остатка GalNAc.

Пример 12. Синтез олигонуклеотидов.

Синтез.

Олигонуклеотиды синтезируют на синтезаторе АКТАoligopilot. Для синтеза олигонуклеотидов использовали имеющиеся в продаже стеклянный носитель с контролируемым размером пор (dT-CPG, 500A, Prime Synthesis) и РНК-фосфорамидиты со стандартными защитными группами, 5'-О-диметокситритил N^6 -бензоил-2'-t-бутилдиметилсилил-аденозин-3'-О-N,N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфорамидит, 5'-О-диметокситритил-N⁴-ацетил-2'-t-бутилдиметилсилил-цитидин-3'-О-N,N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфорамидит, 5'-О-диметокситритил-N²-изобутирил-2'-t-бутилдиметилсилил-гуанозин-3'-О-N,N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфорамидит и 5'-О-диметокситритил-2'-t-бутилдиметилсилил-уридин-3'-О-N,N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфорамидит (Pierce Nucleic Acids Technologies), 2'-F-фосфорамидиты, 5'-О-диметокситритил-N⁴-ацетил-2'-фторо-цитидин-3'-О-N,N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфорамидит и 5'-О-диметокситритил-2'-фторо-уридин-3'-О-N,N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфорамидит, приобретенные у компании Promega. Все фосфорамидиты применяют в концентрации 0,2 М в ацетонитриле (CH_3CN), за исключением гуанозина, который применяют в концентрации 0,2 М в 10% ТГФ/АНС (об.%). Используют время присоединения/рециклирования 16 мин. Активатором является 5-этилтиотетразол (0,75 М, American International Chemicals); для окисления группы РО используют смесь йод/вода/пиридин и для окисления группы PS используют PADS (2%) в 2,6-лутидин/ацетонитрил (1:1 по объему).

Конъюгированные по 3'-концу с лигандом цепи синтезируют с применением твердого носителя, содержащего соответствующий лиганд. Например, включение холестеринной единицы в последовательность производят из гидроксипропинол-холестерин-фосфорамидита. Холестерин соединяют с транс-4-гидроксипропинолом через 6-аминогексаноатную связь с получением остатка гидроксипропинол-холестерина. Меченые по 5'-концу Cy-3 и Cy-5,5 (флуорофором) siРНК синтезируют из соответствующего Quasar-570 (Cy-3)-фосфорамидита, приобретенного у компании Biosearch Technologies. Конъюгацию лигандов с 5'-концом и во внутренней позиции проводят с помощью соответствующим образом защищенных стандартных блоков лиганд-фосфорамидит. Продолжительное, в течение 15 мин, присоединение 0,1 М раствора фосфорамидита в безводном CH_3CN в присутствии 5-(этилтио)-1Н-тетразольного активатора к олигонуклеотиду, связанному с твердым носителем. Окисление межнуклеотидного фосфита до фосфата проводят с применением стандартной смеси йода с водой, как указано (1), или обработкой смесью трет-бутила гидропероксид/ацетонитрил/вода (10:87:3) со временем ожидания для окисления конъюгированного олигонуклеотида 10 мин. Фосфоротиоат вводят окислением фосфита до фосфоротиоата с применением серо-переносающего реагента, такого как DDTT (приобретенный у компании AM Chemicals), PADS и/или Бекаже реагента. Холестерин-фосфорамидит синтезируют самостоятельно и применяют в концентрации 0,1 М в дихлорметане. Время присоединения для холестерин-фосфорамидита составляет 16 мин.

Удаление защитных групп I (удаление защитных групп с азотистых оснований).

После завершения синтеза носитель перемещают в стеклянную колбу емкостью 100 мл (VWR). Олигонуклеотид отщепляют от носителя с одновременным удалением защитных групп с оснований и

mПЭГ₂₀₀₀-1,2-ди-О-алкил-sn3-карбомилглицерид.

Получение соединения 4a (ПЭГ-ДМГ): 1,2-Ди-О-тетрадецил-sn-глицерид 1a (30 г, 61,80 ммоль) и N,N'-сукцинимидилкарбонат (DSC, 23,76 г, 1,5 экв.) поместили в дихлорметан (DCM, 500 мл) и перемешивали, держа в смеси льда с водой. Триэтиламин (25,30 мл, 3 экв.) добавили в перемешиваемый раствор и после этого оставили реакционную смесь перемешиваться в течение ночи при температуре окружающей среды. За развитием реакции следили с помощью ТСХ. Реакционную смесь разбавили DCM (400 мл) и промыли органический слой водой (2 раза по 500 мл), водным раствором NaHCO₃ (500 мл), с последующим стандартным исследованием.

Полученный осадок высушили при температуре окружающей среды при высоком вакууме в течение ночи. После высушивания полученный таким образом грубый карбонат 2a растворили в дихлорметане (500 мл) и перемешивали в ледяной бане. К перемешиваемому раствору в атмосфере аргона добавили mПЭГ₂₀₀₀-NH₂ (3, 103,00 г, 47,20 ммоль, приобретенный у NOF Corporation, Япония) и безводный пиридин (80 мл, в избытке). В некоторых вариантах воплощения метокси-(ПЭГ)_x-амин имел значение x от 45 до 49, предпочтительно 47-49 и более предпочтительно 49. После этого оставили реакционную смесь перемешиваться в течение ночи при температуре окружающей среды. Растворители и летучие соединения удалили под вакуумом и осадок растворили в DCM (200 мл) и нанесли на колонку силикагеля, упакованного в этилацетат. Колонку сначала элюировали этилацетатом и после этого - градиентом 5-10% метанола в дихлорметане для получения требуемого ПЭГ-липида 4a в виде белого сухого вещества (105,30 г, 83%).

¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц) δ = 5,20-5,12 (m, 1H), 4,18-4,01 (m, 2H), 3,80-3,70 (m, 2H), 3,70-3,20 (m, -O-CH₂-CH₂-O-, ПЭГ-CH₂), 2,10-2,01 (m, 2H), 1,70-1,60 (m, 2H), 1,56-1,45 (m, 4H), 1,31-1,15 (m, 48H), 0,84 (t, J=6,5 Гц, 6H).

