

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **035438**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2020.06.15**

(51) Int. Cl. *A61K 9/127* (2006.01)  
*A61K 31/50* (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201190242**

(22) Дата подачи заявки  
**2010.05.05**

**(54) ЛИПИДНЫЕ КОМПОЗИЦИИ**

(31) **61/175,770; 61/299,291**

(32) **2009.05.05; 2010.01.28**

(33) **US**

(43) **2013.02.28**

(86) **PCT/US2010/033777**

(87) **WO 2010/129709 2010.11.11**

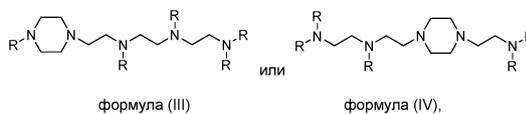
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**АРБУТУС БИОФАРМА  
КОРПОРАШН (СА)**

(72) Изобретатель:  
**Манохаран Мутиах, Раджив  
Каллантотгатил Г., Джаяраман  
Мутусами, Батлер Дэвид, Джанг  
Майкл Е. (US)**

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

(56) **US-A-6022874  
US-A1-20090023673  
US-A-5891468  
US-A1-20040009216**

(57) Изобретение относится к композиции для доставки терапевтического агента, содержащей стерол; нейтральный липид; ПЭГ или модифицированный ПЭГ липид и соединение формулы (III), (IV) или их смесь



где каждый R независимо обозначает  $\text{---Y-R}^1$  или  $\text{---R}^2$ ; где R<sup>1</sup> обозначает H; R<sup>2</sup> представляет собой C<sub>1-24</sub>алкил и Y представляет собой O.

**B1****035438****035438****B1**

### Заявляемый приоритет

Настоящая заявка претендует на приоритет заявок US 61/175770, поданной 5 мая 2009 г., и US 61/299291, поданной 28 января 2010 г., содержание каждого из которых включено сюда посредством ссылки.

### Область техники

Изобретение относится к области доставки терапевтического агента с использованием липидных частиц. В частности, изобретение предусматривает катионные липиды и липидные частицы, содержащие такие липиды, являющиеся предпочтительными для *in vivo* доставки нуклеиновых кислот, а также композиции нуклеиновая кислота-липидная частица, пригодные для *in vivo* терапевтического применения. Дополнительно, изобретение предусматривает способы получения таких композиций, а также способы введения нуклеиновых кислот в клетки с использованием таких композиций, например, для лечения различных болезненных состояний.

### Уровень техники

Терапевтические нуклеиновые кислоты включают, например, малые интерферирующие РНК (siРНК), микро-РНК (miРНК), антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы, плазмиды и иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты. Такие нуклеиновые кислоты действуют по различным механизмам. В случае siРНК или miРНК, такие нуклеиновые кислоты могут понижать регулировать внутриклеточные уровни конкретных белков с помощью процесса, названного РНК-интерференцией (РНКи). После введения siРНК или miРНК в цитоплазму клетки, такие двухцепочечные РНК-конструкты могут связываться с белком, названным RISC. Смысловая цепь siРНК или miРНК удаляется из комплекса RISC, с образованием в RISC матрицы, которая может распознавать и связывать мРНК с последовательностью, комплементарной к связанной siРНК или miРНК. После связывания комплементарной мРНК комплекс RISC расщепляет мРНК и высвобождает расщепленные цепи. РНКи может обеспечивать понижающую регуляцию конкретных белков путем нацеливания на специфическую деструкцию соответствующей мРНК, кодирующей синтез белка.

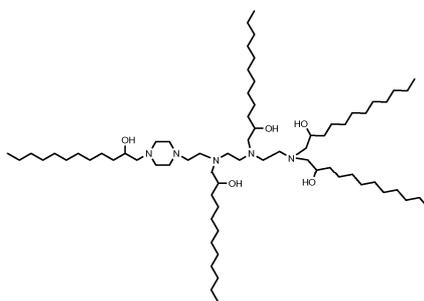
Терапевтические области применения РНКи чрезвычайно широки, поскольку могут быть синтезированы конструкты siРНК и miРНК с любой нуклеотидной последовательностью, направленной против белка-мишени. До настоящего времени, конструкты siРНК продемонстрировали способность к специфической понижающей регуляции белков-мишеней как на *in vitro*, так и *in vivo* моделях. В дополнение к этому конструкты siРНК в настоящее время проходят клинические исследования.

Однако двумя проблемами, в настоящее время стоящими перед конструктами siРНК или miРНК, являются, во-первых, их чувствительность к гидролизу нуклеазой в плазме и, во-вторых, их ограниченная способность получать доступ к внутриклеточному компартменту, где они могут связываться с RISC при системном введении в виде свободных siРНК или miРНК. Такие двухцепочечные конструкты могут быть стабилизированы путем включения в молекулу химически модифицированных нуклеотидных линкеров, например фосфотиоатных групп. Однако такие химические модификации обеспечивают только ограниченную защиту от гидролиза нуклеазой и могут снизить активность конструкта. Внутриклеточной доставке siРНК или miРНК может способствовать использование систем-носителей, таких как полимеры, катионные липосомы, или химическая модификация конструкта, например, путем ковалентного присоединения молекул холестерина. Однако требуются усовершенствованные системы доставки для повышения эффективности молекул siРНК и miРНК и уменьшение или устранение потребности в химической модификации.

Антисмысловые олигонуклеотиды и рибозимы могут также ингибировать трансляцию мРНК в белок. В случае антисмысловых конструктов, такие одноцепочечные дезоксирибонуклеиновые кислоты имеют последовательность, комплементарную мРНК белка-мишени, и могут связываться с мРНК путем спаривания оснований по Уотсону-Крику (Watson-Crick). Это связывание или предотвращает трансляцию целевой мРНК и/или инициирует деградацию мРНК-транскриптов РНКазой N. Вследствие этого антисмысловые олигонуклеотиды обладают огромным потенциалом специфичности действия (т.е., понижающая регуляция белка, ассоциированного с конкретной болезнью). До настоящего времени такие соединения продемонстрировали перспективность в нескольких *in vitro* и *in vivo* моделях, включая модели воспалительного заболевания, рака и ВИЧ (обзор Agrawal, Trends in Biotech. 14: 376-387 (1996)). Антисмысловые молекулы могут также влиять на клеточную активность путем специфической гибридизации с хромосомальной ДНК. В настоящее время проводятся клинические оценки продвинутых стадий нескольких антисмысловых лекарственных средств на человеке. Мишени таких лекарственных средств включают гены bcl2 и аполипопротеина В и продукты мРНК.

Одна из хорошо известных проблем использования терапевтических нуклеиновых кислот относится к стабильности фосфодиэфирной межнуклеотидной связи и чувствительности этого линкера к нуклеазам. Присутствие экзонуклеаз и эндонуклеаз в сыворотке приводит к быстрому гидролизу нуклеиновых кислот, содержащих фосфодиэфирные линкеры, и поэтому терапевтические нуклеиновые кислоты могут иметь очень короткое время полувыведения в сыворотке или в клетках (Zelphati O. et al., Antisense Res. Dev. 3: 323-338 (1993); и Thierry A.R. et al., pp.147-161 в Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA (Eds. Erickson, R.P. and Izant J.G.; Raven Press, NY (1992)). Терапевтические нуклеиновые кислоты,





формула (VI).

### Краткое описание фигур

Фиг. 1 представляет собой график, изображающий относительное содержание белка FVII при различных соотношениях с липидом.

Фиг. 2 представляет собой график, изображающий изменение эффекта влияния на вес тела при различных соотношениях с липидом.

Фиг. 3 представляет собой график, иллюстрирующий относительное содержание белка FVII при разных количествах катионного липида (I) и липида с низким содержанием ПЭГ.

Фиг. 4 представляет собой график, изображающий изменение эффекта влияния на вес тела при разных количествах катионного липида (I) и липида с низким содержанием ПЭГ.

Фиг. 5 представляет собой график, изображающий эффект липидной композиции, содержащей 10 разных siРНК, на 10 разных печеночных мРНК.

Фиг. 6 представляет собой график, иллюстрирующий дозависимый ответ FVII в различных AF12-содержащих липосомальных композициях.

Фиг. 7 представляет собой график, иллюстрирующий ответную реакцию на дозу для ApoE-содержащих и GalNAc3-содержащих липосомальных композиций у ApoE нокаут-мышей.

Фиг. 8 представляет собой график, иллюстрирующий относительные уровни содержания белка FVII при разных количествах AF12 у мышей WT (дикого типа) (C57Bl/6) и LDLR нокаут (KO)-мышей.

Фиг. 9а представляет собой график, иллюстрирующий относительные уровни содержания белка FVII при разных количествах AF12 в ApoE- и GalNAc3-содержащих композициях у ApoE нокаут-мышей.

Фиг. 9б представляет собой нормированный график, иллюстрирующий относительные уровни содержания белка FVII при разных количествах AF12 в ApoE и GalNAc3-содержащих композициях у мышей дикого типа.

Фиг. 10А-10В представляют собой графики, иллюстрирующие резкое снижение (KD) экспрессии Tie2 в сердце, по сравнению с экспрессией GAPDH (фиг. 10А), VEGF рецептора 2 (VEGFR2) (фиг. 10Б), и кадгерина сосудистого эпителия (VE-кадгерин) (фиг. 10В).

Фиг. 11А и 11Б представляют собой графики, иллюстрирующие резкое снижение экспрессии Tie2 в печени под действием композиций siРНК, содержащих AF-012 (фиг. 11А), но не AF-011 (фиг. 11Б).

Фиг. 12А и 12Б представляют собой графики, иллюстрирующие резкое снижение экспрессии Tie2 в печени под действием композиций siРНК, содержащих AF-012 (фиг. 12А), и активацию экспрессии VEGFR2 в ответ на композицию siРНК Tie2, содержащую AF-012 (фиг. 12Б).

Фиг. 13А и 13Б представляют собой графики, иллюстрирующие резкое снижение экспрессии Tie2 в легком под действием композиций siРНК, содержащих AF-012. Экспрессию Tie2 сравнивают с экспрессией VE-кадгерина (фиг. 13А) и VEGFR-2 (фиг. 13Б).

Фиг. 14А и 14Б представляют собой графики, иллюстрирующие резкое снижение экспрессии Tie2 в почке (фиг. 14А) и скелетной мышце (фиг. 14Б) при использовании композиций siРНК, содержащих AF-012, но не композиций, содержащих AF-011.

Фиг. 15 представляет собой график, показывающий, что siРНК Tie2 не вызывает резкого снижения генной экспрессии в гипоталамусе при использовании композиций siРНК, содержащих AF-012 или AF-011.

Фиг. 16А-Б показывают дозависимое резкое снижение экспрессии Tie2 в печени и скелетной мышце соответственно.

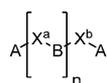
Фиг. 17А-Б показывают дозависимое резкое снижение Tie2 в селезенке и сердце, соответственно.

Фиг. 18А-Б показывают резкое снижение Tie2 в почке и жировой ткани при разных дозах, соответственно.

### Детальное описание

Изобретение предусматривает липидную композицию, раскрытую тут вследствие ее пригодности для доставки агента, например, агента на основе нуклеиновой кислоты, такого как конструктор на основе РНК, в клетку или субъекту. Способ введения животному липидных композиций, содержащих конструктор на основе РНК, и оценки экспрессии гена-мишени.

Изобретение предусматривает композицию, содержащую соединение формулы (I)



формула (I)

в которой

каждый из  $X^a$  и  $X^b$ , в каждом отдельном случае, независимо обозначает  $C_{1-6}$  алкилен;

$n$  равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

$A$  в каждом отдельном случае обозначает  $NR_2$  или циклический фрагмент, необязательно замещенный 1-3  $R$ ;

$B$  обозначает  $NR$  или циклический фрагмент, необязательно замещенный 1-2  $R$ ;

каждый  $R$  независимо обозначает  $H$ , алкил,  или  ;

при условии, что по меньшей мере один  $R$  представляет собой  или  ;

$R^1$ , в каждом отдельном случае, независимо обозначает  $H$ ,  $R^3$ , , , , , ,  или  ;

$R^2$ , в каждом отдельном случае, независимо обозначает алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, гетероалкенил или гетероалкинил; каждый из которых необязательно замещен одним или несколькими заместителями;

$R^3$ , в каждом отдельном случае, независимо обозначает алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, гетероалкенил или гетероалкинил; каждый из которых необязательно замещен одним или несколькими заместителями (например, гидрофильным заместителем);

$Y$ , в каждом отдельном случае, независимо обозначает  $O$ ,  $NR^4$  или  $S$ ;

$R^4$ , в каждом отдельном случае, независимо обозначает  $H$ , алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, гетероалкенил или гетероалкинил; каждый из которых необязательно замещен одним или несколькими заместителями;

стерол и

ПЭГ или модифицированный ПЭГ липид.

В одном варианте исполнения соединение формулы (I) содержит по меньшей мере 2 атома азота. В одном варианте исполнения соединение формулы (I) содержит по меньшей мере 3 атома азота.

В одном варианте исполнения  $n$  равен 1, 2 или 3.

В одном варианте исполнения по меньшей мере один  $A$  представляет собой циклический фрагмент. В одном варианте исполнения по меньшей мере один  $A$  представляет собой азотсодержащий циклический фрагмент. В одном варианте исполнения по меньшей мере один  $A$  представляет собой пиперидинильный или пиперизинильный фрагмент.

В одном варианте исполнения  $n$  равен 2 и по меньшей мере один  $A$  представляет собой циклический фрагмент.

В одном варианте исполнения по меньшей мере один  $B$  представляет собой циклический фрагмент. В одном варианте исполнения по меньшей мере один  $B$  представляет собой азотсодержащий циклический фрагмент. В одном варианте исполнения по меньшей мере один  $B$  представляет собой пиперидинильный или пиперизинильный фрагмент.

В одном варианте исполнения  $n$  равен 2 и по меньшей мере один  $B$  представляет собой циклический фрагмент.

В одном варианте исполнения  $X^a$  представляет собой  $C_2$  или  $C_3$  алкилен. В одном варианте исполнения  $X^b$  представляет собой  $C_2$  или  $C_3$  алкилен.

В одном варианте исполнения каждый из  $X^a$  и  $X^b$  представляет собой  $C_2$  или  $C_3$  алкилен. В одном варианте исполнения каждый из  $X^a$  и  $X^b$  представляет собой  $C_2$  алкилен.

В одном варианте исполнения  $R$ , по меньшей мере в 3 положениях, представляет собой .

В одном варианте исполнения  $n$  равен 2 или 3 и  $R$ , по меньшей мере в 3 положениях, представляет собой .

В одном варианте исполнения  $n$  равен 3 и  $R$  в 5 положениях представляет собой .

В одном варианте исполнения  $R$ , по меньшей мере в 1 положении (например, 1 или 2 положениях), представляет собой  $H$ .

В одном варианте исполнения  $Y$  представляет собой  $O$  или  $NR^4$ .

В одном варианте исполнения  $Y$  представляет собой  $O$ . В одном варианте исполнения  $Y$  представляет собой  $O$  в каждом отдельном случае.

В одном варианте исполнения  $R^1$  представляет собой  $H$ . В одном варианте исполнения  $R^1$  представ-

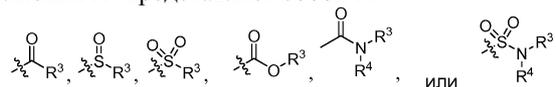
ляет собой Н в каждом отдельном случае.

В одном варианте исполнения  $R^1$  представляет собой , где  $R^3$  обозначает алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, гетероалкенил или гетероалкинил, каждый из которых необязательно замещен одним или несколькими заместителями (например, гидрофильным заместителем).

В одном варианте исполнения  $R^1$  представляет собой , и  $R^3$  - алкил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями (например, гидрофильным заместителем).

В одном варианте исполнения  $R^3$  замещен -ОН.

В одном варианте исполнения  $R^1$  представляет собой  $R^3$



где  $R^3$  - алкил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями.

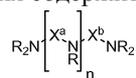
В одном варианте исполнения  $R^3$  замещен гидрофильным заместителем. В одном варианте исполнения  $R^3$  замещен -ОН.

В одном варианте исполнения  $R^2$  представляет собой алкил, алкенил или алкинил. В одном варианте исполнения  $R^2$  представляет собой алкил (например,  $C_6$ - $C_{18}$  алкил, например,  $C_8$ - $C_{12}$  алкил, например  $C_{10}$  алкил).

В одном варианте исполнения  $R$  в по меньшей мере 3 (например, по меньшей мере 4 или 5) положениях представляет собой .