Обнаруженный диапазон масс-спектра: 2660-2836.

Получение 4b: 1,2-Ди-О-гексадецил-sn-глицерид 1b (1,00 г, 1,848 ммоль) и DSC (0,710 г, 1,5 экв.) поместили вместе в дихлорметан (20 мл) и охладили до 0°C в смеси льда с водой. Добавили триэтиламин (1,00 мл, 3 экв.) и оставили перемешиваться в течение ночи. За развитием реакции следили с помощью ТСХ, разбавили DCM, промыли водой (2 раза), раствором NaHCO₃ и высушили над натрия сульфатом. Растворители удалили при пониженном давлении и осадок 2b хранили под высоким вакуумом в течение ночи. Это соединение применяли непосредственно для проведения следующей реакции без дополнительной очистки. mПЭГ₂₀₀₀-NH₂ 3 (1,50 г, 0,687 ммоль, приобретенный у NOF Corporation, Япония) и соединение 2b, полученное на предыдущем этапе (0,702 г, 1,5 экв.), растворили в дихлорметане (20 мл) в атмосфере аргона. Реакционную смесь охладили до 0°C. Добавили пиридин (1 мл, в избытке) и перемешивали в течение ночи. За развитием реакции следили с помощью ТСХ. Растворители и летучие соединения удалили под вакуумом и осадок очистили хроматографией (элюировали сперва этилацетатом, потом градиентом 5-10% MeOH/DCM) для получения требуемого соединения 4b в виде белого сухого вещества (1,46 г, 76%).

¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц) δ = 5,17 (t, J=5,5 Гц, 1H), 4,13 (dd, J=4,00 Гц, 11,00 Гц, 1H), 4,05 (dd, J=5,00 Гц, 11,00 Гц, 1H), 3,82-3,75 (m, 2H), 3,70-3,20 (m, -O-CH₂-CH₂-O-, ПЭГ-CH₂), 2,05-1,90 (m, 2H), 1,80-1,70 (m, 2H), 1,61-1,45 (m, 6H), 1,35-1,17 (m, 56H), 0,85 (t, J=6,5 Гц, 6H).

Обнаруженный диапазон масс-спектра: 2716-2892.

Получение 4c: 1,2-Ди-О-октадецил-sn-глицерид 1c (4,00 г, 6,70 ммоль) и DSC (2,58 г, 1,5 экв.) поместили вместе в дихлорметан (60 мл) и охладили до 0°C в смеси льда с водой. Добавили триэтиламин (2,75 мл, 3 экв.) и оставили перемешиваться в течение ночи. За развитием реакции следили с помощью ТСХ, разбавили DCM, промыли водой (2 раза), раствором NaHCO₃ и высушили над натрия сульфатом. Растворители удалили при пониженном давлении и осадок хранили под высоким вакуумом в течение ночи. Это соединение применяли непосредственно для проведения следующей реакции с дополнительной очисткой. mПЭГ₂₀₀₀-NH₂ 3 (1,50 г, 0,687 ммоль, приобретенный у NOF Corporation, Япония) и соединение 2c, полученное на предыдущем этапе (0,760 г, 1,5 экв.), растворили в дихлорметане (20 мл) в атмосфере аргона. Реакционную смесь охладили до 0°C. Добавили пиридин (1 мл, в избытке) и перемешивали в течение ночи. За развитием реакции следили с помощью ТСХ. Растворители и летучие соединения удалили под вакуумом и осадок очистили хроматографией (элюировали сперва этилацетатом, потом градиентом 5-10% MeOH/DCM) для получения требуемого соединения 4c в виде белого сухого вещества (0,92 г, 48%).

¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц) δ = 5,22-5,15 (m, 1H), 4,16 (dd, J=4,00 Гц, 11,00 Гц, 1H), 4,06 (dd, J=5,00 Гц, 11,00 Гц, 1H), 3,81-3,75 (m, 2H), 3,70-3,20 (m, -O-CH₂-CH₂-O-, ПЭГ-CH₂), 1,80-1,70 (m, 2H), 1,60-1,48 (m, 4H), 1,31-1,15 (m, 64H), 0,85 (t, J=6,5 Гц, 6H).

Обнаруженный диапазон масс-спектра: 2774-2948.

Пример 14. Общий протокол для проведения экстразии.

Липиды (катионный липид формулы I, ДСФХ, холестерин, ДМГ-ПЭГ) растворяют и смешивают в этаноле в соответствии с требуемым молярным соотношением. Липосомы формируют с применением способа этанольной инъекции, при котором смешанные липиды добавляют в буферный раствор натрия

ацетата при pH 5,2. Это приводит к спонтанному образованию липосом в 35% этаноле. Липосомы экстрадируют через 0,08 мкм поликарбонатную мембрану по меньшей мере 2 раза. Исходный раствор siРНК приготавливали в растворе натрия ацетата с 35% этанолом и добавили для загрузки липосом. Раствор комплексов siРНК-липосомы инкубировали при 37°C в течение 30 мин и после этого разбавили. Удалили этанол и заменили его буферным раствором PBS с помощью диализа или тангенциальной поточной фильтрации.

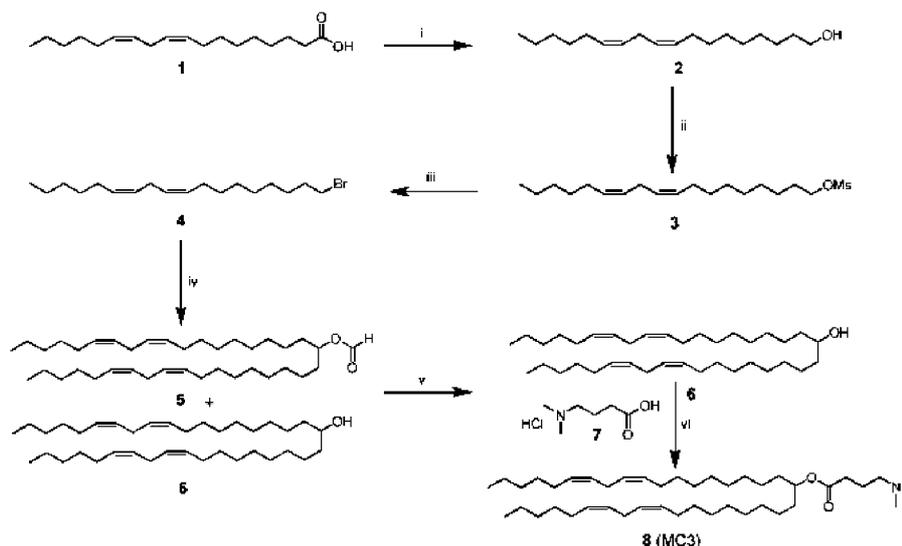
Пример 15. Общий протокол для проведения поточного смешивания.