В одном варианте исполнения,  $R^2$  представляет собой алкил (например,  $C_6$ - $C_{18}$  алкил, например,  $C_8$ - $C_{12}$  алкил, например,  $C_{10}$  алкил).

В одном варианте исполнения, композиция содержит соединение формулы (II)



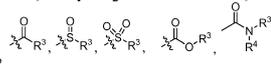
формула (II)

в которой

каждый из  $X^a$  и  $X^b$ , в каждом отдельном случае, независимо обозначает  $C_{1-6}$  алкилен;  $n$  равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

каждый  $R$  независимо обозначает Н, алкил,  или .

при условии, что по меньшей мере один  $R$  представляет собой  или ; или два  $R$ , вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют кольцо;

$R^1$ , в каждом отдельном случае, независимо обозначает Н,  $R^3$ , , где  $R^3$  необязательно замещен одним или несколькими заместителями;

$R^2$ , в каждом отдельном случае, независимо обозначает алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, гетероалкенил или гетероалкинил; каждый из которых необязательно замещен одним или несколькими заместителями;

$R^3$ , в каждом отдельном случае, независимо обозначает алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, гетероалкенил или гетероалкинил; каждый из которых необязательно замещен одним или несколькими заместителями;

$Y$ , в каждом отдельном случае, независимо обозначает О,  $NR^4$  или S;

стерол;

$R^4$ , в каждом отдельном случае, независимо обозначает Н, алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, гетероалкенил или гетероалкинил; каждый из которых необязательно замещен одним или несколькими заместителями; и

ПЭГ или модифицированный ПЭГ липид.

В одном варианте исполнения  $X^a$  представляет собой  $C_2$  или  $C_3$  алкилен. В одном варианте исполнения  $X^b$  представляет собой  $C_2$  или  $C_3$  алкилен.

В одном варианте исполнения каждый из  $X^a$  и  $X^b$  представляет собой  $C_2$  или  $C_3$  алкилен. В одном варианте исполнения каждый из  $X^a$  и  $X^b$  представляет собой  $C_2$  алкилен.

В одном варианте исполнения  $n$  равен 2 или 3.

В одном варианте исполнения  $n$  равен 3.

В одном варианте исполнения  $R$ , по меньшей мере в 3 положениях, представляет собой .

В одном варианте исполнения  $n$  равен 2 или 3 и  $R$ , по меньшей мере в 3 положениях, представляет собой .

В одном варианте исполнения  $n$  равен 3 и  $R$  в 5 положениях представляет собой .

Заявляемая композиция,  $x$ , в которой два  $R$ , вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют кольцо. В одном варианте исполнения два  $R$ , вместе с атомами азота, к которым они присоединены с образованием кольца, расположены на соседних атомах азота.

В одном варианте исполнения  $Y$  представляет собой  $O$  или  $NR^4$ . В одном варианте исполнения  $Y$  представляет собой  $O$ . В одном варианте исполнения  $Y$  представляет собой  $O$  в каждом отдельном случае.

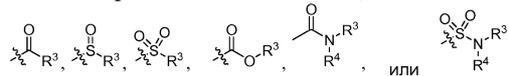
В одном варианте исполнения  $R^1$  представляет собой  $H$ . В одном варианте исполнения  $R^1$  представляет собой  $H$  в каждом отдельном случае.

В одном варианте исполнения  $R^1$  представляет собой , где  $R^3$  обозначает алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, гетероалкенил или гетероалкинил, каждый из которых необязательно замещен одним или несколькими заместителями (например, гидрофильным заместителем). В одном варианте исполнения,  $R^1$  представляет собой ,

и  $R^3$  - алкил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями (например, гидрофильным заместителем).

В одном варианте исполнения  $R^3$  замещен  $-OH$ .

В одном варианте исполнения  $R^1$  представляет собой  $R^3$ ,



где  $R^3$  - алкил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями.

В одном варианте исполнения  $R^3$  замещен гидрофильным заместителем. В одном варианте исполнения  $R^3$  замещен  $-OH$ .

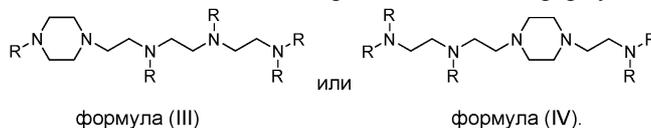
В одном варианте исполнения  $R^2$  представляет собой алкил, алкенил или алкинил. В одном варианте исполнения  $R^2$  представляет собой алкил (например,  $C_6$ - $C_{18}$  алкил, например,  $C_8$ - $C_{12}$  алкил, например  $C_{10}$  алкил).

В одном варианте исполнения  $R$  в по меньшей мере 3 (например, по меньшей мере 4 или 5) положениях представляет собой .

В одном варианте исполнения  $R^2$  представляет собой алкил (например,  $C_6$ - $C_{18}$  алкил, например  $C_8$ - $C_{12}$  алкил, например  $C_{10}$  алкил).

В одном варианте исполнения  $R$  по меньшей мере в 1 положении (например, 1 или 2 положениях) представляет собой  $H$ .

В одном варианте исполнения композиция содержит соединение формулы (III), (VI) или их смесь,



В одном варианте исполнения  $R$ , по меньшей мере в 3 положениях, представляет собой .

В одном варианте исполнения  $n$  равен 2 или 3 и  $R$ , по меньшей мере в 3 положениях, представляет собой .

В одном варианте исполнения  $n$  равен 3 и  $R$  в 5 положениях представляет собой .

В одном варианте исполнения  $Y$  представляет собой  $O$  или  $NR^4$ . В одном варианте исполнения  $Y$  представляет собой  $O$ . В одном варианте исполнения  $Y$  представляет собой  $O$  в каждом отдельном случае.

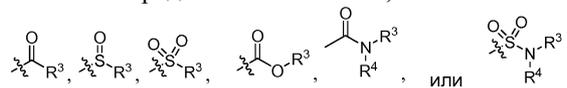
В одном варианте исполнения  $R^1$  представляет собой  $H$ . В одном варианте исполнения  $R^1$  представляет собой  $H$  в каждом отдельном случае.

В одном варианте исполнения  $R^1$  представляет собой  $\text{---}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C---R}^3$ , где  $R^3$  обозначает алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, гетероалкенил или гетероалкинил, каждый из которых необязательно замещен одним или несколькими заместителями (например, гидрофильным заместителем).

В одном варианте исполнения  $R^1$  представляет собой  $\text{---}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C---R}^3$ , и  $R^3$  - алкил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями (например, гидрофильным заместителем).

В одном варианте исполнения  $R^3$  замещен -ОН.

В одном варианте исполнения  $R^1$  представляет собой  $R^3$ ,



где  $R^3$  - алкил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями.

В одном варианте исполнения  $R^3$  замещен гидрофильным заместителем. В одном варианте исполнения  $R^3$  замещен -ОН.

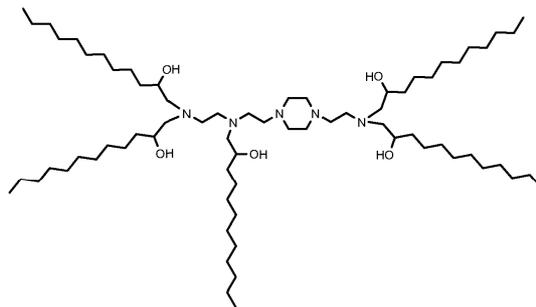
В одном варианте исполнения  $R^2$  представляет собой алкил, алкенил или алкинил. В одном варианте исполнения  $R^2$  представляет собой алкил (например,  $C_6$ - $C_{18}$  алкил, например,  $C_8$ - $C_{12}$  алкил, например  $C_{10}$  алкил).

В одном варианте исполнения  $R$  в по меньшей мере 3 (например, по меньшей мере 4 или 5) положениях представляет собой  $\text{---}\overset{\text{OH}}{\text{C}}\text{---R}^2$ .

В одном варианте исполнения  $R^2$  представляет собой алкил (например,  $C_6$ - $C_{18}$  алкил, например  $C_8$ - $C_{12}$  алкил, например  $C_{10}$  алкил). В одном варианте исполнения  $R^2$  представляет собой алкил (например,  $C_6$ - $C_{18}$  алкил, например,  $C_8$ - $C_{12}$  алкил, например,  $C_{10}$  алкил).

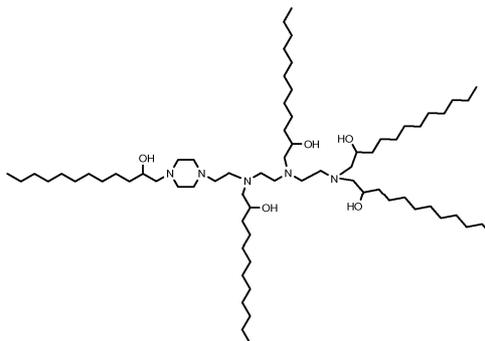
В одном варианте исполнения  $R$  в по меньшей мере 1 положении (например, 1 или 2 положениях) представляет собой H.

В одном из вариантов исполнения композиция содержит соединение формулы (V).



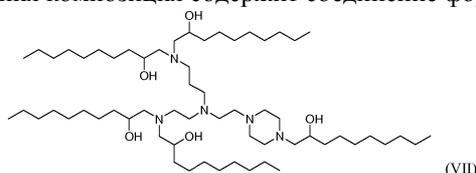
формула (V)

В одном варианте исполнения композиция содержит соединение формулы (VI).



формула (VI)

В одном варианте исполнения композиция содержит соединение формулы (VII):



(VII).

В одном варианте исполнения соединение формулы (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) или (VII) представляет собой его неорганическую или органическую соль, например его галогидводородную соль, такую как





липид:siPHK имеет значение в интервале 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 варианте исполнения соотношение липид:siPHK имеет значение в интервале от примерно 0,5:1 до примерно 12:1.

В одном аспекте липидная композиция также включает нацеливающий липид. В некоторых вариантах исполнения нацеливающий липид включает фрагмент GalNAc (т.е., N-галактозаминный фрагмент). Например, нацеливающий липид, содержащий фрагмент GalNAc, может включать материалы, раскрытые в USSN 12/328669, поданной 12/4/2008, которая целиком включена сюда посредством ссылки. Нацеливающий липид может также содержать любой другой липид (например, нацеливающий липид), известный специалистам, например, как описано в USSN 12/328669 или международной публикации № WO 2008/042973, содержание каждой из которых целиком включено сюда посредством ссылки. В некоторых вариантах исполнения нацеливающий липид включает множество фрагментов GalNAc, например два или три фрагмента GalNAc. В некоторых вариантах исполнения нацеливающий липид содержит множество, например два или три N-ацетилгалактозаминных (GalNAc) фрагмента. В некоторых вариантах исполнения липид в нацеливающем липиде представляет собой 1,2-ди-О-гексадецил-sn-глицерид (т.е., DSG). В некоторых вариантах исполнения, нацеливающий липид включает ПЭГ-фрагмент (например, ПЭГ-фрагмент, имеющий молекулярный вес, равный по меньшей мере примерно 500 Да, такой как примерно 1000, 1500, 2000 Да или больше), например нацеливающий фрагмент присоединен к липиду через ПЭГ-фрагмент.

В некоторых вариантах исполнения нацеливающий липид включает фолатный фрагмент. Например, нацеливающий липид, содержащий фолатный фрагмент, может включать материалы, раскрытые в USSN 12/328669, поданной 12/4/2008, которая целиком включена сюда посредством ссылки. В другом варианте исполнения нацеливающий липид, содержащий фолатный фрагмент, может включать соединение формулы 5.

Типичные примеры нацеливающих липидов представлены формулой L ниже:  
(Нацеливающая группа)<sub>n</sub>-L-Липид

формула L

где

нацеливающая группа представляет собой любую нацеливающую группу, известную квалифицированному специалисту и/или описанную тут (например, рецептор клеточной поверхности);

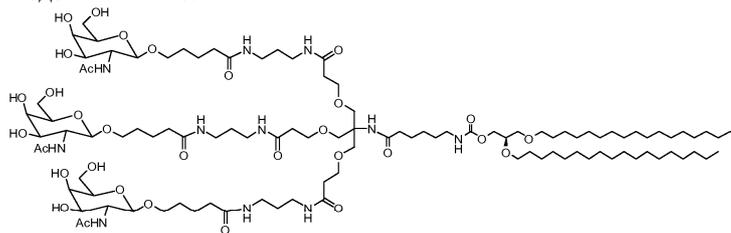
n обозначает целое число от 1 до 5 (например, 3);

L обозначает связующую группу и

липид представляет собой липид, такой как описанный тут липид (например, нейтральный липид, такой как DSG).

В некоторых вариантах исполнения связующая группа включает ПЭГ-фрагмент. В другом варианте исполнения размер ПЭГ-фрагмента может меняться в интервале молекулярных весов от примерно 1000 до примерно 20000 Да (например, от примерно 1500 до примерно 5000 Да, например, примерно 1000 Да, примерно 2000 Да, примерно 3400 или примерно 5000 Да).

В некоторых вариантах исполнения нацеливающий липид представляет собой соединение формул 2, 3, 4, 5, 6 или 7, приведенных ниже:



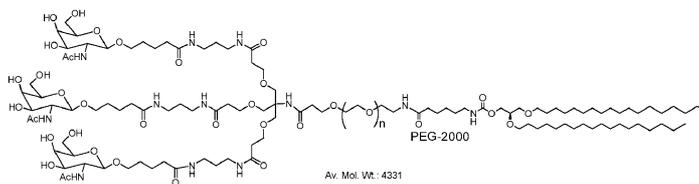
$C_{107}H_{199}N_{11}O_{32}$

Точная масса: 2150,43

Мол. вес: 2151,78

Формула 2

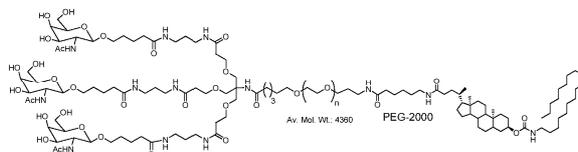
**GalNAc3-ПЭГ-DSG**



Av. Mol. Wt.: 4331

Ср. мол. вес: 4331

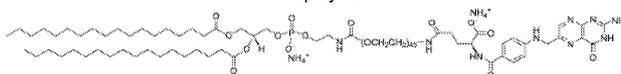
Формула 3

**GalNAc3-ПЭГ-DSG**

Ср. мол. вес: 4360

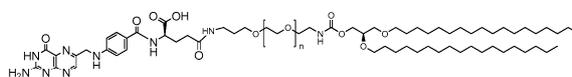
**(GalNAc)<sub>3</sub>-ПЭГ-LCO**

Формула 4

**Фолат-ПЭГ-DSPE**

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

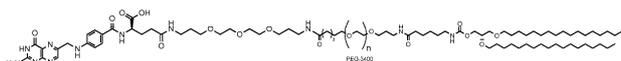
Формула 5



Мол. вес: ок. 3028

**Фолат-ПЭГ2000-DSG**

Формула 6



Мол. вес: ок. 4761

**Фолат-ПЭГ3400-DSG**

Формула 7

В некоторых вариантах исполнения нацеливающий липид присутствует 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 пересчете на молярное количество. В некоторых вариантах исполнения нацеливающий липид входит в состав описанной тут композиции.

В некоторых вариантах исполнения липидная композиция также содержит антиоксидант (например, поглотитель радикалов). Антиоксидант может присутствовать в композиции, например, в количестве от примерно 0,01 до примерно 5%. Антиоксидант может быть гидрофобным или гидрофильным (например, растворимым в липидах или растворимым в воде). В некоторых вариантах исполнения антиоксидант представляет собой фенольное соединение, например бутилгидрокситолуол, ресвератрол, кофермент Q10 или другие флавоноиды, или витамин, например витамин E или витамин C. Другие типичные примеры антиоксидантов включают липоевую кислоту, мочевую кислоту, каротин, такой как бета-каротин или ретинол (витамин A), глутатион, мелатонин, селен и убихинол.

В некоторых вариантах исполнения рецептором нацеливающего липида (например, GalNAc-содержащего липида) является асиалогликопротеиновый рецептор (т.е., ASGPR).

В одном варианте исполнения композиции по изобретению получают методом экструзии или методом смешения в потоке.

Метод экструзии (также называемый методом предварительного формования или периодическим процессом) представляет собой метод, в котором сначала готовят пустые липосомы (т.е. без нуклеиновой кислоты), а затем вводят нуклеиновую кислоту в пустые липосомы. Экструзия липосомальных композиций через мелкопористую поликарбонатную мембрану или асимметричную керамическую мембрану приводит к относительно четко определенному распределению по размерам. Типично, суспензию циклически пропускают через мембрану один или несколько раз до достижения желательного распределения по размерам липосомального комплекса. Липосомы могут экструдироваться через мембраны с последовательно уменьшающимися порами для достижения постепенного уменьшения размера липосом. В некоторых случаях образующиеся композиции липид-нуклеиновая кислота могут быть использованы без какой-либо сортировки по размерам. Такие методы раскрыты в US 5008050; US 4927637; US 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, которые настоящим целиком включены сюда посредством ссылок.

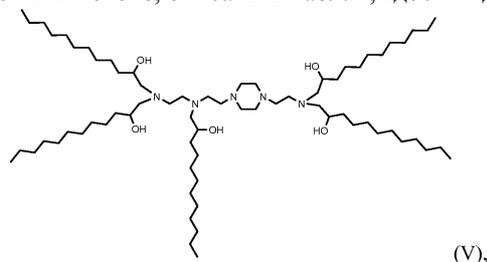
Метод смешения в потоке представляет собой метод, в котором как липиды, так и нуклеиновая кислота добавляются параллельно в смесительную камеру. Смесительная камера может быть простым тройниковым соединителем или любой другой смесительной камерой, известной квалифицированному

специалисту.

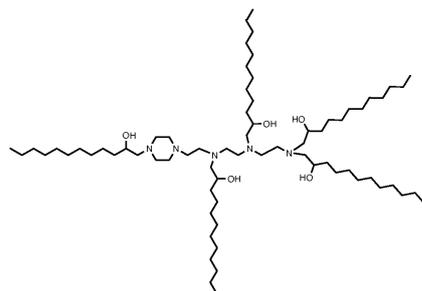
Такие методы раскрыты в патентах США №№ 6534018 и US 6855277; публикации США 2007/0042031 и в Pharmaceuticals Research, vol. 22, No. 3, Mar. 2005, p. 362-372, которые настоящим целиком включены сюда посредством ссылок.

Дополнительно подразумевается, что композиции по изобретению могут быть получены любыми способами, известными рядовому специалисту в данной области техники.

В дополнительном варианте исполнения типичные примеры композиций, приготовленных методом экструзии или методом смешения в потоке, описаны в табл. 1, где липид Т представляет собой



(V),



(VI)

или их комбинацию.

Таблица 1

Теоретический состав (% мол.)					Исходный			Конечный (захваченный)		Размер частиц (нм)		
Липид Т	DSPC	Хол	ПЭГ (С14)	SiPH К	Липид Т/ SiPHК	Общий липид/ siPHК	Захв ат (%)	Липид Т/ siPHК	Общий липид/ siPHК	Пик	Ши рин а	PDI
42	0	28	10	1661	4,75	9	58	8,19	15,52	89,6	31,7	0,133
42	0	28	10	1661	4,75	9	77	6,17	11,69	126	43,6	0,07
42	0	28	10	1661	4,75	9	24	19,79	37,50	37,3	13,4	0,194
50	0	40	10	1661	4,75	8,19	58	8,19	14,12	121	47,5	0,109
60	0	30	10	1661	4,75	7,35	43	11,05	17,09	117	48,1	0,095
55	0	40	5	1661	4,75	6,9	62	7,66	11,13	160	64,2	0,096

## 035438

65	0	30	5	1661	4,75	6,32	41	11,59	15,41	164	59	0,086
40	10	40	10	1661	4,75	9,05	72	6,60	12,57	118	46,4	0,113
50	7,5	37,5	5	1661	4,75	7,03	79	6,01	8,90	131	61,1	0,126
50	0	40	10	1661	4,75	8,19	57	8,33	14,37	88,3	28,9	0,068
60	0	30	10	1661	4,75	7,35	35	13,57	21,00	84,7	33,6	0,099
55	0	40	5	1661	4,75	6,9	49	9,69	14,08	136	33,3	0,029
65	0	30	5	1661	4,75	6,32	26	18,27	24,31	98,3	33,2	0,096
40	10	40	10	1661	4,75	9,05	70	6,79	12,93	80,2	30,4	0,14
50	7,5	37,5	5	1661	4,75	7,03	68	6,99	10,34	103	33,9	0,082
57,5	7,5	31,5	3,5	1661	4,75	6,29	66	7,20	9,53	101	19,4	0,344
57,5	7,5	31,5	3,5	1661	4,75	6,29	83	5,72	7,58	144	58,4	0,087
57,5	7,5	31,5	3,5	1661	4,75	6,29	90	5,28	6,99	181	58,6	0,042
57,5	7,5	31,5	3,5	1661	4,75	6,29	60	7,92	10,48	95,2	33,1	0,153
40	7,5	32,5	20	1661	4,75	11,43	74	6,42	15,45	77,8	34,2	0,131
50	7,5	22,5	20	1661	4,75	9,77	48	9,90	20,35	96,5	37,7	0,152
57,5	7,5	31,5	3,5	1661	4,75	6,29	54	8,80	11,65	86,9	34,9	0,094
40	7,5	32,5	20	1661	4,75	11,43	76	6,25	15,04	85,3	33,6	0,096
57,5	7,5	31,5	3,5	1661	4,75	6,29	10	47,50	62,90	107	58,4	0,148
57,5	7,5	31,5	3,5	1661	4,75	6,29	82	5,79	7,67	150	59,3	0,092
57,5	7,5	31,5	3,5	1661	4,75	6,29	73	6,51	8,62	113	37,1	0,094
57,5	7,5	31,5	3,5	1661	4,75	6,29	71	6,69	8,86	115	37,9	0,068
57,5	7,5	31,5	3,5	1661	4,75	6,72	13	36,54	51,69	39,9	12	0,265
57,5	7,5	31,5	3,5	1661	4,75	6,29	40	11,88	15,73	55,6	18,9	0,109
50	7,5	37,5	5	1955	4,75	7,03	93	5,11	7,56	122	45,7	0,083
50	7,5	37,5	5	3215	4,75	7,03	79	6,01	8,90	102	35	0,122
60	7,5	31	1,5	1661	4,75	6,26	79	6,01	7,92	191	70,5	0,096
55	7,5	32,5	5	1661	4,75	7,13	80	5,94	8,91	132	41	0,056
55	7,5	32,5	5	1661	4,75	7,13	40	11,88	17,83	73,2	24,6	0,096
55	7,5	32,5	5	1661	4,75	7,13	43	11,05	16,58	71,6	20	0,07
60	7,5	31	1,5	1661	4,75	6,26	60	7,92	10,43	61,9	19,7	0,064
60	7,5	31,5	1	1661	4,75	6,19	48	9,90	12,90	113	93,8	0,238
60	7,5	31	1,5	1661	4,75	6,26	41	11,59	15,27	156	81,1	0,132
60	7,5	31	1,5	1661	4,75	6,26	29	16,38	21,59	115	79,8	0,204
60	0	38,5	1,5	1661	4,75	6,05	17	27,94	35,59	139	77,8	0,184
60	7,5	31	1,5	1661	4,75	6,26	73	6,51	8,58	75,1	19,6	0,04
60	7,5	31	1,5	1661	4,75	6,26	74	6,42	8,46	71,3	25,7	0,091
60	7,5	31	1,5	1661	4,75	6,26	69	6,88	9,07	80,1	28	0,082
60	7,5	31	1,5	1661	9,5	12,53	70	13,57	17,90	69,8	22,5	0,09
50	10	38,5	1,5	1661	4,75	6,97	77	6,17	9,05	64	26,1	0,127
60	0	38,5	1,5	1661	4,75	6,05	51	9,31	11,86	64	21,9	0,088
40	20	38,5	1,5	1661	4,75	8,36	86	5,52	9,72	59,7	21,1	0,151
50	10	38,5	1,5	18747	4,75	6,97	N/A	N/A	N/A	70,3	22,6	0,034
45	15	38,5	1,5	1661	4,75	7,58	82	5,79	9,24	70	19,4	0,043
	(DOPC)											
45	15	38,5	1,5	1661	4,75	7,43	81	5,86	9,17	57,2	17,1	0,081
	(DMPC)											
45	15	38,5	1,5	1661	4,75	7,59	81	5,86	9,37	54,4	17,3	0,118
50	10	38,5	1,5	1661	4,75	6,97	79	6,01	8,82	75,5	45,2	0,2
			(C10)									
50	10	38,5	1,5	1661	4,75	6,98	81	5,86	8,62	64,1	18,4	0,069
			(C18)									

В одном варианте исполнения композиции по изобретению захватываются в количестве по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90%.

В одном варианте исполнения композиции по изобретению дополнительно содержат буфер (например, цитрат, фосфат).

В одном варианте исполнения композиции по изобретению дополнительно содержат аполипопротеин. В используемом тут значении, термин "аполипопротеин" или "липопротеин" относится к аполипопротеинам, известным квалифицированным специалистам, и их вариантам и фрагментам, и к аполипопротеиновым агонистам, аналогам или их фрагментам, описанным ниже.

Пригодные аполипопротеины включают, без ограничения, ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoA-V и ApoE, и их активные полиморфные формы, изоформы, варианты и мутанты, а также их фрагменты или укороченные формы. В определенных вариантах исполнения аполипопротеин представляет собой тиолсодержащий аполипопротеин. "Тиолсодержащий аполипопротеин" относится к аполипопротеину, варианту, фрагменту или изоформе, которые содержат по меньшей мере один цистеиновый остаток. Наиболее распространенными тиолсодержащими аполипопротеинами являются ApoA-I Milano (ApoA-I<sub>M</sub>) и ApoA-I Paris (ApoA-I<sub>P</sub>), которые содержат один цистеиновый остаток (Jia et al., 2002, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 297: 206-13; Bielicki and Oda, 2002, *Biochemistry* 41: 2089-96). ApoA-II, ApoE2 и ApoE3 также являются тиолсодержащими аполипопротеинами. Изолированные ApoE и/или их активные фрагменты и полипептидные аналоги, включая их рекомбинантно полученные формы, описаны в патентах США №№ 5672685; 5525472; 5473039; 5182364; 5177189; 5168045; 5116739; описания которых включены сюда посредством ссылок. ApoE3 раскрыт в Weisgraber, et al., "Human E apoprotein heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in 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 GenBank, номер доступа K00396.

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

В определенных вариантах исполнения аполипопротеин может представлять собой фрагмент, вариант или изоформу аполипопротеина. Термин "фрагмент" относится к любому аполипопротеину, имеющему более короткую аминокислотную последовательность, чем нативный аполипопротеин, если такой фрагмент сохраняет активность нативного аполипопротеина, включая липидсвязывающие свойства. Под "вариантом" подразумеваются замещения или изменения в аминокислотных последовательностях аполипопротеина, причем такие замещения или изменения, например аддиции и делеции аминокислотных остатков, не снижают активность нативного аполипопротеина, включая липидсвязывающие свойства. Таким образом, вариант может содержать белок или пептид, имеющий, по существу, идентичную аминокислотную последовательность с нативным аполипопротеином, предусматриваемым тут, в котором один или несколько аминокислотных остатков были консервативно замещены на химически подобные аминокислоты. Примеры консервативных замещений включают замещение по меньшей мере одного гидрофобного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин или метионин, на другой. Аналогично, настоящее изобретение предусматривает, например, замещения по меньшей мере одного гидрофильного остатка, такие как, например, между аргинином и лизином, между глутамином и аспарагином, и между глицином и серином (см. патенты США №№ 6004925, 6037323 и 6046166). Термин "изоформа" относится к белку, имеющему такую же, большую или частичную функцию и аналогичную, идентичную или частичную последовательность, который может быть или не быть продуктом того же самого гена и обычно является тканеспецифическим (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; 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 определенных вариантах исполнения, способы и композиции по настоящему изобретению включают использование химерной конструкции аполипопротеина. Например, химерная конструкция аполипопротеина может состоять из аполипопротеинового домена с высокой липидсвязывающей способностью, ассоциированного с аполипопротеиновым доменом, обладающим защитными свойствами против ишемической реперфузии. Химерная конструкция аполипопротеина может представлять собой конструкцию, включающую отдельные области, присутствующие в аполипопротеине (т.е., гомологичная конструкция), или химерная конструкция может представлять собой конструкцию, включающую отдельные

области из разных аполипопротеинов (т.е., гетерологические конструкции). Композиции, содержащие химерную конструкцию, могут также включать сегменты, представляющие собой варианты или сегменты аполипопротеина, предназначенные для обеспечения специфического характера (например, липид-связывающего, рецепторсвязывающего, ферментативного, фермент-активирующего, антиоксидантного, 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. Vase. Biol.* 16(2):328-38; Thurberg et al., *J. Biol. Chem.* 271(11):6062-70; Dyer 1991, *J. Biol. Chem.* 266(23): 150009-15; Hill 1998, *J. Biol. Chem.* 273(47): 30979-84).

Аполипопротеины, используемые в изобретении, также включают рекомбинантные, синтетические, полусинтетические или очищенные аполипопротеины. Способы получения аполипопротеинов или их эквивалентов, используемые в изобретении, хорошо известны специалистам. Например, аполипопротеины могут быть выделены из плазмы или природных продуктов, например, путем центрифугирования в градиенте плотности или иммуноаффинной хроматографии или получены синтетически, полусинтетически или с использованием методик рекомбинантных ДНК, известных специалистам (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 публикации РСТ WO 86/04920 и WO 87/02062).

Аполипопротеины, используемые в изобретении, дополнительно включают агонисты аполипопротеинов, такие как пептиды и аналоги пептидов, имитирующие активность ApoA-I, ApoA-I Milano (ApoA-I<sub>M</sub>), ApoA-I Paris (ApoA-I<sub>P</sub>), ApoA-II, ApoA-IV и ApoE. Например, аполипопротеин может быть любым из материалов, описанных в патентах США №№ 6004925, 6037323, 6046166 и 5840688, содержание которых целиком включено сюда посредством ссылок.

Агонистические пептиды или пептидные аналоги аполипопротеинов могут быть синтезированы или получены с использованием любых методик пептидного синтеза, известных специалистам, включая, например, методики, описанные в патентах США №№ 6004925, 6037323 и 6046166. Например, пептиды могут быть получены с использованием методики твердофазового синтеза, первоначально описанной Merrifield (1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154). Другие методики пептидного синтеза приведены в Wodanszky et al., *Peptide Synthesis*, John Wiley & Sons, 2d Ed., (1976) и других работах, легкодоступных для квалифицированных специалистов. Краткое изложение методик полипептидного синтеза приведено в Stuart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill., (1984). Пептиды также могут быть синтезированы методами синтеза в растворе, как описано в *The Proteins*, Vol. II, 3d Ed., Neurath et al., Eds., p. 105-237, Academic Press, New York, N.Y. (1976). Пригодные защитные группы для использования в разных пептидных синтезах описаны в вышеупомянутых источниках, 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 отщепления от более крупных фрагментов, например, аполипопротеина A-I.

В определенных вариантах исполнения аполипопротеин может быть смесью аполипопротеинов. В одном варианте исполнения аполипопротеин может быть гомогенной смесью, т.е. принадлежать к аполипопротеинам одного типа. В другом варианте исполнения аполипопротеин может быть гетерогенной смесью аполипопротеинов, т.е., смесью двух или больше разных аполипопротеинов. Варианты исполнения гетерогенных смесей аполипопротеинов могут включать, например, смесь аполипопротеина из животного источника и аполипопротеина полусинтетического происхождения. В определенных вариантах исполнения гетерогенная смесь может включать, например, смесь ApoA-I и ApoA-I Milano. В определенных вариантах исполнения гетерогенная смесь может включать, например, смесь ApoA-I Milano и ApoA-I Paris. Пригодные смеси для использования в способах и композициях по изобретению будут очевидными для квалифицированного специалиста.

Если аполипопротеин получают из природных источников, то он может быть получен из растительного или животного источника. Если аполипопротеин получают из животного источника, аполипопротеин может принадлежать любому виду. В определенных вариантах исполнения аполипопротеин может быть получен из животного источника. В определенных вариантах исполнения аполипопротеин может быть получен из человеческого источника. В предпочтительных вариантах исполнения изобретения аполипопротеин выделяют из того же вида, к которому принадлежит индивидуум, которому аполипопротеин вводится.

В одном варианте исполнения ген-мишень представляет собой ген, экспрессируемый в печени, например ген Фактора VII (FVII). В других вариантах исполнения ген-мишень экспрессируется в эндотелии (например, в сердце, печени, легком, почке, гипоталамусе или скелетной мышце). Эффект экспрес-

сии гена-мишени, например FVII, оценивают путем измерения уровней FVII в биологическом образце, таком как образец сыворотки или ткани. Например, может быть определен уровень FVII в крови, например, измеренный с помощью анализа активности FVII. В одном варианте исполнения может быть оценен уровень мРНК в печени или эндотелии. В другом предпочтительном варианте исполнения выполняются по меньшей мере два типа оценки, например, проводится как оценка уровня белка (например, в крови), так и измерение уровня мРНК (например, в печени).