Приготавливают два отдельных индивидуальных исходных раствора - один содержащий липид и другой - siРНК. Исходный раствор липида, содержащий катионный липид формулы I, ДСФХ, холестерин и ПЭГ-липид, приготавливают растворением в 90% этаноле. Остальные 10% составляет цитратный буферный раствор с низким значением pH. Концентрация исходного раствора липида равна 4 мг/мл. Диапазон значения pH этого цитратного буферного раствора может составлять pH 3-5, в зависимости от типа применяемого фузогеинного липида. SiРНК также растворяют в цитратном буферном растворе в концентрации 4 мг/мл. Для малых масштабов приготавливают по 5 мл каждого исходного раствора.

Исходные растворы полностью прозрачны, и липиды должны быть полностью растворены перед объединением с siРНК. Поэтому исходные растворы можно нагревать для полного растворения липидов. Применяемые в этом способе siРНК могут являться немодифицированными или модифицированными олигонуклеотидами и могут быть конъюгированы с липофильными остатками, такими как холестерин.

Индивидуальные исходные растворы объединяют, нагнетая насосом каждый раствор в Т-образный тройник. Для одновременного контроля начала и остановки двух потоков применяют насос с двумя каналами Уотсона-Марлоу. Полипропиленовую трубку диаметром 1,6 мм дополнительно меняют на меньшую по диаметру трубку 0,8 мм для увеличения линейной скорости потока. Полипропиленовые трубки (внутренний диаметр = 0,8 мм) присоединяют с каждой стороны Т-образного тройника. Полипропиленовая трубка имеет прямой конец диаметром 1,6 мм, с результирующим объемом 4,1 мм³. Каждый большой конец (1,6 мм) полипропиленовой трубки помещают в пробирки, содержащие либо исходный раствор солюбилизованного липида, либо солюбилизованную siРНК. После Т-образного тройника помещают одну трубку, по которой будет вытекать объединенный поток. После этого трубку помещают в контейнер с 2x объемом PBS. Раствор PBS быстро перемешивается. Скорость потока для насоса устанавливают на уровне 300 об/мин или 110 мл/мин. Этанол удаляют и заменяют на PBS с помощью диализа. После этого липидные композиции концентрируют с применением центрифугирования или диафильтрации до соответствующей рабочей концентрации.

Пример 16. Синтез [6Z,9Z,28Z,31Z]-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)-бутаноата] (катионного липида формулы I или МСЗ)



i) Vtride/тетрагидрофуран; ii) MsCl, Et₃N, диметиламинопиридин/дихлорметан; iii) LiBr/диметилформамид; iv) Mg, HCOOEt; v) NaOH, тетрагидрофуран, вода; vi) EDCI, диметиламинопиридин, диизопропилэтиламин.

Получение спиртового соединения 2.

В чистый, сухой стеклянный реактор емкостью 200 л, оснащенный вводом аргона и термокарманом, загрузили 60 л тетрагидрофурана и 5,73 кг (20,4 моль) линолевой кислоты. Содержимое реактора охладили до температуры ниже 0°C с помощью бани со смесью ацетона и сухого льда. К этому охлажденному раствору медленно добавили 13,8 л Vitride в толуоле (60% мас./об.), поддерживая внутреннюю температуру реакционной смеси на уровне ниже 0°C (примечание: первоначальное добавление vitride было экзотермическим процессом, и наблюдалось пенообразование. Пенообразование прекратилось че-

рез 15 мин после начала добавления). Добавление Vitride заняло 3 ч 45 мин. По завершении добавления реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 2 ч. Отбрали аликвоту и остановили реакцию с применением насыщ. Na_2SO_4 , полученный таким образом неочищенный продукт анализировали ТСХ на присутствие исходной кислоты. ТСХ показала завершение реакции, и реакционную смесь снова охладили до температуры ниже 0°C примерно за 45 мин. Насыщенный раствор натрия сульфата (полученный растворением 1,1 кг натрия сульфата в 1,5 л воды) медленно добавляли в реакционную смесь в течение 45 мин. По завершении этого добавления добавляли 25 л этилацетата в течение 30 мин при перемешивании. Полученную реакционную смесь профильтровывали через слой целита в течение 45 мин и промыли слой целита дополнительным объемом 17 л этилацетата для полного удаления продукта из осадка. Объединенные органические фракции сконцентрировали при пониженном давлении. Осадок растворили в 15 л этилацетата и промыли органический слой водой (2 раза по 7 л) и высушили над натрия сульфатом (1,1 кг). После фильтрации органический слой сконцентрировали при пониженном давлении и высушили под высоким вакуумом для получения продукта, линолеилового спирта, в виде маслянистой жидкости. Примерный выход=5,5 кг (теоретический выход = 5,43 кг). Данный продукт применяли без дополнительной очистки на следующем этапе.

Способ получения линолеилмезилата 3.