В одном варианте исполнения, агент представляет собой нуклеиновую кислоту, такую как двухцепочечная РНК (dsРНК).

В другом варианте исполнения агент на основе нуклеиновой кислоты представляет собой одноцепочечные ДНК или РНК, или двухцепочечные ДНК или РНК, или гибрид ДНК-РНК. Например, двухцепочечные ДНК могут быть структурным геном, геном, включающим контрольную и терминирующую области, или самореплицирующейся системой, такой как вирусная или плазмидная ДНК. Двухцепочечные РНК могут быть, например, dsРНК или другим РНК-интерферирующим реагентом. Одноцепочечная нуклеиновая кислота может быть, например, антисмысловым олигонуклеотидом, рибозимом, микроРНК или образующим триплекс олигонуклеотидом.

В еще одном варианте исполнения в различные моменты времени после введения агента-кандидата, биологический образец, такой как образец жидкости, например крови, плазмы или сыворотки, или образец ткани, такой как образец печени или эндотелия (например, из сердца, почки, легкого, гипоталамуса или скелетной мышцы), отбирают у испытуемого субъекта и подвергают испытаниям на влияние агента на уровни экспрессии белка-мишени или мРНК. В одном особенно предпочтительном варианте исполнения агент-кандидат представляет собой dsРНК, которая нацелена на FVII, и биологический образец испытывают на ее влияние на уровни белка или мРНК Фактора VII. В одном варианте исполнения анализируют уровни белка FVII в плазме, например, путем использования иммуногистохимического анализа или хромогенного анализа. В другом варианте исполнения уровни мРНК FVII в печени или эндотелии (например, в сердце, печени, легком, почке, гипоталамусе или скелетной мышце) тестируют путем проведения анализа, такого как анализ разветвленной ДНК или нозерн-блоттинг или анализ методом ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR).

В одном варианте исполнения агент, например композицию, включающую липидную композицию, оценивают на токсичность. В еще одном варианте исполнения, может осуществляться контроль субъекта-модели на физические эффекты, такие как изменение веса или характер поведения в клетке.

В одном варианте исполнения, способ дополнительно включает проведение дополнительной оценки агента, например, композиции, содержащей липидную композицию. Дополнительная оценка может включать, например, (i) повторное проведение описанных выше методов оценки, (ii) повторное проведение описанных выше методов оценки на другом числе животных или с другими дозами, или (iii) использование другого метода, например, оценки на другой животной модели, например, на примате кроме человека.

В другом варианте исполнения принимают решение относительно того, включать или нет агент и липидную композицию в дальнейшие исследования, такие как клинические испытания, в зависимости от наблюдаемого эффекта воздействия агента-кандидата на уровни белка или мРНК в печени или на эндотелий. Например, если наблюдается, что dsРНК-кандидат снижает уровни белка или мРНК на по меньшей мере 20, 30, 40, 50% или больше, то может быть рассмотрен вопрос о включении агента в клинические испытания.

В еще одном варианте исполнения принимают решение относительно того, включать или нет агент и липидную композицию в фармацевтическую композицию, в зависимости от наблюдаемого эффекта агента-кандидата и аминоклипида на уровни белка, мРНК в печени или эндотелий. Например, если наблюдается, что dsРНК-кандидат снижает уровни белка или мРНК по меньшей мере на 20, 30, 40, 50% или больше, то может быть рассмотрен вопрос включения агента в клинические испытания.

В другом аспекте изобретение предусматривает способ оценки липидной композиции на ее пригодность для доставки конструктора на основе РНК, например dsРНК, нацеленной на FVII. Способ включает обеспечение композиции, содержащей dsРНК, нацеленной на FVII, и аминоклипид-кандидат, введение композиции грызуну, например мышши, оценку экспрессии FVII как функции от по меньшей мере одного уровня FVII в крови или уровня мРНК FVII в печени, с проведением тем самым оценки аминоклипида-кандидата.

Композиции, включающие липидсодержащие компоненты, такие как липосомы, которые описаны более подробно ниже. Типичные примеры агентов на основе нуклеиновых кислот включают dsРНК, антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы, микроРНК, иммуностимулирующие олигонуклеотиды или образующие триплекс олигонуклеотиды. Такие агенты также описаны более подробно ниже.

Композиции, называемые тут композициями "LNP" (например, LNP01, LNP02 и т.д.) также известны как композиции "AF" (например, AF01, AF02 и т.д.).

"Алкил" означает линейный или разветвленный, нециклический или циклический, насыщенный алифатический углеводород, содержащий от 1 до 24 атомов углерода. Типичные насыщенные линейные алкилы включают метил, этил, н-пропил, н-бутил, н-пентил, н-гексил и т.п.; а насыщенные разветвлен-

ные алкилы включают изопропил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, изопентил и т.п. Типичные насыщенные циклические алкилы 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. Типичные линейные и разветвленные алкенилы 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. Типичные линейные и разветвленные алкинилы включают ацетиленил, пропинил, 1-бутинил, 2-бутинил, 1-пентинил, 2-пентинил, 3-метил-1-бутинил и т.п.

"Ацил" означает любой алкил, алкенил или алкинил, в котором углерод в точке присоединения замещен оксогруппой, как определено ниже. Например,  $-C(=O)$ -алкил,  $-C(=O)$ -алкенил и  $-C(=O)$ -алкинил представляют собой ацильные группы.

"Гетероцикл" означает 5-7-членное моноциклическое или 7-10-членное бициклическое, гетероциклическое кольцо, которое является насыщенным, ненасыщенным или ароматическим и которое содержит от 1 или 2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и в котором гетероатомы азота и серы могут быть необязательно окисленными, и гетероатом азота может быть необязательно четвертизированным, включая бициклические кольца, в которых любой из вышеуказанных гетероциклов сконденсирован 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, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопиранил, тетрагидропиримидинил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопиранил и т.п.

Термины "необязательно замещенный алкил", "необязательно замещенный алкенил", "необязательно замещенный алкинил", "необязательно замещенный ацил" и "необязательно замещенный гетероцикл" означают, что в случае замещения по меньшей мере один атом водорода замещается на заместитель. В случае оксозаместителя ( $=O$ ) замещаются два атома водорода. При этом заместители включают оксо, галоген, гетероцикл,  $-CN$ ,  $-OR^x$ ,  $-NR^xR^y$ ,  $-NR^xC(=O)R^y$ ,  $-NR^xSO_2R^y$ ,  $-C(=O)R^x$ ,  $-C(=O)OR^x$ ,  $-C(=O)NR^xR^y$ ,  $-SO_nR^x$  и  $-SO_nNR^xR^y$ , где  $n$  равен 0, 1 или 2,  $R^x$  и  $R^y$ , одинаковые или разные, и независимо обозначают водород, алкил или гетероцикл, и каждый из указанных алкильных и гетероциклических заместителей может быть дополнительно замещен одним или несколькими из оксо, галогена,  $-OH$ ,  $-CN$ , алкила,  $-OR^x$ , гетероцикла,  $-NR^xR^y$ ,  $-NR^xC(=O)R^y$ ,  $-NR^xSO_2R^y$ ,  $-C(=O)R^x$ ,  $-C(=O)OR^x$ ,  $-C(=O)NR^xR^y$ ,  $-SO_nR^x$  и  $-SO_nNR^xR^y$ .

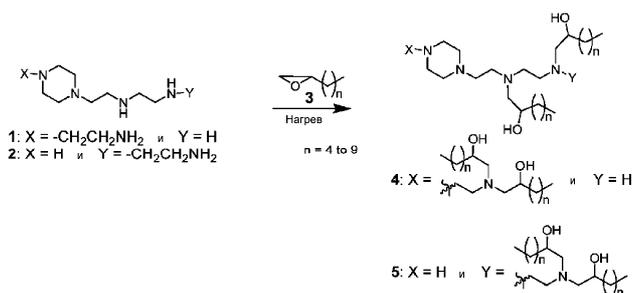
"Галоген" означает фтор, хлор, бром и йод.

В некоторых вариантах исполнения способы по изобретению могут потребовать использования защитных групп. Методология защитных групп хорошо известна квалифицированным специалистам (см. например, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Green, T.W. et al., Wiley-Interscience, New York City, 1999). Вкратце, защитные группы в контексте настоящего изобретения представляют собой любую группу, которая уменьшает или устраняет нежелательную реакционную способность функциональной группы. Защитная группа может быть присоединена к функциональной группе для маскирования ее реакционной способности в определенных реакциях и затем удалена для высвобождения первоначальной функциональной группы. В некоторых вариантах исполнения используется "защита спиртовой группы". "Защита спиртовой группы" представляет собой любую группу, которая уменьшает или устраняет нежелательную реакционную способность спиртовой функциональной группы. Защитные группы могут быть присоединены и удалены с использованием методик, хорошо известных специалистам.

### Синтез

Соединения по изобретению могут быть получены известными методами органического синтеза. В общем, липид формул (I), (II), (III), (IV) и (V) может быть получен путем проведения реакции аминного соединения с различными эпоксидами. В одном примере липид формулы (V) и (VI) может быть получен в соответствии с Реакционной схемой 1, в которой все заместители имеют определенные выше значения, если не указано иное.

Схема 1

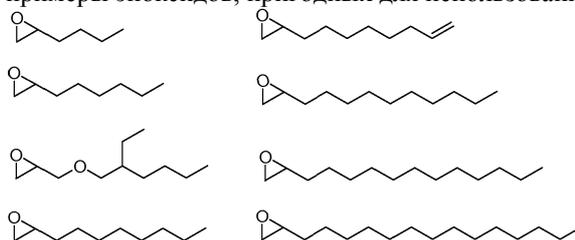


Соединения 1 и 2 синтезируют в соответствии с процедурой, описанной в WO/9318017.

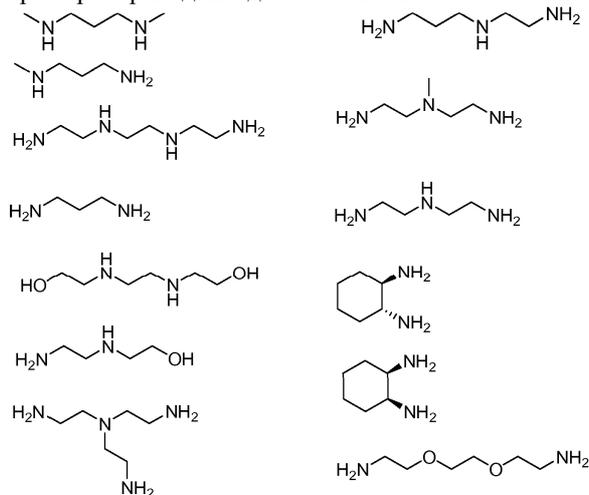
Реакция 1 с эпоксидом 3 при повышенной температуре дает соединение 4, которое очищают стандартной хроматографией на колонке с силикагелем. Соединение 5 аналогично получают из амина 2.

Другие эпоксиды и амины, пригодные для получения аминоклипов в соответствии со схемой 1, описанной в Love K.T., et al., "Lipid-like materials for low-dose, in vivo gene silencing", PNAS Early Edition, [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0910603106](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0910603106), которая целиком включена сюда посредством ссылки.

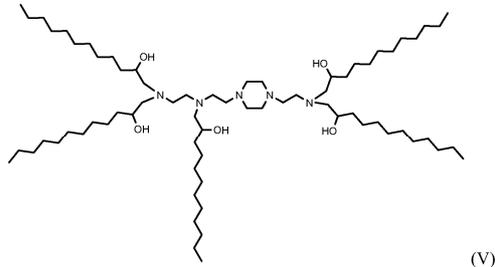
Некоторые типичные примеры эпоксидов, пригодных для использования, включают



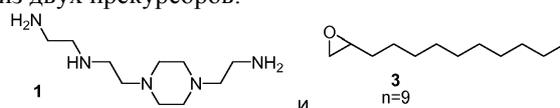
Некоторые типичные примеры пригодных для использования аминов включают



Соединение формулы (V)

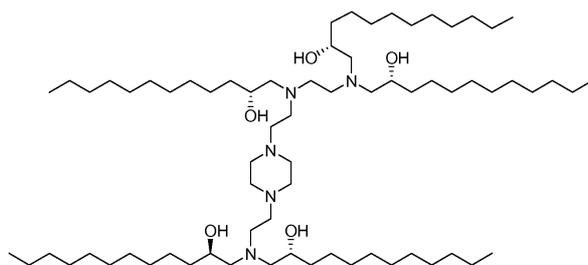


может быть получено из двух прекурсоров:



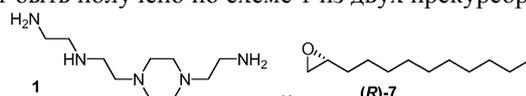
Например, соединение формулы (V) может быть получено из рацемической смеси 3. В этом случае исходный продукт может включать смесь диастереомеров, которая необязательно может быть дополнительно очищена.

Соединение (R)-6 представляет собой стереоконтролируемое соединение формулы (V)



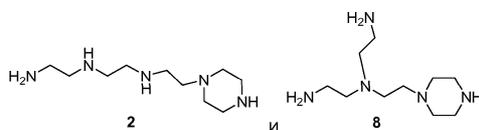
(R)-6

Соединение (R)-6 может быть получено по схеме 1 из двух прекурсоров

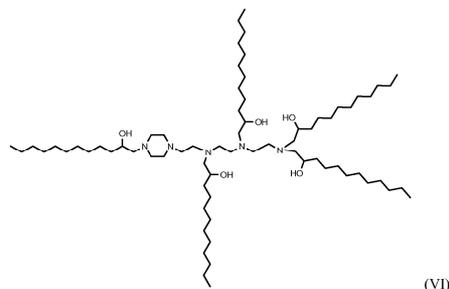


Соответствующее (S)-6 соединение может быть получено из 1 и (S)-7 (т.е., энантиомера (R)-7).

Структурные изомеры 1 также могут быть использованы для получения аминолипида. Такие структурные изомеры включают

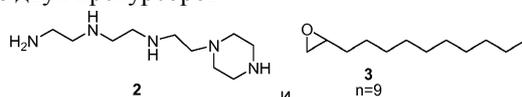


Соединение формулы (VI)

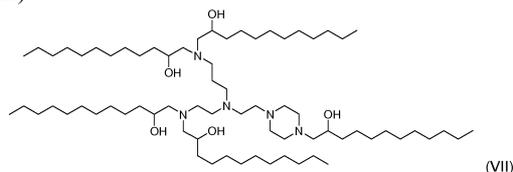


(VI)

может быть получено из двух прекурсоров

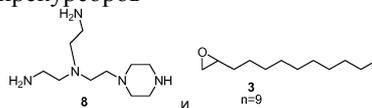


Соединение формулы (VII)



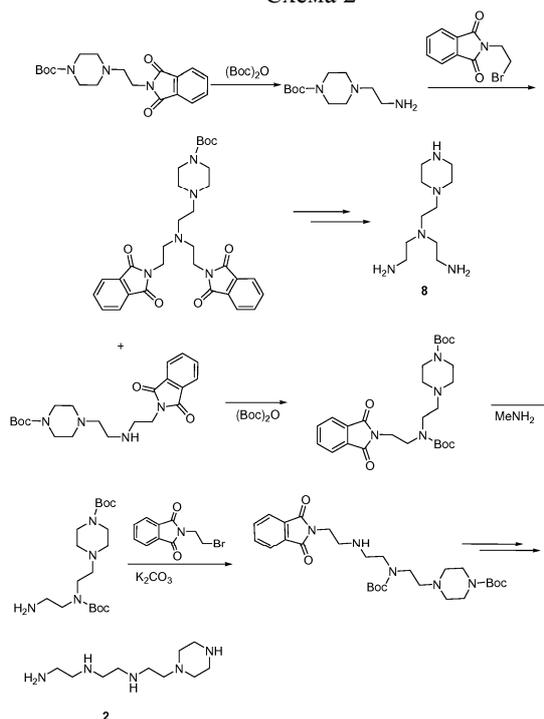
(VII)

может быть получено из двух прекурсоров



По существу, стереочистый эпоксид может быть использован для получения стереоконтролируемого аминолипида.

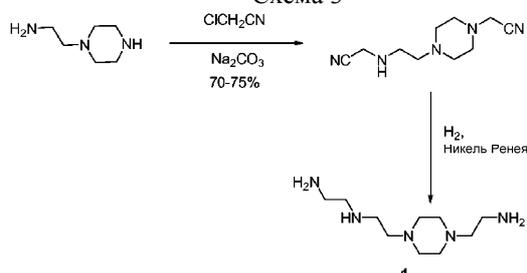
Схема 2



Амины 2 и 8 могут быть получены в соответствии с реакционной схемой 2. Оба они могут быть получены из одного исходного материала, 4-(*t*-бутоксикарбонил)-1-(2-(фталимидо)этил)пиперазина.

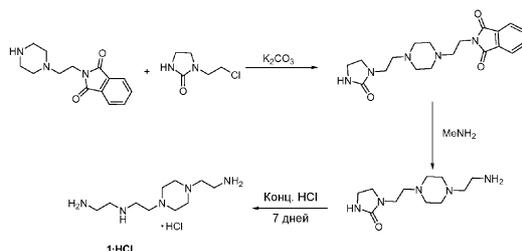
Значительные (multigram) количества 2 и 8 были получены в соответствии со схемой 2. Амин 1 может быть получен в соответствии со схемой 3, начиная с 1-(2-аминоэтил)пиперазина.

Схема 3



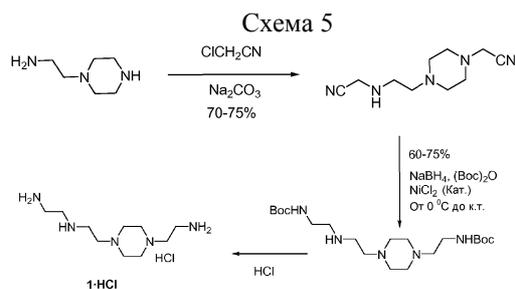
Альтернативно, схема 4 иллюстрирует получение 1 из 1-(2-(фталимидо)этил)пиперазина.

Схема 4



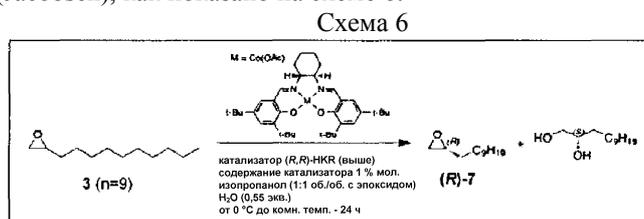
Способ схемы 4 был масштабирован для получения 1 в значительных количествах. Конечная стадия альтернативно может быть проведена с основанием, таким как  $\text{KOH}$ , вместо кислоты, такой как  $\text{HCl}$ . В основных условиях реакция может протекать быстрее.

В другом варианте 1 может быть получен методом, аналогичным изображенному на схеме 3, но с использованием других восстановительных условий, как показано на схеме 5.



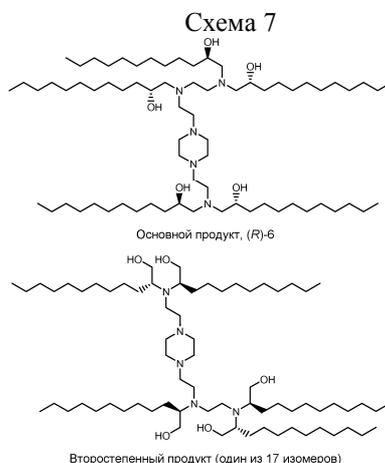
Выгодным моментом является то, что способ схемы 5 может быть легче масштабирован, чем способы схемы 3 или схемы 4; реакционные условия являются очень мягкими, требуется только каталитическое (10 мол.%) количество хлорида никеля(II), и выделение и очистка продукта осуществляются простыми методами. Эта процедура была масштабирована для получения значительных количеств 1.

Эпоксид 3 ( $n=9$ ) может быть разделен для получения желательного оптического изомера (например, (R)-7) с высоким энантиомерным избытком. Например, 3 ( $n=9$ ) может быть разделен с использованием катализатора Якобсена (Jacobsen), как показано на схеме 6.

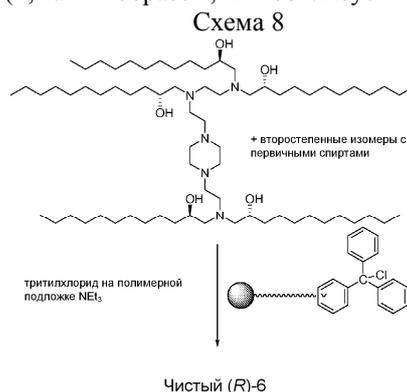


Эта реакция была проведена с получением значительных количеств (например, 300 г) материала.

Аминолипид (R)-6 был получен из 1 и (R)-7 в значительных (например, >16 г) количествах. Продукт реакции дополнительно очищают хроматографией на колонке; полученный материал был очевидно чистым по результатам анализа методом ТСХ (TLC). Однако, присутствовал также ряд второстепенных продуктов. Второстепенные продукты (см. схему 7) образуются в результате реакций, в которых раскрытие эпоксидного кольца происходит по более затрудненному атому углерода, приводя к образованию первичных спиртов.



Второстепенные продукты были в значительной степени отделены от основного продукта в результате обработки трифенилхлорметановым реагентом на твердой подложке (схема 8), который селективно реагирует с первичными спиртами (и, таким образом, иммобилизует их).



Другой подход к получению стереоконтролируемых аминолипидов может предусматривать использование стереочистых альфа-гидроксиальдегидов, которые могут быть использованы вместо эпоксидов в реакции с аминами, такими как 1. В случае использования альфа-гидроксиальдегидов реакция с аминами, такими как 1, протекает в восстановительных условиях. Схема 9 иллюстрирует стереоконтролируемый синтез защищенного альфа-гидроксиальдегида 10, начиная с альфа-олефина.

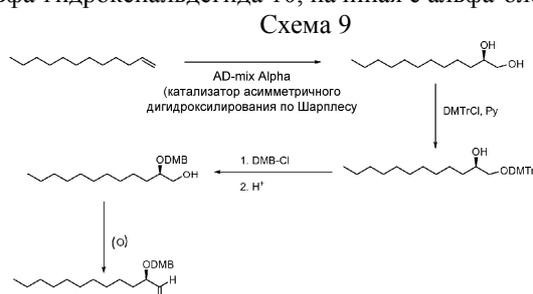
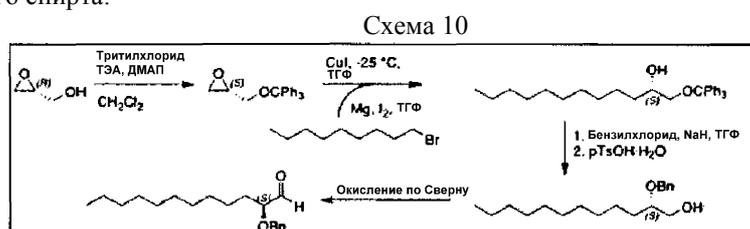


Схема 10 изображает альтернативный путь получения защищенного  $\alpha$ -гидроксиальдегида 11, начиная с (R)-глицидного спирта.



Для получения стереоконтролируемого аминолипида, такого как (R)-6, амин 1 вводят в реакцию с защищенным альфа-гидроксиальдегидом, обладающим желательной стереохимией, в присутствии восстановителя, например,  $\text{Na}(\text{OAc})_3\text{ВН}$  в  $\text{AcOH}$ .

Аминолипиды по изобретению представляют собой катионные липиды. В используемом тут значении подразумевается, что термин "аминолипид" включает липиды, содержащие одну или две цепи жирной кислоты или жирного алкила и головную аминогруппу (включая алкиламино- или диалкиламиногруппу), которая может быть протонирована с образованием катионного липида при физиологических значениях рН.

Другие аминолипиды будут включать материалы, содержащие альтернативные группы жирных кислот и другие диалкиламиногруппы, включая материалы с разными алкильными заместителями (например, N-этил-N-метиламино-, N-пропил-N-этиламино- и т.п.). Для вариантов исполнения, в которых  $\text{R}^{11}$  и  $\text{R}^{12}$ , оба, являются длинноцепочечными алкильными или ацильными группами, они могут быть одинаковыми или разными. В общем, аминолипиды, имеющие менее насыщенные ацильные цепи, позволяют легче получать частицы определенного размера, особенно, когда комплексы должны иметь размер менее примерно 0,3 мкм для стерилизации фильтрацией. Аминолипиды, содержащие ненасыщенные жирные кислоты с длиной углеродных цепей в интервале значений от  $\text{C}_{14}$  до  $\text{C}_{22}$ , являются предпочтительными. Другие каркасные участки (scaffolds) также могут быть использованы для разделения аминогруппы и части аминолипида, состоящей из жирной кислоты или жирного алкила. Пригодные каркасные участки известны квалифицированным специалистам.

В определенных вариантах исполнения амино- или катионные липиды по изобретению содержат по меньшей мере одну протонируемую или депротонируемую группу, так чтобы липид был положительно заряженным при рН, близком к или ниже физиологического значения рН (например рН 7,4), и нейтральным при втором рН, предпочтительно близком к или выше физиологического значения рН. Конечно, должно быть понятно, что присоединение или удаление протонов как функция рН представляет собой равновесный процесс, и что указание на заряженный или нейтральный липид относится к характеру преобладающего числа частиц и не требует, чтобы весь липид находился в заряженной или нейтральной форме. Липиды, имеющие несколько протонируемых или депротонируемых групп или являющиеся цвиттерионными, не исключаются из использования по изобретению.

В определенных вариантах исполнения протонируемые липиды в соответствии с изобретением имеют величину  $\text{pK}_a$  протонируемой группы в интервале значений от примерно 4 до примерно 11. Наиболее предпочтительным является  $\text{pK}_a$  от примерно 4 до примерно 7, потому что такие липиды будут катионными на стадии составления композиций при более низком рН, в то время как частицы будут по большей части (хотя не полностью) поверхностно нейтрализованы при физиологических значениях рН, близких к рН 7,4. Одним из полезных эффектов такого  $\text{pK}_a$  является то, что по меньшей мере некоторая часть нуклеиновой кислоты, ассоциированной с наружной поверхностью частицы, будет терять свою способность к электростатическому взаимодействию при физиологических значениях рН и будет удаляться простым диализом; тем самым значительно снижая восприимчивость частицы к клиренсу.

### Липидные частицы

Агенты и/или аминоклипиды для проведения испытаний на модели скрининга в печени или эндотелии (например, в сердце, печени, легком, почке, гипоталамусе или скелетной мышце), описанной тут, могут быть приготовлены в виде липидных частиц. Липидные частицы включают, без ограничения, липосомы. В используемом тут значении, липосома представляет собой структуру, имеющую липидсодержащие мембраны, окружающие внутреннюю водную часть. Липосомы могут иметь одну или несколько липидных мембран. Изобретение предусматривает как однослойные (single-layered) липосомы, которые называются однослойными (unilamellar), так и многослойные (multi-layered) липосомы, которые называются многослойными (multilamellar). При комплексообразовании с нуклеиновыми кислотами липидные частицы также могут быть липоплексами (lipoplexes), которые состоят из слоев катионного липида, зажатых между слоями ДНК, как описано, например, в Feigner, Scientific American.

Липидные частицы могут дополнительно содержать один или несколько дополнительных липидов и/или других компонентов, таких как холестерин. Другие липиды могут быть включены в липосомальные композиции с разными целями, такими как для предотвращения окисления липида или для присоединения лигандов к поверхности липосом. Могут присутствовать любые из ряда липидов, включая амфипатические, нейтральные, катионные и анионные липиды. Такие липиды могут быть использованы по отдельности или в комбинации. Конкретные примеры дополнительных липидных компонентов, которые могут присутствовать, описаны ниже.

Дополнительные компоненты, которые могут присутствовать в липидной частице, включают компоненты, стабилизирующие бислои, такие как полиамидные олигомеры (см., например, патент США № 6320017), пептиды, белки, детергенты, производные липидов, такие как ПЭГ, присоединенный к фосфатидилэтаноламину, и ПЭГ, конъюгированный с церамидами (см. патент США № 5885613).

Липидная частица может включать один или несколько материалов из второго аминоклипид или катионного липида, нейтрального липида, стерола и липида, выбранных с целью снижения агрегации липидных частиц во время их образования, что может быть вызвано стерической стабилизацией частиц, которая предотвращает индуцированную зарядом агрегацию в процессе образования.

Примерами липидов, пригодных для конъюгации с агентом на основе нуклеиновых кислот, которые могут быть использованы в модели скрининга в печени или эндотелии (например, сердца, печени, легкого, почки, гипоталамуса или скелетной мышцы), являются модифицированные полиэтиленгликолем (ПЭГ) липиды, моносиалоганглиозид Gm1 и полиамидные олигомеры ("РАО"), такие как описанные в патенте США № 6320017. Другие соединения с незаряженными, гидрофильными, образующими стерический барьер фрагментами, предотвращающими агрегацию во время образования, такими как ПЭГ, Gm1 или АТТА, также могут быть присоединены к липидам для использования как в способах, так и в композициях по изобретению. АТТА-липиды описаны, например, в патенте США № 6320017, и конъюгаты ПЭГ-липид описаны, например, в патентах США №№ 5820873, 5534499 и 5885613. Типично, концентрация липидного компонента, выбранного для снижения агрегации, составляет от примерно 1 до 15% (мол.% от липидов).

Конкретные примеры модифицированных ПЭГ липидов (или конъюгатов липид-полиоксипэтилен), пригодных для использования по изобретению, могут иметь различные "якорные" липидные участки для закрепления ПЭГ-фрагмента на поверхности липидной везикулы. Примеры пригодных модифицированных ПЭГ липидов включают модифицированный ПЭГ фосфатидилэтаноламин и фосфатидную кислоту, конъюгаты ПЭГ-церамид (например, ПЭГ-CerC14 или ПЭГ-CerC20), которые описаны в находящемся одновременно на рассмотрении USSN 08/486214, включенном сюда посредством ссылки, модифицированные ПЭГ диалкиламины и модифицированные ПЭГ 1,2-диацилоксипропан-3-амины. Особенно предпочтительными являются модифицированные ПЭГ диацилглицерины и диалкилглицерины.

В вариантах исполнения, в которых стерически-крупный фрагмент, такой как ПЭГ или АТТА, конъюгирован с липидным якорем, выбор липидного якоря зависит от того, какой тип связи должен иметь конъюгат с липидной частицей. Хорошо известно, что *me*ПЭГ (мол.вес 2000)-диастероилфосфатидилэтаноламин (ПЭГ-DSPE) будет оставаться ассоциированным с липосомой до тех пор, пока частица не будет выведена из циркуляции, возможно, в течение нескольких суток. Другие конъюгаты, такие как ПЭГ-CerC20, обладают аналогичной устойчивостью (staying capacity). ПЭГ-CerC14, однако, быстро удаляется из композиции путем обмена при воздействии сыворотки, с величиной  $T_{1/2}$  менее 60 мин. в некоторых анализах. Как описано в патентной заявке США SN 08/486214, на скорость обмена влияют по меньшей мере три характеристики: длина ацильной цепи, насыщенность ацильной цепи и размер головной группы, создающей стерический барьер. Соединения, обладающие пригодными вариациями этих признаков, могут быть пригодными для использования в изобретении. Для некоторых терапевтических применений может быть желательным, чтобы модифицированный ПЭГ липид быстро выделялся из частиц нуклеиновая кислота-липид *in vivo*, и поэтому модифицированный ПЭГ липид будет иметь относительно короткие липидные якоря. В других терапевтических применениях может быть желательным, чтобы частица нуклеиновая кислота-липид обладала более длительным временем циркуляции в плазме, и поэтому модифицированный ПЭГ липид будет иметь относительно более длинные липидные якоря. Типичные примеры липидных якорей включают имеющие длину от примерно  $C_{14}$  до при-

мерно  $C_{22}$ , предпочтительно, от примерно  $C_{14}$  до примерно  $C_{16}$ . В некоторых вариантах исполнения, ПЭГ-фрагмент, например mПЭГ-NH<sub>2</sub>, имеет размер примерно 1000, 2000, 5000, 10000, 15000 или 20000 Да.

Следует отметить, что соединения, препятствующие агрегации, не обязательно требуют правильного функционирования конъюгации с липидом. Свободный ПЭГ или свободный АТТА в растворе могут быть достаточными для предотвращения агрегации. Если частицы являются стабильными после приготовления, ПЭГ или АТТА могут быть удалены диализом перед введением субъекту.