В чистый, сухой полностью стеклянный реактор емкостью 200 л, оснащенный вводом аргона и термокарманом, загрузили 45 л дихлорметана и 5,5 кг неочищенного продукта, полученного на этапе 1. К этому раствору медленно добавили 11,5 л триэтиламина, а после этого - 0,252 кг (2,0 моль) диметиламинопиридина. Раствор охладили до -10°C с помощью смеси сухого льда и ацетона и к этой охлажденной реакционной массе добавляли по капле в течение 3 ч раствор мезилхлорида (3,2 л, 41,3 моль) в дихлорметане (10 л), при этом поддерживая температуру ниже 0°C . По завершении добавления реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч, после чего ТСХ (5% EtOAc в дихлорметане; окраска фосфорномолибденовой кислотой) реакционной смеси показала полное исчезновение исходного спирта. К реакционной смеси добавили 17 л охлажденной во льду воды и провели разделение слоев. Верхний водный слой еще раз промыли 10 л дихлорметана и провели разделение слоев. Объединенные органические слои промыли 2 раза по 10 л разбавленной хлористоводородной кислотой (полученной смешиванием 2 л конц. HCl с 18 л воды, очищенной методом обратного осмоса) 2 раза по 7,5 л водой и 10 л соляного раствора (полученного растворением 11 кг NaCl в 10 л воды, очищенной методом обратного осмоса). Органический слой отделили, высушили над Na_2SO_4 (2,75 кг) и профильтровали. Органический слой выпаривали при пониженном давлении и сушили под вакуумом для получения неочищенного мезилата в виде светло-желтой маслянистой жидкости. Примерный выход = 7,1 кг (теоретический выход = 7,1 кг). Данный материал применяли без дополнительной очистки на следующем этапе.

^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ = 5,42-5,21 (m, 4H), 4,20 (t, 2H), 3,06 (s, 3H), 2,79 (t, 2H), 2,19-2,00 (m, 4H), 1,90-1,70 (m, 2H), 1,06-1,18 (m, 18H), 0,88 (t, 3H).

^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ = 130,76, 130,54, 128,6, 128,4, 70,67, 37,9, 32,05, 30,12, 29,87, 29,85, 29,68, 29,65, 29,53, 27,72, 27,71, 26,15, 25,94, 23,09, 14,60.

Масс-спектрометрия. Расчетная молекулярная масса для $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_3\text{S}$ 344,53, экспериментально определенная 343,52 (M-H).

Получение линолеилбромиды 4.

В чистый, сухой полностью стеклянный реактор емкостью 200 л, оснащенный вводом аргона и термокарманом, загрузили 25 л диметилформамида и 7,1 кг неочищенного продукта, полученного на этапе 2. Эту смесь охладили до -10°C с помощью смеси ацетона и сухого льда. К этой перемешиваемой смеси добавляли в течение 1,5 ч раствор лития бромида (2,7 кг, 31,0 моль) в 25 л диметилформамида, при этом поддерживая температуру реакции ниже 0°C . По завершении добавления, реакционную смесь перемешивали при 45°C в течение 18-20 ч, пока ТСХ (10% EtOAc в гексане; окраска фосфорномолибденовой кислотой) аликвоты не показала полное исчезновение исходного мезилата. Реакционную смесь добавили 70 л воды и экстрагировали 57 л гексана. Водный слой дополнительно экстрагировали 2 раза по 10 л гексана и объединенные органические слои (примерно 120 л) опять промыли 2 раза по 10 л воды и 1 раз 10 л соляного раствора (полученного растворением 14 кг натрия хлорида в 10 л воды). Полученный органический слой (120 л) высушили над натрия сульфатом (4 кг) и концентрировали при пониженном давлении для получения неочищенного продукта (6,5 кг). Неочищенный продукт очистили колоночной хроматографией с применением силикагеля 60-120 меш и гексана в качестве элюента. Концентрирование очищенного продукта дало 5,5 кг (81%, три этапа) бромида 4 в виде бесцветной жидкости.

^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ = 5,41-5,29 (m, 4H), 4,20 (d, 2H), 3,40 (t, J=7 Гц, 2H), 2,77 (t, J=6,6 Гц, 2H), 2,09-2,02 (m, 4H), 1,88-1,00 (m, 2H), 1,46-1,27 (m, 18H), 0,88 (t, J=3,9 Гц, 3H).

^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ = 130,41, 130,25, 128,26, 128,12, 34,17, 33,05, 31,75, 29,82, 29,57, 29,54, 29,39, 28,95, 28,38, 27,42, 27,40, 25,84, 22,79, 14,28.

Получение дилинолеилметанола 6.

Чистый, сухой полностью стеклянный реактор емкостью 20 л, оснащенный вводом аргона, обратным холодильником и термокарманом, дегазировали и провели продувку аргоном. В реактор загрузили

277 г (11,3 моль) активированного магния, а после этого - 1,5 л безводного эфира. Реактор снова дегазировали три раза и провели продувку аргоном. Бромид 4 (2,5 кг, 7,6 моль) растворили в 5 л безводного диэтилового эфира в атмосфере аргона и 1 л этого раствора добавили в реактор, после чего добавили 25 мл (0,35 моль) дибромометана. Содержимое реактора нагрели до 40°C с применением водяной бани (наблюдалось вскипание с последующим рефлюксом, что свидетельствовало о начале образования реактива Гриньяра). После начала реакции нагревательный элемент удалили из реактора и медленно добавляли оставшиеся 4 л бромида в течение 2 ч 30 мин, поддерживая слабый рефлюкс смеси. По завершении добавления реакцию смесь опять нагревали для достижения рефлюкса (температура бани 45°C) в течение 1 ч, после чего в аликвоте реакционной смеси остановили реакцию водой и проанализировали ТСХ (гексан, окраска фосфорномолибденовой кислотой), которая показала полное израсходование исходного бромида. Реакционную смесь охладили до температуры ниже 10°C с применением ледяной бани и добавляли раствор этилформиата (275 мл в 4 л диэтилового эфира) в диэтиловом эфире в течение 2 ч 30 мин, и по завершении добавления реакционную смесь нагрели до комнатной температуры и перемешивали в течение 1 ч. Реакционную смесь снова охладили до 10°C и медленно добавили к смеси ацетон (1,15 л), после этого добавили 7 л охлажденной на льду воды и раствор 10% серной кислоты (полученный разведением 3,4 л серной кислоты 34 л охлажденной на льду воды). Продукт экстрагировали 3 раза по 10 л диэтиловым эфиром и объединенные органические слои промыли 10 л соляного раствора и высушивали над натрия сульфатом (2 кг). Концентрирование органического слоя при пониженном давлении дало неочищенный продукт (2 кг) в виде смеси требуемого дилинолеилового спирта со следовыми количествами О-формилированного продукта. Неочищенный продукт повторно растворили в тетрагидрофуране (4 л) и загрузили в стеклянный реактор емкостью 20 л. К этому раствору добавили раствор NaOH (0,934 кг, растворенный в 8 л охлажденной на льду воды) и содержимое нагрели при 65°C в течение 18 ч, после чего ТСХ (10% эфир в гексане) показала полное превращение О-формилированного продукта в требуемый дилинолеилметанол. Реакционную смесь охладили и экстрагировали диэтиловым эфиром (3 раза по 4 л), и объединенные органические слои промыли 5 л соляного раствора и высушивали над натрия сульфатом (4 кг). Фильтрация с последующим концентрированием органического слоя дали неочищенный продукт. Полученный таким образом неочищенный продукт очистили колоночной хроматографией с применением силикагеля 60-120 меш и 4% эфира в гексане. Концентрирование фракций очищенного продукта дало очищенное соединение 6 (1,45 кг, 80%) в виде бесцветной жидкости.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ = 5,47-5,24 (m, 8H), 3,56 (dd, J=6,8, 4,2 Гц, 1H), 2,85-2,66 (m, 4H), 2,12-1,91 (m, 9H), 1,50-1,17 (m, 46H), 0,98-0,76 (m, 6H).