Нейтральные липиды, в случае их присутствия в липидной частице, могут представлять собой любой из ряда разновидностей липидов, существующих в незаряженной или нейтральной цвиттерионной форме при физиологических значениях pH. Такие липиды включают, например, диацилфосфатидилхоллин, диацилфосфатидилэтаноламин, керамид, сфингомиелин, дигидросфингомиелин, цефалин и цереброзиды. Выбор нейтральных липидов для использования в описанных тут частицах обычно осуществляется на основании соображений, касающихся, например, размера липосом и стабильности липосом в кровотоке. Предпочтительно компонент нейтрального липида представляет собой липид, имеющий две ацильные группы (т.е., диацилфосфатидилхоллин и диацилфосфатидилэтаноламин). Липиды, имеющие различные группы ацильной цепи с разными длинами цепи и степенями насыщенности, являются доступными или могут быть изолированы или синтезированы хорошо известными методами. В одной группе вариантов исполнения, липиды, содержащие насыщенные жирные кислоты с длиной углеродных цепей в интервале значений от  $C_{14}$  до  $C_{22}$ , являются предпочтительными. В другой группе вариантов исполнения, используются липиды с моно- или диненасыщенными жирными кислотами с длиной углеродных цепей в интервале значений от  $C_{14}$  до  $C_{22}$ . Дополнительно, могут быть использованы липиды, содержащие смеси жирных кислот с насыщенными и ненасыщенными цепями. Предпочтительно, нейтральные липиды, используемые по изобретению, представляют собой DOPE, DSPC, POPC или любой родственной им фосфатидилхоллин. Нейтральные липиды, пригодные для использования по изобретению, также могут состоять из сфингомиелина, дигидросфингомиелина или фосфолипидов с другими головными группами, такими как серин и инозит.

Стерольный компонент липидной смеси, в случае его присутствия, может представлять собой любой из стеролов, обычно используемых в области приготовления липосом, липидных везикул или липидных частиц. Предпочтительным стеролом является холестерин.

Другие катионные липиды, несущие суммарный положительный заряд при значениях pH, близких к физиологическим, в дополнение к конкретно описанным выше, также могут быть включены в липидные частицы по изобретению. Такие катионные липиды включают, без ограничения, N,N-диолеил-N,N-диметиламмоний хлорид ("DODAC"); N-(2,3-диолеилокси)пропил-N,N,N-триэтиламмоний хлорид ("DOTMA"); N,N-дистеарил-N,N-диметиламмоний бромид ("DDAB"); N-(2,3-диолеилокси)пропил-N,N,N-триметиламмоний хлорид ("DOTAP"); 1,2-диолеилокси-3-триметиламинопропан хлоридная соль ("DOTAP.Cl"); 3β-(N-(N,N'-диметиламиноэтан)карбамоил)холестерин ("DC-Chol"), N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N-2-(сперминкарбоксамидо)этил-N,N-диметиламмонийтрифторацетат ("DOSPA"), диоктадециламидоглицилкарбокиспермин ("DOGS"), 1,2-диолеоил-sn-3-фосфоэтаноламин ("DOPE"), 1,2-диолеоил-3-диметиламмоний пропан ("DODAP"), N,N-диметил-2,3-диолеилокси)пропиламин ("DODMA") и N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксиэтиламмоний бромид ("DMRIE"). Дополнительно, может быть использован ряд коммерческих препаратов катионных липидов, такие как, например, LIPOFECTIN (включает DOTMA и DOPE, поставляется фирмой GIBCO/BRL) и LIPOFECTAMINE (включает DOSPA и DOPE, поставляется фирмой GIBCO/BRL). В конкретных вариантах исполнения катионный липид представляет собой аминоклипид.

Анионные липиды, пригодные для использования в липидных частицах по изобретению, включают, без ограничения, фосфатидилглицерин, кардиолипин, диацилфосфатидилсерин, диацилфосфатидную кислоту, N-додеканойлфосфатидилэтаноламин, N-сукцинилфосфатидилэтаноламин, N-глутарилфосфатидилэтаноламин, лизилфосфатидилглицерин и другие анионные модифицирующие группы, присоединенные к нейтральным липидам.

В многочисленных вариантах исполнения липидные частицы по изобретению включают амфипатические липиды. "Амфипатические липиды" относятся к любому пригодному материалу, в котором гидрофобная часть липидного материала ориентируется в гидрофобную фазу, в то время как гидрофильная часть ориентируется в водную фазу. Такие соединения включают, без ограничения, фосфолипиды, аминоклипиды и сфинголипиды. Типичные фосфолипиды включают сфингомиелин, фосфатидилхоллин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит, фосфатидную кислоту, пальмитоилолеоилфосфатидилхоллин, лизофосфатидилхоллин, лизофосфатидилэтаноламин, дипальмитоилфосфатидилхоллин, диолеоилфосфатидилхоллин, дистеароилфосфатидилхоллин или дилинолеилфосфатидилхоллин. Также могут быть использованы другие не содержащие фосфора соединения, такие как сфинголипиды, семейства гликофинголипида, диацилглицерины и β-ацилоксикислоты. Дополнительно, такие амфипатические липиды могут быть легко смешаны с другими липидами, такими как триглицериды и стеролы.

Также пригодными для включения в липидные частицы по изобретению являются липиды про-

граммируемого слияния. Такие липидные частицы обладают незначительной тенденцией к слиянию с клеточными мембранами и высвобождению своей полезной нагрузки, пока не произойдет определенное сигнальное событие. Это позволяет липидным частицам более равномерно распределяться после инъекции в организм или очаг болезни перед началом их слияния с клетками. Сигнальным событием может быть, например, изменение pH, температуры, ионного окружения или время. В последнем случае, замедляющий слияние или "маскирующий" компонент, такой как конъюгат АТГА-липид или конъюгат ПЭГ-липид, может просто удаляться путем обмена из мембраны липидной частицы со временем. Типичные примеры липидных якорей включают имеющие длину от примерно  $C_{14}$  до примерно  $C_{22}$ , предпочтительно, от примерно  $C_{14}$  до примерно  $C_{16}$ . В некоторых вариантах исполнения, ПЭГ-фрагмент, например mПЭГ-NH<sub>2</sub>, имеет размер примерно 1000, 2000, 5000, 10000, 15000 или 20000 Да.

К тому моменту, когда липидные частицы будут в достаточной степени распределены в организме, они потеряют достаточное количество маскирующего агента, чтобы получить способность к слиянию. В случае других сигнальных событий, желательно выбрать сигнал, ассоциированный с очагом болезни или клеткой-мишенью, такой как повышенная температура в месте воспаления.

Липидная частица, конъюгированная с агентом на основе нуклеиновой кислоты, может также включать нацеливающий фрагмент, например, нацеливающий фрагмент, специфический по отношению к типу клеток или ткани.

Нацеливание липидных частиц с использованием различных нацеливающих фрагментов, таких как лиганды, рецепторы клеточной поверхности, гликопротеины, витамины (например, рибофлавин) и моноклональные антитела, было описано ранее (см. например, патенты США №№ 4957773 и 4603044). Нацеливающие фрагменты могут включать цельный белок или его фрагменты. Механизмы нацеливания обычно требуют, чтобы нацеливающие агенты были расположены на поверхности липидных частиц таким образом, чтобы нацеливающий фрагмент был доступным для взаимодействия с мишенью, например, рецептором клеточной поверхности. Множество различных нацеливающих агентов и способов являются известными и доступными для специалистов, включая описанные, например, в Sapa, P. and Allen, T.M., *Prog. Lipid Res.* 42(5):439-62 (2003); и Abra, R.M. et al., *J. Liposoma Res.* 12:1-3, (2002).

Было предложено использование для нацеливания липидных частиц, т.е., липосом, с поверхностным покрытием из гидрофильных полимерных цепей, таких как полиэтиленгликольные (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 Liposoma Research* 2: 321-334 (1992); патент США № 5013556; Zalipsky, *Bioconjugate Chemistry* 4: 296-299 (1993); Zalipsky, *FEBS Letters* 353: 71-74 (1994); Zalipsky, в: *Stealth Liposomes*, Chapter 9 (Lasic and Martin, Eds.) CRC Press, Boca Raton FL (1995). В одном подходе лиганд для нацеливания липидной частицы, такой как антитело, связан с полярной головной группой липидов с образованием липидной частицы. В другом подходе, нацеливающий лиганд присоединен к дистальным концам ПЭГ цепей с образованием покрытия из гидрофильного полимера (Klibanov, et al., *Journal of Liposoma Research* 2: 321-334 (1992); Kirpotin et al., *FEBS Letters* 388: 115-118(1996)).

Могут быть использованы стандартные методы для присоединения нацеливающих агентов. Например, может быть использован фосфатидилэтаноламин, который может быть активирован для присоединения нацеливающих агентов или дериватизированных липофильных соединений, таких как дериватизированный липидом блеомицин.

Нацеленные с помощью антитела липосомы могут быть сконструированы с использованием, например, липосом, включающих протеин А (см. Renneisen, et al., *J. Bio. Chem.*, 265: 16337-16342 (1990) и Leonetti, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 87:2448-2451 (1990). Другие примеры конъюгации антител раскрыты в патенте США № 6027726, описание которого включено сюда посредством ссылки. Примеры нацеливающих фрагментов могут также включать другие белки, специфические по отношению к клеточным компонентам, включая антигены, ассоциированные с новообразованиями или опухолями. Белки, используемые в качестве нацеливающих фрагментов, 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 методы нацеливания включают систему биотин-авидин.

#### **Композиции и рецепты терапевтического агента-липидная частица**

Изобретение включает композиции, содержащие липидные частицы по изобретению и активный агент, где активный агент ассоциирован с липидной частицей. В конкретных вариантах исполнения активный агент представляет собой терапевтический агент. В конкретных вариантах исполнения активный агент инкапсулирован в водной внутренней части липидной частицы. В других вариантах исполнения активный агент присутствует в одном или нескольких липидных слоях липидной частицы. В других вариантах исполнения активный агент связан с наружной или внутренней липидной поверхностью липидной частицы.

"Полностью инкапсулированный" в используемом тут значении указывает, что нуклеиновая кислота в частицах в значительной степени не деградирует после воздействия сыворотки или нуклеазного анализа, в результате которых свободная ДНК должна значительно деградировать. В полностью инкапсулированной системе предпочтительно менее 25% частиц нуклеиновой кислоты деградирует в результате

обработки, которая нормально должна деградировать 100% свободной нуклеиновой кислоты, более предпочтительно деградирует менее 10% и наиболее предпочтительно менее 5% частиц нуклеиновой кислоты. Альтернативно, полное инкапсулирование может быть определено с помощью анализа Oli-green®. Oli-green® представляет собой окрашивание сверхчувствительной флуоресцентной нуклеиновой кислотой для количественного определения олигонуклеотидов и одноцепочечной ДНК в растворе (представляется фирмой Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA).

Полностью инкапсулированный также предусматривает, что частицы являются стабильными к действию сыворотки, то есть они не подвергаются быстрому разложению на составные компоненты при введении *in vivo*.

Активные агенты в используемом тут значении включают любую молекулу или соединение, способные оказывать желательные эффекты воздействия на клетку, ткань, орган или особу. Такие эффекты могут быть, например, биологическими, физиологическими или косметическими. Активные агенты могут быть любым типом молекул или соединений, включая, например, нуклеиновые кислоты, пептиды и полипептиды, включает, например, антитела, такие как, например, поликлональные антитела, моноклональные антитела, фрагменты антител; гуманизованные антитела, рекомбинантные антитела, рекомбинантные человеческие антитела, и приматизированные (Primatized™) антитела, цитокины, факторы роста, апоптические факторы, факторы, индуцирующие дифференцировку, рецепторы клеточной поверхности и их лиганды; гормоны; и малые молекулы, включая малые органические молекулы или соединения.

В одном варианте исполнения активный агент представляет собой терапевтический агент или его соль или производное. Производные терапевтического агента могут быть терапевтически активными сами или они могут быть пролекарствами, которые становятся активными при последующей модификации. Таким образом, в одном варианте исполнения производное терапевтического агента сохраняет некоторую часть или всю терапевтическую активность по сравнению с немодифицированным агентом, тогда как в другом варианте исполнения производное терапевтического агента не обладает терапевтической активностью.

В различных вариантах исполнения терапевтические агенты включают любой терапевтически эффективный агент или лекарственное средство, такие как противовоспалительные соединения, антидепрессанты, стимуляторы, анальгетики, антибиотики, противозачаточные средства, антипиретики, вазодилататоры, ангиангиогенные средства, цитоваскулярные (cytovascular) агенты, ингибиторы трансдукции сигналов, сердечно-сосудистые лекарственные препараты, например антиаритмические средства, вазоконстрикторы, гормоны и стероиды.

В определенных вариантах исполнения терапевтический агент представляет собой онкологическое лекарственное средство, которое также может быть названо противоопухолевым лекарственным средством, противораковым лекарственным средством, опухолевым лекарственным средством, антинеопластическим агентом и т.п. Примеры онкологических лекарственных средств, которые могут быть использованы в соответствии с изобретением, включают, без ограничения, адриамицин, алкеран, аллопуринол, алтретамин, амифостин, анастрозол, агаС, трехокись мышьяка, азатиоприн, бексаротен, biCNU, блеомицин, бусульфид внутривенно, бусульфид перорально, капецитабин (Xeloda), карбоплатин, кармустин, CCNU, целекоксиб, хлорамбуцил, цисплатин, кладрибин, циклоспорин А, цитарабин, цитозин арабинозид, даунорубин, цитоксан, даунорубин, дексаметасон, дексразоксан, додетаксель, доксорубин, доксорубин, DTIC, эпирубицин, эстрамустин, эпопозид фосфат, эпопозид и VP-16, экземестан, FK506, флударабин, фторурацил, 5-FU, гемцитабин (Gemzar), гемтузумаб-озогамицин, госерелин ацетат, гидреа, гидроксимочевину, идарубин, ифосфамид, иматиниб мезилат, интерферон, иринотекан (Camptostar, CPT-111), летрозол, лейковорин, лейстатин, лейпролид, левамисол, литретиноин, мегастрол, мелфалан, L-PAM, месна, метотрексат, метоксалан, митрамицин, митомицин, митоксантрон, азотные аналоги горчичного газа, паклитаксель, памидронат, пегадемазу, пентостатин, порфирин натрия, преднизон, ритуксан, стрептозоцин, STI-571, тамоксифен, таксотере, темозоламид, тенипозид, VM-26, топотекан (Нусатин), торемифен, третиноин, АТРА, валрубицин, велбан, винбластин, винкристин, VP16 и винорелбин. Другими примерами онкологических лекарственных средств, которые могут быть использованы в соответствии с изобретением, являются эллиптицин и аналоги или производные эллиптицина, эпотилоны, внутриклеточные ингибиторы киназы и камптотецины.

#### **Частицы нуклеиновая кислота-липид**

В определенных вариантах исполнения липидные частицы по изобретению ассоциированы с нуклеиновой кислотой, с образованием частиц нуклеиновая кислота-липид. В конкретных вариантах исполнения нуклеиновая кислота полностью инкапсулирована в липидной частице. В используемом тут значении подразумевается, что термин "нуклеиновая кислота" включает любой олигонуклеотид или полинуклеотид. Фрагменты, содержащие до 50 нуклеотидов, обычно называются олигонуклеотидами, а более крупные фрагменты называются полинуклеотидами. В конкретных вариантах исполнения олигонуклеотиды по изобретению имеют длину 20-50 нуклеотидов.

В контексте настоящего изобретения термины "полинуклеотид" и "олигонуклеотид" относятся к полимеру или олигомеру нуклеотидных или нуклеозидных мономеров, состоящих из природных основа-

ний, сахаров и межсахарных связей (основной цепи). Термины "полинуклеотид" и "олигонуклеотид" также включают полимеры или олигомеры, включающие неприродные мономеры или их части, обладающие аналогичными функциями. Такие модифицированные или замещенные олигонуклеотиды часто являются предпочтительными по сравнению с нативными формами из-за своих свойств, таких как, например, повышенное клеточное поглощение и повышенная стабильность в присутствии нуклеаз.

Олигонуклеотиды классифицируются на дезоксирибоолигонуклеотиды или рибоолигонуклеотиды. Дезоксирибоолигонуклеотид состоит из 5-атомного сахара, называемого дезоксирибозой, ковалентно связанного с фосфатом через атомы углерода 5' и 3' этого сахара, с образованием неразветвленного полимера с чередующимися звеньями. Рибоолигонуклеотид представляет собой аналогичную повторяющуюся структуру, в которой 5-атомным сахаром является рибоза.

Нуклеиновая кислота, присутствующая в частицах липид-нуклеиновая кислота в соответствии с настоящим изобретением, включает любую известную форму нуклеиновой кислоты. Нуклеиновые кислоты, используемые по настоящему изобретению, могут быть одноцепочечными ДНК или РНК, или двухцепочечными ДНК или РНК, или гибридами ДНК-РНК. Примеры двухцепочечных ДНК включают структурные гены, гены, включающие контрольные и терминирующие участки, и самореплицирующиеся системы, такие как вирусная или плазмидная ДНК. Примеры двухцепочечных РНК включают siРНК и другие реагенты РНК-интерференции. Одноцепочечные нуклеиновые кислоты включают, например, антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы, микроРНК, и образующие триплекс олигонуклеотиды.

Нуклеиновые кислоты по изобретению могут иметь разную длину, обычно зависящую от конкретной формы нуклеиновой кислоты. Например, в конкретных вариантах исполнения, плазмиды или гены могут иметь длину от примерно 1000 до 100000 нуклеотидных остатков. В конкретных вариантах исполнения, олигонуклеотиды могут иметь от примерно 10 до 100 нуклеотидов в длину. В различных родственных вариантах исполнения, олигонуклеотиды, как одноцепочечные, так и двухцепочечные и трехцепочечные, могут иметь в длину 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 конкретных вариантах исполнения олигонуклеотид (или его цепь) по изобретению специфически гибридизуется с или является комплементарной по отношению к полинуклеотиду-мишени. "Специфически гибридизуемый" и "комплементарный" являются терминами, используемыми для указания на достаточную степень комплементарности, так чтобы между ДНК- или РНК-мишенью и олигонуклеотидом происходило стабильное и специфическое связывание. Подразумевается, что олигонуклеотид не обязательно должен быть на 100% комплементарным с последовательностью его нуклеиновой кислоты-мишени для того, чтобы быть специфически гибридизуемым. Олигонуклеотид является специфически гибридизуемым, если связывание олигонуклеотида с мишенью препятствует нормальной функции молекулы-мишени, вызывая потерю ее полезной функции или ее экспрессии, и существует достаточная степень комплементарности для того, чтобы избежать неспецифического связывания олигонуклеотида с не являющимися мишенями последовательностями в условиях, при которых желательно специфическое связывание, т.е., в физиологических условиях в случае анализов *in vivo* или терапевтического лечения или, в случае анализов *in vitro*, в условиях, при которых проводятся анализы. Таким образом, в других вариантах исполнения этот олигонуклеотид содержит 1, 2 или 3 замещения оснований по сравнению с участком последовательности гена или мРНК, который является его мишенью или с которым он специфически гибридизуется.

#### **Нуклеиновые кислоты для РНК-интерференции**

В конкретных вариантах исполнения частицы нуклеиновая кислота-липид по изобретению ассоциированы с РНК-интерферирующими (РНКи) молекулами. Способы РНК-интерференции с использованием РНКи-молекул могут быть использованы для нарушения экспрессии гена или полинуклеотида, представляющего интерес. За последние 5 лет малые интерферирующие РНК (siРНК) по существу заменили антисмысловые ODN (олигодезоксинуклеотиды) и рибозимы как следующее поколение разрабатываемых нацеливаемых олигонуклеотидных лекарственных средств. SiРНК представляют собой РНК-дуплексы, нормально имеющие в длину 21-30 нуклеотидов, которые могут ассоциироваться с цитоплазматическим мультипротеиновым комплексом, известным как РНКи-индуцируемый комплекс подавления транскрипции (RISC). RISC, несущий siРНК, медирует деграцию гомологичных транскриптов мРНК, поэтому могут быть сконструированы siРНК, предназначенные для подавления экспрессии белка с высокой специфичностью. В отличие от других антисмысловых технологий, siРНК функционируют по естественному механизму, возникшему для контроля генной экспрессии посредством некодирующей РНК. Это обычно считается причиной того, что их активность *in vitro* и *in vivo* является более сильной, чем у антисмысловых ODN или рибозимов. В настоящее время в фармацевтике разрабатываются различные РНКи-реагенты, включая siРНК, нацеленные на клинически важные мишени, как описано, например, de Fougerolles, A. et al., Nature Reviews 6:443-453 (2007).

Если первые описанные РНКи-молекулы были РНК:РНК гибридами, содержащими как смысловую, так и антисмысловую цепи РНК, то к настоящему времени было продемонстрировано, что гибриды ДНК:антисмысловая РНК, гибриды смысловая РНК:антисмысловая ДНК и гибриды ДНК:ДНК способны

медиировать РНКи (Lamberton, J.S. and Christian, A.T., (2003) *Molecular Biotechnology* 24:111-119). Таким образом, изобретение включает использование молекул РНКи, содержащих любые из таких различных типов двухцепочечных молекул. В дополнение к этому, подразумевается, что молекулы РНКи могут быть использованы и введены в клетки в различных формах. Соответственно в используемом тут значении РНКи-молекулы охватывают всевозможные молекулы, способные индуцировать РНКи-ответ в клетках, включая, без ограничений, двухцепочечные полинуклеотиды, содержащие две отдельные нити, а именно, смысловую нить и антисмысловую нить, например малые интерферирующие РНК (siРНК); полинуклеотиды, включающие петлю шпильки комплементарных последовательностей, образующую двухцепочечную область, например молекулы shРНКи, и векторы экспрессии, которые экспрессируют один или несколько полинуклеотидов, способных образовывать двухцепочечный полинуклеотид сами или в комбинации с другим полинуклеотидом.

РНК-интерференция (РНКи) может быть использована для специфического ингибирования экспрессии полинуклеотидов-мишеней. Медируемая двухцепочечными РНК супрессия экспрессии генов и нуклеиновых кислот может быть осуществлена в соответствии с изобретением путем введения dsРНК, siРНК или shРНК в клетки или организмы. siРНК могут быть двухцепочечной РНК или гибридной молекулой, содержащей как РНК, так и ДНК, например одну нить РНК и одну нить ДНК. Было продемонстрировано, что прямое введение siРНК в клетку может инициировать РНКи в клетках млекопитающих (Elshabir, S.M., et al., *Nature* 411: 494-498 (2001)). Кроме того, супрессия в клетках млекопитающих наблюдалась при уровне РНК и была специфической для генов-мишеней, с сильной корреляцией между РНК и супрессией белка (Caplen, N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:9746-9747 (2001)). В дополнение к этому было показано, что различные клеточные линии, включая клетки HeLa S3, COS7, 293, NIH/3T3, A549, HT-29, CHO-K1 и MCF-7, являются восприимчивыми к определенному уровню подавления активности siРНК (Brown, D. et al. *TechNotes* 9(1): 1-7, доступна в интернете по адресу [www.dot.ambion.com/techlib/tn/91/912.html](http://www.dot.ambion.com/techlib/tn/91/912.html) (9/1/02)).

РНКи-молекулы, нацеленные на конкретные полинуклеотиды, могут быть легко получены в соответствии с процедурами, известными специалистам. 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, квалифицированному специалисту будет понятно, что широкий спектр разных молекул siРНК может быть использован для нацеливания на конкретный ген или транскрипт. В определенных вариантах исполнения, молекулы siРНК в соответствии с изобретением являются двухцепочечными и имеют 16-30 или 18-25 нуклеотидов в длину, включая все промежуточные целые значения. В одном варианте исполнения siРНК имеет 21 нуклеотид в длину. В определенных вариантах исполнения siРНК имеют выступающие 3'-концы из 0-7 нуклеотидов или выступающие 5'-концы из 0-4 нуклеотидов. В одном варианте исполнения молекула siРНК имеет выступающий 3'-конец из двух нуклеотидов. В одном варианте исполнения siРНК имеют 21 нуклеотид в длину с выступающими 3'-концами из двух нуклеотидов (т.е. они содержат комплементарный участок из 19 нуклеотидов между смысловой и антисмысловой цепями). В определенных вариантах исполнения выступающие концы представляют собой выступающие UU или dTdT 3'-концы.

В общем, молекулы siРНК являются полностью комплементарными к одной цепи молекулы ДНК-мишени, поскольку было показано, что даже одна неспаривающаяся пара оснований уменьшает степень подавления активности. В других вариантах исполнения siРНК может иметь модифицированный состав основной цепи, такой как, например, 2'-дезоксид- или 2'-О-метильные модификации. Однако в предпочтительных вариантах исполнения вся цепь siРНК не содержит 2'-дезоксид- или 2'-О-модифицированных оснований.

В другом варианте исполнения изобретение предусматривает клетку, включающую вектор для ингибирования экспрессии гена в клетке. Вектор включает регуляторную последовательность, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей по меньшей мере одну нить одной из dsРНК по изобретению.

В одном варианте исполнения сайты-мишени siРНК выбирают путем сканирования целевой последовательности транскрипта мРНК на наличие AA динуклеотидных последовательностей. Каждая AA динуклеотидная последовательность в комбинации с прилегающими с 3'-конца приблизительно 19 нуклеотидами является потенциальным сайтом-мишенью siРНК. В одном варианте исполнения сайты-мишени siРНК предпочтительно не расположены на 5'- и 3'-нетранслируемых участках (UTR) или в областях вблизи стартового кодона (на расстоянии приблизительно 75 оснований), поскольку белки, связывающиеся с регуляторными областями, могут препятствовать связыванию эндонуклеазного комплекса siRNP (Elshabir S. et al. *Nature* 411:494-498 (2001); Elshabir S. et al. *EMBO J.* 20:6877-6888 (2001)). В дополнение к этому потенциальные сайты-мишени могут быть подвергнуты сравнению с соответствующей геномной базой данных, такой как BLASTN 2.0.5, доступной на сервере NCBI по адресу [www.ncbi.nlm.gov](http://www.ncbi.nlm.gov), для исключения потенциальных последовательностей-мишеней со значительной гомологией с другими кодирующими последовательностями.

В конкретных вариантах исполнения короткая шпильчатая РНК составляет компонент нуклеиновой кислоты частиц нуклеиновая кислота-липид по изобретению. Короткая шпильчатая РНК (shРНК) пред-

ставляет собой форму шпилечной РНК, способной последовательность-специфически снижать экспрессию гена-мишени. Короткие шпилечные РНК могут обеспечивать преимущество по сравнению с siРНК при подавлении генной экспрессии, поскольку они являются в общем более стабильными и менее подверженными деградации в клеточной среде. Было установлено, что такое медируемое короткой шпилечной РНК подавление активности гена работает в различных нормальных и раковых клеточных линиях и в клетках млекопитающих, включая клетки мыши и человека (Paddison P. et al., *Genes Dev.* 16(8):948-58 (2002)). Кроме того, были получены трансгенные клеточные линии, несущие хромосомальные гены, кодирующие shРНК, полученные методами генной инженерии. Такие клетки способны конститутивно синтезировать shРНК, тем самым способствуя длительно действующему или конститутивному подавлению активности гена, которое может передаваться клеткам потомства (Paddison P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(3): 1443-1448 (2002)).

shРНК содержат структуру стебля петли. В определенных вариантах исполнения они могут иметь стебли различной длины, типично с от 19 до 29 нуклеотидами в длину или с любым их промежуточным числом. В определенных вариантах исполнения шпильки содержат стебли из 19-21 нуклеотида, тогда как в других вариантах исполнения шпильки содержат стебли из 27-29 нуклеотидов. В определенных вариантах исполнения размер петли составляет от 4 до 23 нуклеотидов в длину, хотя размер петли может быть больше 23 нуклеотидов, без значительного влияния на способность к подавлению активности. Молекулы shРНК могут содержать неспаривающиеся основания, например неспаривающиеся G-U основания в двух цепях стебля shРНК без снижения их активности. Фактически, в определенных вариантах исполнения, shРНК конструируются таким образом, чтобы они включали одну или несколько пар G-U в стебле шпильки для стабилизации шпильки, например, во время воспризведения в бактериях. Однако, типично требуется комплементарность между участком стебля, связывающимся с мРНК-мишенью (антисмысловая цепь) и мРНК, и неспаривание даже одной пары оснований в этой области может воспрепятствовать подавлению активности. Выступающие 5'- и 3'-концы не являются необходимыми, поскольку они, по-видимому, не критичны для функции shРНК, хотя они могут присутствовать (Paddison et al. (2002) *Genes & Dev.* 16(8):948-58).

#### МикроРНК

МикроРНК (miРНК) представляют собой сильно консервативный класс малых РНК-молекул, которые транскрибируются из ДНК в геномах растений и животных, но не транслируются в белки. Процессуемые miРНК представляют собой одноцепочечные молекулы РНК из примерно 17-25 нуклеотидов (nt), которые включаются в РНК-индуцируемый комплекс подавления транскрипции (RISC) и были идентифицированы как ключевые регуляторы развития, пролиферации клеток, апоптоза и дифференцировки. Считается, что они играют определенную роль в регуляции генной экспрессии путем связывания с 3'-нетранслируемым участком специфической мРНК. RISC медирует понижающую регуляцию генной экспрессии посредством ингибирования трансляции, расщепления транскриптов или обоими путями. RISC также участвует в подавлении транскрипции в ядре у широкого спектра эукариотов.

Число последовательностей miРНК, идентифицированных до настоящего времени, велико и продолжает возрастать, а их иллюстративные примеры приведены, 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 интернете по адресу [microrna.sanger.ac.uk/sequences/](http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/).

#### Антисмысловые олигонуклеотиды

В одном варианте исполнения нуклеиновая кислота представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, нацеленный на полинуклеотид-мишень. Термин "антисмысловой олигонуклеотид" или просто "антисмысловой" следует понимать как включающий олигонуклеотиды, комплементарные к полинуклеотидной последовательности-мишени. Антисмысловые олигонуклеотиды представляют собой одиночные цепи ДНК или РНК, комплементарные к выбранной последовательности. В случае антисмысловой РНК, они предотвращают трансляцию цепей комплементарной РНК путем связывания с ней. Антисмысловые ДНК могут быть использованы для нацеливания на специфическую, комплементарную (кодирующую или некодирующую) РНК. В случае протекания связывания такой гибрида ДНК/РНК может деградировать под действием фермента РНКазы Н. В конкретном варианте исполнения антисмысловые олигонуклеотиды содержат от примерно 10 до примерно 50 нуклеотидов, более предпочтительно от примерно 15 до примерно 30 нуклеотидов. Термин также охватывает антисмысловые олигонуклеотиды, которые могут не быть точно комплементарными к желательному гену-мишени. Таким образом, изобретение может быть использовано в тех случаях, когда антисмысловой олигонуклеотид проявляет неспецифическую по отношению к мишени активность или когда антисмысловая последовательность, содержащая одно или несколько оснований, не спаривающихся с последовательностью мишени, является наиболее предпочтительной для конкретного применения.

Было продемонстрировано, что антисмысловые олигонуклеотиды являются эффективными и целевыми ингибиторами синтеза белка и, следовательно, могут быть использованы для специфического ингибирования синтеза белка геном-мишенью. Эффективность антисмысловых олигонуклеотидов при ингибировании синтеза белка является надежно установленной. Например, синтез полигалактаураназы и

мускаринового типа 2 рецептора ацетилхолина ингибируется антисмысловыми олигонуклеотидами, нацеленными на соответствующие последовательности мРНК (патент США 5739119 и патент США 5759829). Кроме этого примеры антисмыслового ингибирования были продемонстрированы для ядерного белка циклина, гена множественной резистентности к лекарственным средствам (MDG1), ICAM-1, Е-селектина, STK-1, стриарного рецептора GABA<sub>A</sub> и человеческого EGF (фактор роста эпидермиса) (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; патент США 5801154; патент США 5789573; патент США 5718709 и патент США 5610288). Кроме этого были также описаны антисмысловые конструкторы, которые ингибируют и могут быть использованы для лечения различных аномальных клеточных пролифераций, например, рака (патент США 5747470; патент США 5591317 и патент США 5783683).

Способы продуцирования антисмысловых олигонуклеотидов известны специалистам и могут быть легко адаптированы для получения антисмыслового олигонуклеотида, нацеленного на любую полинуклеотидную последовательность. Выбор антисмысловой олигонуклеотидной последовательности, специфической по отношению к данной последовательности-мишени, основан на анализе выбранной последовательности-мишени и определении вторичной структуры, T<sub>m</sub>, энергии связи и относительной стабильности. Антисмысловые олигонуклеотиды могут быть выбраны на основании их относительной неспособности к образованию димеров, шпилек или других вторичных структур, которые должны ослаблять специфическое связывание с целевой мРНК в клетке-хозяине или препятствовать ему. В высшей степени предпочтительные области-мишени мРНК включают участки вокруг или поблизости от кодона инициации трансляции AUG, и последовательности, по существу комплементарные к 5'-участкам мРНК. Такие определения вторичной структуры и выбор сайта-мишени могут быть осуществлены, например, с помощью прикладной программы для анализа праймеров OLIGO v.4 (Molecular Biology Insights) и/или алгоритмической прикладной программы BLASTN 2.0.5 (Altschul et al., *Nucleic Acids Res*. 1997, 25(17):3389-402).