¹³C ЯМР (101 МГц, CDCl₃) δ 130,41, 130,37, 128,18, 128,15, 77,54, 77,22, 76,91, 72,25, 37,73, 31,75, 29,94, 29,89, 29,83, 29,73, 29,58, 29,53, 27,46, 27,43, 25,89, 25,86, 22,80, 14,30.

Получение [6Z,9Z,28Z,31Z]-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноата] МСЗ (8).

Дилинолеилметанол 6 (144 г, 272 ммоль) растворили в 1 л дихлорметана и добавили к этому раствору хлористоводородную соль диметиламиномасляной кислоты 7 (55 г, 328 ммоль) и после этого - диизопрропилэтиламин (70 мл) и диметиламинопиридин (4 г). После перемешивания в течение 5 мин при температуре окружающей среды добавили EDCI (80 г, 417 ммоль) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение ночи, после чего анализ ТСХ (силикагель, 5% MeOH в CH₂Cl₂) показал полное исчезновение исходного спиртового соединения. Реакционную смесь разбавили CH₂Cl₂ (500 мл) и промыли насыщенным раствором NaHCO₃ (400 мл), водой (400 мл) и соляным раствором (500 мл). Объединенные органические слои сушили над безводн. Na₂SO₄ и удаляли растворители в условиях вакуума. Полученный таким образом неочищенный продукт (180 г) очистили колоночной флэш-хроматографией [2,5 кг силикагеля, с применением следующих элюентов: i) колонка, упакованная 6 л 0,1% NEt₃ в дихлорметане; после загрузки ii) 4 л 0,1% NEt₃ в дихлорметане; iii) 16 л 2% MeOH - 98% 0,1% NEt₃ в дихлорметане; iv) 4 л 2,5% MeOH - 97,5% 0,1% NEt₃ в дихлорметане; v) 12 л 3% MeOH - 97% 0,1% NEt₃ в дихлорметане] для получения очищенного продукта 8 (МСЗ, 159 г, 91%) в виде бесцветной маслянистой жидкости.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 5,46-5,23 (m, 8H), 4,93-4,77 (m, 1H), 2,83-2,66 (m, 4H), 2,37-2,22 (m, 4H), 2,20 (s, 6H), 2,10-1,96 (m, 9H), 1,85-1,69 (m, 2H), 1,49 (d, J=5,4 Гц, 4H), 1,39-1,15 (m, 39H), 0,95-0,75 (m, 6H).

¹³C ЯМР (101 МГц, CDCl₃): δ 173,56, 130,38, 130,33, 128,17, 128,14, 77,54, 77,22, 76,90, 74,44, 59,17, 45,64, 34,36, 32,69, 31,73, 29,87, 29,76, 29,74, 29,70, 29,56, 29,50, 27,44, 27,41, 25,84, 25,55, 23,38, 22,78, 14,27.

EI-масс-спектрометрия (+ve): Молекулярная масса расчетная для C₄₃H₇₉NO₂ (M⁺ H)⁺: 642,6, определенная экспериментально: 642,6.

Пример 17. Получение композиции с siPHK с применением предварительно сформированных везикул.

Содержащие катионный липид частицы приготовили с применением способа предварительно сформированных везикул. Катионный липид, ДСФХ, холестерин и ПЭГ-липид солибилизировали в эта-

ноле в молярном соотношении 40/10/40/10 соответственно. Липидную смесь добавили к водному буферному раствору (50 мМ цитрат, pH 4) при перемешивании, до конечной концентрации этанола и липидов 30 об.% и 6,1 мг/мл соответственно, и дали уравниваться при комнатной температуре в течение 2 мин перед экструзией. Гидратированные липиды экструдировали через два расположенные друг над другом фильтра с размером пор 80 нм (Nuclepore) при 22°C с помощью экструдера Lipex (Northern Lipids, Ванкувер, Британская Колумбия, Канада) до достижения диаметра везикул 70-90 нм, согласно данным анализа с помощью Nicomp. Обычно для этого требовалось 1-3 прогона. В случае некоторых смесей катионных липидов, которые не образовывали маленькие везикулы, удавалось сформировать стабильные везикулы размером 70-90 нм с помощью гидратации липидной смеси буферным раствором с пониженным pH (50 мМ цитрат, pH 3) для протонирования фосфатной группы головки ДСФХ.

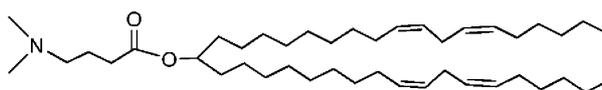
siРНК для FVII (солюбилизованную в водном растворе 50 мМ цитрата, pH 4, содержащем 30% этанол) добавляли к везикулам, предварительно уравновешенным до 35°C, со скоростью примерно 5 мл/мин при перемешивании. По достижении конечного соотношения siРНК/липид 0,06 (по массе) смесь инкубировали дополнительно в течение 30 мин при 35°C для перестройки везикул и инкапсуляции siРНК FVII. После этого удалили этанол и заменили внешний буферный раствор на PBS (155 мМ NaCl, 3 мМ Na₂HPO₄, 1 мМ KH₂PO₄, pH 7,5) с применением либо диализа, либо тангенциальной поточной диафильтрации. Конечное соотношение инкапсулированной siРНК к липиду определяли после удаления неинкапсулированной siРНК с применением центрифужных колонок для эксклюзионной хроматографии или центрифужных колонок для ионообменной хроматографии. Кривая зависимости доза-эффект, демонстрирующая % остаточного FVII в зависимости от дозы (мг/кг) приведена на фиг. 9.

Пример 18. Определение pKa катионного липида формулы I.

Значение pKa для катионного липида формулы I определяли в существенной мере, как описано в работе (Eastman et al., 1992, Biochemistry, 31:4262-4268), с применением флуоресцентного зонда 2-(p-толуидино)-6-нафталенсульфоновой кислоты (TNS), которая не флуоресцирует в воде, но приобретает заметную флуоресценцию при связывании с мембранами. Везикулы, состоящие из катионного липида/ДСФХ/холестерина/ПЭГ-с-DOMG (в молярном соотношении 40:10:40:10), разбавили до 0,1 мМ в буферных растворах (130 мМ NaCl, 10 мМ CH₃COONH₄, 10 мМ MES, 10 мМ HEPES) с различными значениями pH в диапазоне от 2 до 11. Аликвоту водного раствора TNS (до конечной концентрации 1 мкМ) добавляли к разбавленным везикулам и после 30 секундного периода уравнивания измеряли флуоресценцию TNS-содержащего раствора при длинах волн возбуждения и испускания 321 нм и 445 нм, соответственно. Значение pKa для содержащих катионный липид везикул определяли, строя график зависимости измененной величины флуоресценции от значения pH растворов и выравнивая данные по сигмоидной кривой с применением коммерческой программы для построения графиков IqogPro. Кривая титрования pKa для катионного липида формулы I представлена на фиг. 10.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Липидная композиция для доставки терапевтического агента в клетку, содержащая катионный липид формулы I



Формула I,

или его фармацевтически приемлемую соль, и терапевтический агент, причем указанный терапевтический агент представляет собой нуклеиновую кислоту, при этом нуклеиновая кислота представляет собой мРНК.

2. Липидная композиция по п.1, содержащая 40-65% катионного липида формулы I, 5-10% нейтрального липида, 25-40% стерина и 0,5-10% ПЭГ или ПЭГ-модифицированного липида.

3. Липидная композиция по п.2, в которой нейтральный липид выбран из ДСФХ, ДПФХ, ДМФХ, ПОФХ, ДОФЭ и СМ.

4. Липидная композиция по п.2, в которой стерин представляет собой холестерин.

5. Липидная композиция по п.2, в которой ПЭГ-липид представляет собой от ПЭГ-C₁₄ до ПЭГ-C₂₂, от ПЭГ-Ceg₁₄ до ПЭГ-Ceg₂₀ или ПЭГ-ДСФЭ.

6. Липидная композиция по любому из пп.1-5, полученная способом поточного смешивания.

7. Липидная композиция по п.2, содержащая 57,5% катионного липида формулы I, 7,5% нейтрального липида, 31,5% стерина и 3,5% ПЭГ или ПЭГ-модифицированного липида.

8. Липидная композиция по п.7, полученная экструзионным способом.

9. Липидная композиция по п.2, в которой соотношение липид:нуклеиновая кислота составляет от 3 до 15.

10. Липидная композиция по п.9, в которой соотношение липид:нуклеиновая кислота составляет от

5 до 13.

11. Липидная композиция по п.1, дополнительно содержащая по меньшей мере один аполипопротеин.

12. Липидная композиция по п.11, в которой аполипопротеин представляет собой ApoE, его активные полиморфные формы, изоформы, варианты и мутантные формы и фрагменты или укороченные формы.

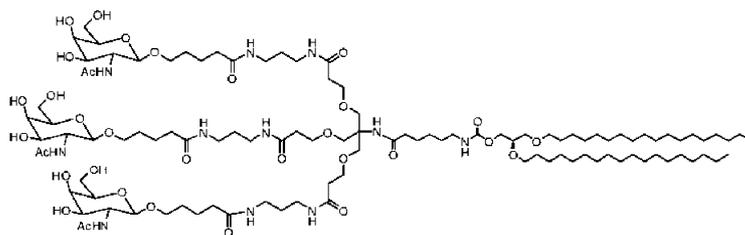
13. Липидная композиция по п.1, дополнительно содержащая нацеливающий липид.

14. Липидная композиция по п.13, в которой нацеливающий липид содержит N-ацетилгалактозамин.

15. Липидная композиция по п.14, в которой N-ацетилгалактозамин включает моно-, би- или триантенальную углеводную группу.

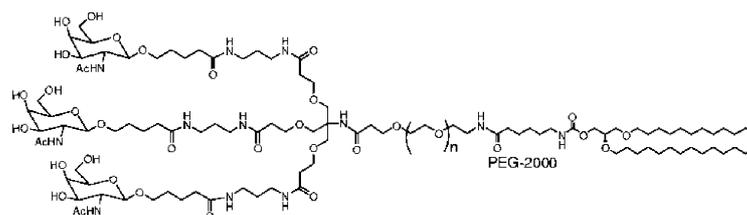
16. Липидная композиция по п.13, в которой указанный нацеливающий липид присутствует в композиции в молярном количестве от 0,001 до 5%.

17. Липидная композиция по п.13, в которой указанный нацеливающий липид представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из соединений формулы II, формулы III, формулы VI и формулы VII:



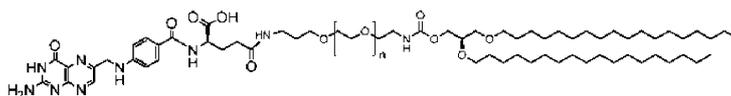
GalNAc3-ДСГ

Формула II



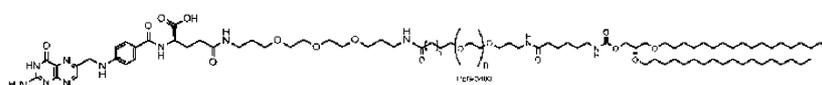
GalNAc3-ПЭГ-ДСГ

Формула III



Фолат-ПЭГ2000-ДСГ

Формула VI



Фолат-ПЭГ3400-ДСГ

Формула VII.

18. Липидная композиция по п.2, содержащая 50% катионного липида формулы I, 10% нейтрального липида, 38,5% стерина и 1,5% ПЭГ или ПЭГ-модифицированного липида.

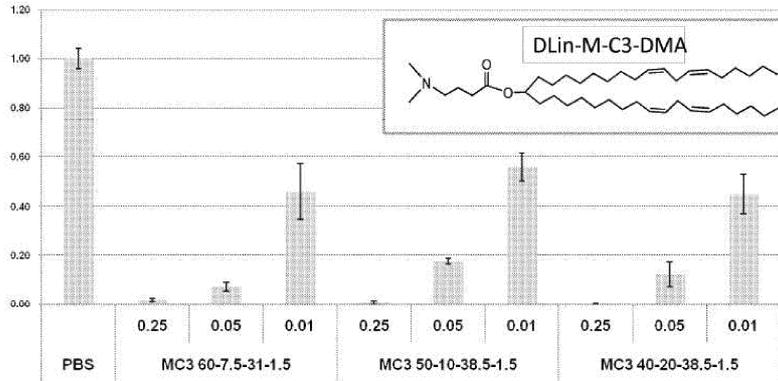
19. Липидная композиция по п.2, содержащая 50% катионного липида формулы I, 10% нейтрального липида, 35% стерина и 5% ПЭГ или ПЭГ-модифицированного липида.

20. Липидная композиция по п.2, содержащая 57,2% катионного липида формулы I, 7,1% нейтрального липида, 34,3% стерина и 1,4% ПЭГ или ПЭГ-модифицированного липида.

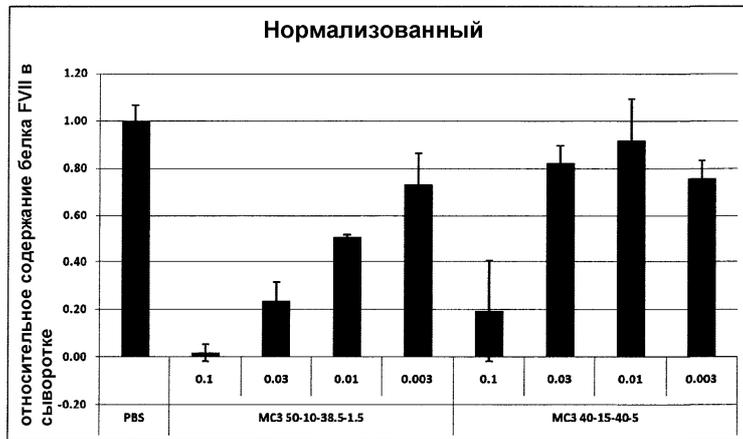
21. Способ доставки терапевтического агента в клетку, включающий введение субъекту липидной композиции по любому из пп.1-20.

DLin-M-C3-DMA: оценка различных композиций в модельной системе для исследования FVII на мышах

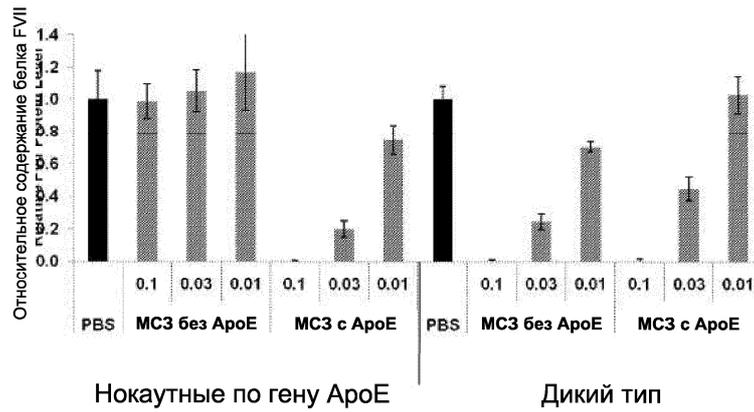
Белок FVII



Фиг. 1

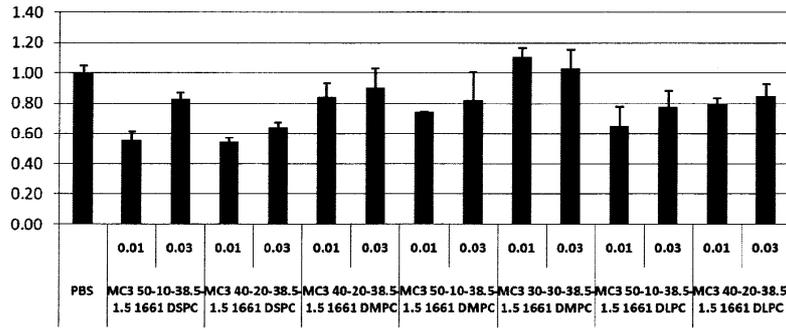


Фиг. 2

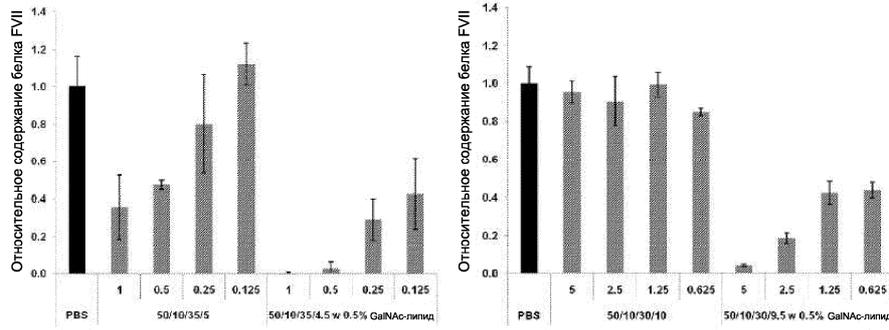


Фиг. 3

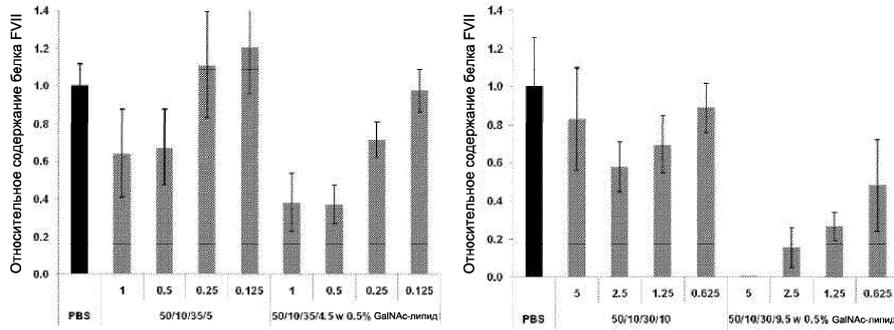
День 3_FVII нормализованный



Фиг. 4

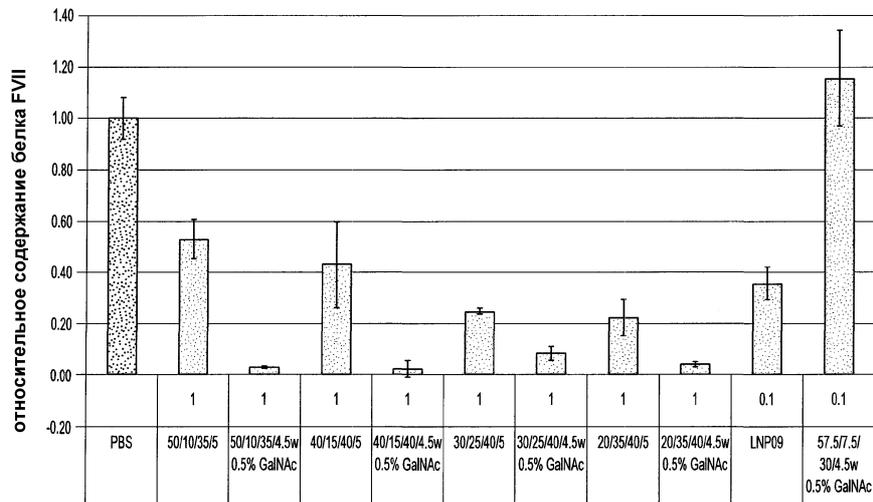


Фиг. 5

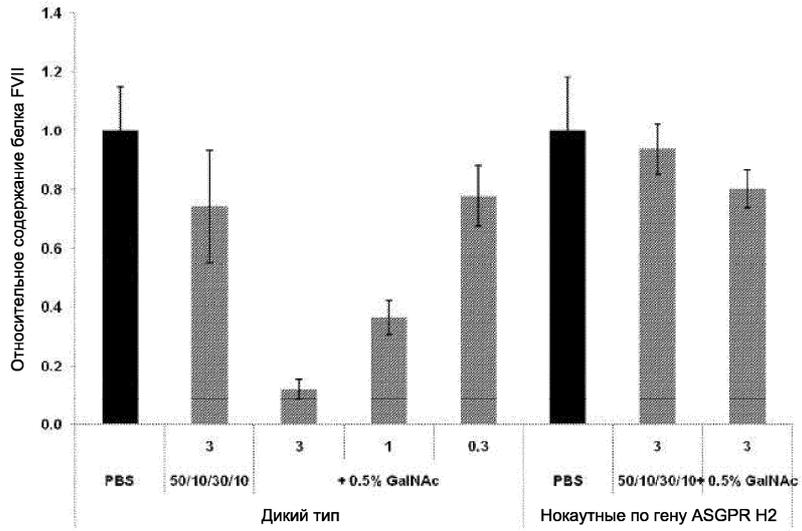


Фиг. 6

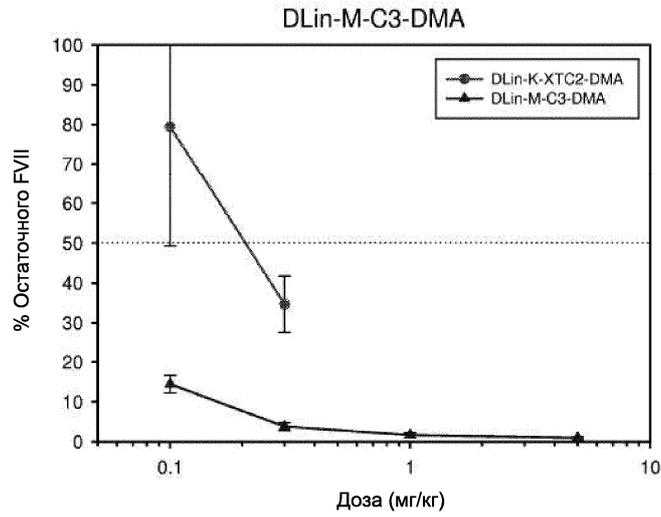
нормализованный



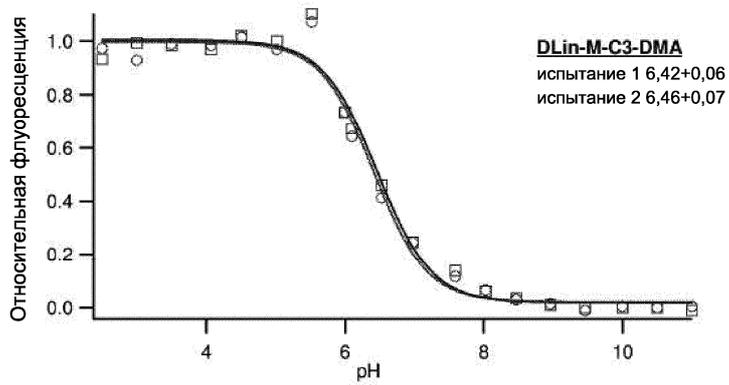
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