#### Рибозимы

В соответствии с другим вариантом исполнения изобретения, частицы нуклеиновая кислота-липид ассоциированы с рибозимами. Рибозимы представляют собой комплексы РНК-белок, имеющие специфические каталитические домены, обладающие 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 рибозим ускоряют реакции переноса сложного фосфоэфира с высокой степенью специфичности, часто отщепляя только одну из нескольких фосфоэфирных групп олигонуклеотидного субстрата (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). Такая специфичность была объяснена требованием связывания субстрата посредством специфических взаимодействий "и" спариванием оснований с внутренней адапторной последовательностью (internal guide sequence, "IGS") рибозима перед химической реакцией.

В настоящее время известны по меньшей мере шесть основных разновидностей природных ферментативных РНК. Каждая из них может катализировать гидролиз фосфодиэфирных связей РНК in trans (и, таким образом, может расщеплять другие молекулы РНК) в физиологических условиях. В общем, ферментативные нуклеиновые кислоты действуют путем связывания сначала с РНК-мишенью. Такое связывание осуществляется посредством участка связывания с мишенью ферментативной нуклеиновой кислоты, который удерживается в непосредственной близости к ферментативному участку молекулы, расщепляющей РНК-мишень. Таким образом, ферментативная нуклеиновая кислота сначала распознает и затем связывает РНК-мишень посредством комплементарного спаривания оснований, и после связывания с правильным сайтом, осуществляет ферментативное воздействие, разрезая РНК-мишень. Стратегическое расщепление такой РНК-мишени будет уничтожать ее способность направлять синтез закодированного белка. После связывания ферментативной нуклеиновой кислоты с РНК-мишенью и ее расщепления, она освобождается от этой РНК для поиска другой мишени и может повторно связываться с новыми мишенями и расщеплять их.

Молекула ферментативной нуклеиновой кислоты может быть сформирована, например, в виде головки молотка, шпильки, вируса гепатита 5, интрона группы I или РНК РНКазыР (в ассоциации с направляющей последовательностью РНК) или РНК мотива Neurospora VS. Конкретные примеры мотивов головки молотка описаны Rossi et al. *Nucleic Acids Res*. 1992 Sep 11; 20(17):4559-65. Примеры мотивов шпильки описаны Hampel et al. (публикация европейской патентной заявки № 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 в патенте США 5631359. Пример мотива вируса гепатита 5 описан Perrotta and Been, *Biochemistry*. 1992 Dec 1; 31(47): 11843-52; пример мотива РНКазыР описан Guerrier-Takada et al., *Cell*. 1983 Dec; 35(3 Pt 2):849-57; мотив РНК рибозима Neurospora VS описан 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 группы I описан в патенте США 4987071. Важными характеристиками молекул ферментативных нуклеиновых кислот, используемых в соответст-

вии с изобретением, является то, что они имеют специфический субстрат-связывающий сайт, комплементарный к одному или нескольким участкам ДНК или РНК гена-мишени, и что они имеют нуклеотидные последовательности, расположенные в или вокруг такого субстрат-связывающего сайта, которые придают молекуле способность расщеплять РНК. Таким образом, рибозимные конструкторы не обязательно должны быть ограничены конкретными описанными тут мотивами.

Способы получения рибозим, нацеленных на какие-либо полинуклеотидные последовательности, известны специалистам. Рибозимы могут быть сконструированы, как описано в публикации международной патентной заявки № WO 93/23569 и публикации международной патентной заявки № WO 94/02595, каждая из которых конкретно включена сюда посредством ссылки, и синтезированы для проведения испытаний *in vitro* и *in vivo*, как описано в них.

Активность рибозим может быть оптимизирована путем изменения длины связывающих цепей (*binding arms*) рибозим или химического синтеза рибозим с модификациями, препятствующими их деградации рибонуклеазами сыворотки (см. например, публикацию международной патентной заявки № WO 92/07065; публикацию международной патентной заявки № WO 93/15187; публикацию международной патентной заявки № WO 91/03162; публикацию европейской патентной заявки № 92110298.4; патент США 5334711 и публикацию международной патентной заявки № WO 94/13688, где описаны различные химические модификации, которые могут быть выполнены для сахарных фрагментов молекул ферментативных РНК), модификациями, повышающими их эффективность в клетках, и удаления оснований стебля II для сокращения времени синтеза РНК и снижения уровня химических требований.

Дополнительные специфические последовательности нуклеиновых кислот олигонуклеотидов (ODN), пригодные для использования в композициях и способах по изобретению, описаны в патентной заявке США 60/379343, патентной заявке США № 09/649527, международной публикации WO 02/069369, международной публикации № WO 01/15726, патенте США № 6406705 и Raney et al., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298:1185-1192 (2001). В определенных вариантах исполнения ODN, используемые в композициях и способах по изобретению, имеют фосфодиэфирную ("PO") основную цепь или фосфоротиоатную ("PS") основную цепь, и/или по меньшей мере один метилированный цитозинный остаток в CpG-мотиве.

#### Модификации нуклеиновой кислоты

В 1990-е годы антисмысловые олигодезоксинуклеотиды (ODN) и рибозимы (РНК) на основе ДНК представляли собой восхитительную новую парадигму проектирования и разработки лекарственных средств, но их применению *in vivo* препятствовала эндо- и экзонуклеазная активность, а также отсутствие успешной внутриклеточной доставки. Проблема деградации была эффективно решена после проведения большого количества исследований методов химической модификации, препятствующей распознаванию олигонуклеотидных (*oligo*) лекарственных средств нуклеазными ферментами, но не ингибирующей их механизм действия. Эти исследования были настолько успешными, что разрабатываемые сегодня антисмысловые ODN-лекарственные средства остаются интактными *in vivo* на протяжении дней по сравнению с минутами для немодифицированных молекул (Kurreck, J. 2003. *Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications*. *Eur J Biochem* 270:1628-44). Однако вопросы внутриклеточной доставки и механизма действия до настоящего времени мешали превращению антисмысловых ODN и рибозимов в клинические продукты.

РНК-дуплексы по своей природе являются более стабильными к нуклеазам, чем одноцепочечные ДНК или РНК и, в отличие от антисмысловых ODN, немодифицированные siРНК демонстрируют хорошую активность после попадания в цитоплазму. Даже в таком случае химические модификации, разработанные с целью стабилизации антисмысловых ODN и рибозимов, также систематически применялись к siРНК для определения степени толерантности химических модификаций и возможности повышения фармакокинетической и фармакодинамической активности. РНК-интерференция siРНК-дуплексами требует присутствия антисмысловой и смысловой цепей, которые имеют разные функции. Обе они необходимы для обеспечения возможности вхождения siРНК в RISC, но после их введения две цепи разделяются и смысловая нить деградирует, в то время как антисмысловая нить остается для нацеливания RISC на мРНК-мишень. Вхождение в RISC представляет собой процесс, который является структурно менее суровым, чем распознавание и расщепление мРНК-мишени. Следовательно, возможно большое количество разных химических модификаций смысловой цепи, но антисмысловая цепь выдерживает лишь ограниченные изменения (Zhang et al., 2006).

Как известно специалистам, нуклеозид представляет собой комбинацию основание-сахар. Нуклеотиды являются нуклеозидами, которые дополнительно содержат фосфатную группу, ковалентно связанную с сахарной частью нуклеозида. Для нуклеозидов, включающих пентофуранозильный сахар, фосфатная группа может быть присоединена к 2'-, 3'- или 5'-гидроксильной группе сахара. При формировании олигонуклеотидов фосфатные группы ковалентно связывают соседние нуклеозиды друг с другом с образованием линейного полимерного соединения. В свою очередь, соответствующие концы этой линейной полимерной структуры могут быть далее соединены с образованием кольцевой структуры. В олигонуклеотидной структуре фосфатные группы обычно называются формирующими межнуклеозидную основную цепь олигонуклеотида. Нормальными связями или основной цепью РНК и ДНК являются 3'-5' фос-

фосфодиэфирные связи.

Нуклеиновая кислота, используемая в частицах липид-нуклеиновая кислота в соответствии с настоящим изобретением, включает любую известную форму нуклеиновой кислоты. Таким образом, нуклеиновая кислота может быть модифицированной нуклеиновой кислотой типа, ранее использовавшегося для повышения резистентности к нуклеазе и стабильности в сыворотке. Неожиданно, однако, приемлемые терапевтические продукты также могут быть получены с использованием способа по изобретению приготовления частиц липид-нуклеиновая кислота из нуклеиновых кислот, не имеющих модификаций фосфодиэфирных связей природных полимеров нуклеиновых кислот, а использование немодифицированных фосфодиэфирных нуклеиновых кислот (т.е., нуклеиновых кислот, в которых все связи представляют собой фосфодиэфирные связи) является предпочтительным вариантом исполнения изобретения.

#### Модификации основной цепи

Антисмысловые, siРНК и другие олигонуклеотиды, пригодные для использования в данном изобретении, включают, без ограничения, олигонуклеотиды, содержащие модифицированные основные цепи или неприродные межнуклеозидные связи. Олигонуклеотиды, имеющие модифицированные основные цепи, включают соединения, сохраняющие атом фосфора в основной цепи, и соединения, не имеющие атома фосфора в основной цепи. Модифицированные олигонуклеотиды, не имеющие атома фосфора в своей межнуклеозидной основной цепи, также могут считаться олигонуклеотидами. Модифицированные олигонуклеотидные основные цепи включают, например, фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминокилфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, включая 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включая 3'-аминофосфорамидат, и аминокилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тиоалкилфосфонаты, тиоалкилфосфотриэфиры, фосфороселенатные, метилфосфонатные или О-алкилфосфотриэфирные связи, и боранофосфаты, имеющие нормальные 3'-5' связи, аналоги таких материалов с 2'-5' связями, и материалы, имеющие обращенную полярность связей, в которых пары соседних нуклеозидных звеньев соединены 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'. Конкретные неограничивающие примеры конкретных модификаций, которые могут присутствовать в нуклеиновой кислоте в соответствии с изобретением, приведены в табл. 2.

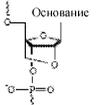
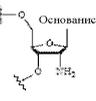
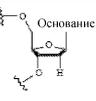
Различные соли, смешанные соли и формы свободной кислоты также включены в объем изобретения. Типичные примеры патентов США, описывающих получение вышеуказанных связей, включают, без ограничения, патенты США №№ 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177196; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541306; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361 и 5625050.

В определенных вариантах исполнения модифицированные олигонуклеотидные основные цепи, не содержащие атома фосфора, представляют собой основные цепи, сформированные короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, смешанными гетероатомными и алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями или одной или несколькими короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями. Они включают, например, материалы, имеющие морфолиносвязи (образованные частично сахарной частью нуклеозида); силосановые основные цепи; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые основные цепи; формацетильные и тиоформацетильные основные цепи; метиленаформацетильные и -тиоформацетильные основные цепи; алкеносодержащие основные цепи; сульфаматные основные цепи; метилениминовые и метиленигидразиновые основные цепи; сульфонатные и сульфонамидные основные цепи; амидные основные цепи и другие, содержащие смешанные N, O, S и CH<sub>2</sub> компоненты. Типичные патенты США, описывающие вышеуказанные олигонуклеозиды, включают, без ограничения, 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 основной цепи (табл. 3, № 1), в которой немостииковый кислород фосфодиэфирной связи замещен серой, является одним из самых ранних и наиболее распространенных средств, используемых для стабилизации лекарственных средств на основе нуклеиновой кислоты от деградации нуклеазой. В общем, по-видимому, PS модификации могут выполняться в больших количествах для обеих цепей siРНК без значительного влияния на активность (Kugeck J., Eur. J. Biochem. 270:1628-44, 2003). Однако известно, что PS-олигосоединения (oligos) активно неспецифически ассоциируются с белками, вызывая токсичность, особенно при внутривенном (i.v.) введении. Поэтому PS модификация обычно ограничена одним или двумя основаниями на 3'-и 5'-концах. Боранофосфатный линкер (табл. 3, № 2) является недавно разработанной модификацией, которая, по-видимому, является более стабильной, чем PS, повышает активность siРНК и имеет низкую токсичность (Hall et al., Nucleic Acids Res. 32: 5991-6000, 2004).

Таблица 3. Химические модификации, применяемые для siРНК и других нуклеиновых кислот

№	Сокращение	Наименование	Место модификации	Структура
1	PS	Фосфоротиоат	Основная цепь	
2	PB	Боранофосфат	Основная цепь	
3	N3-MU	N3-метил-уридин	Основание	
4	5'-BU	5'-бром урацил	Основание	
5	5'-IU	5'-йодурацил	Основание	
6	2,6-DP	2,6-диаминопурин	Основание	
7	2'-F	2'-Фтор	Сахар	
8	2'-OME	2''-О-метил	Сахар	
9	2'-O-MOE	2'-О-(2-метоксилэтил)	Сахар	
10	2'-DNP	2'-О-(2,4-динитрофенил)	Сахар	

11	LNA	Заблокированная нуклеиновая кислота (метиленовый мостик, соединяющий 2'-кислород с 4'-углеродом рибозного кольца)	Сахар	
12	2'-Амино	2'-Амино	Сахар	
13	2'-Дезокси	2'-Дезокси	Сахар	
14	4'-тио	4'-тио-рибонуклеотид	Сахар	

Другие пригодные производные нуклеиновых кислот включают молекулы нуклеиновых кислот, в которых мостиковые атомы кислорода (образующие фосфоэфирные связи) замещены на -S-, -NH-, -CH<sub>2</sub>- и т.п. В определенных вариантах исполнения изменения используемых антисмысловых, siРНК или других нуклеиновых кислот не будут полностью устранять отрицательный заряд, ассоциированный с нуклеиновыми кислотами. Таким образом, изобретение предусматривает использование антисмысловых, siРНК, и других нуклеиновых кислот, в которых часть связей замещена, например, на нейтральные метилфосфонатные или фосфорамидатные связи. В случае использования нейтральных связей, в определенных вариантах исполнения, таким образом будет замещено менее 80% связей нуклеиновой кислоты или менее 50% связей.

#### Модификации оснований

Модификации оснований являются менее распространенными, чем основной цепи и Сахаров. По-видимому, все модификации, указанные в 0.3-6, стабилизируют siРНК против нуклеазы и незначительно влияют 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 могут также включать модификации или замещения гетероциклических оснований нуклеиновых кислот (nucleobase) (часто называемых специалистами просто "основания"). В используемом тут значении "немодифицированные" или "природные" гетероциклические основания нуклеиновых кислот включают пуриновые основания аденин (A) и гуанин (G) и пиримидиновые основания тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). Модифицированные гетероциклические основания нуклеиновых кислот включают другие синтетические и природные гетероциклические основания нуклеиновых кислот, такие как 5-метилцитозин (5-me-C или m5c), 5-гидроксицитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метильные и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропильные и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галоидурацил и -цитозин, 5-пропинилурацил и -цитозин, 6-азоурацил, -цитозин и -тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоид-, 8-амино-, 8-тиол-, 8-тиоалкил-, 8-гидроксил- и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоид, особенно 5-бром-, 5-трифторметил- и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-дезазагуанин и 7-дезазааденин и 3-дезазагуанин и 3-дезазааденин.

Определенные гетероциклические основания нуклеиновых кислот являются особенно пригодными для увеличения аффинности связывания олигомерных соединений по изобретению, включая 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и O-6 замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Было показано, что замещения 5-метилцитозина 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 быть скомбинированы, в конкретных вариантах исполнения, с 2'-O-метоксиэтильными модификациями сахаров. Патенты США, описывающие получение некоторых таких модифицированных гетероциклических оснований нуклеиновых кислот, а также других модифицированных гетероциклических оснований нуклеиновых кислот, включают, без ограничения, вышеупомянутый 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 сахаров

Большинство модификаций группы сахара производится в положении 2'-ОН сахарного кольца РНК, которое обеспечивает удобный химически реакционноспособный центр (Manoharan, M. 2004. RNA Interference with 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). 2'-F и TOME (0,7 и 8) являются обычно используемыми и обе повышают стабильность, модификация 2'-OME не снижает активность, при условии, что она ограничена менее чем 4 нуклеотидами на цепь (Holen, T., Amarzguioui, M., Babaie, E., Prydz, H. 2003. Similar behaviour of single-strand and double-strand siRNA suggests they act through a common RNAi pathway. *Nucleic Acids Res* 31:2401-7). 2'-O-MOE (0,9) является наиболее эффективной в siРНК, когда модифицированные основания ограничиваются средним участком молекулы (Prakash, T.P., Allerson, CR., 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, способные стабилизировать siРНК без потери активности, указаны в 0.10-14.

Модифицированные олигонуклеотиды могут также содержать один или несколько замещенных фрагментов сахара. Например, изобретение включает олигонуклеотиды, содержащие в 2'-положении один из следующих: ОН; F; O-, S-или N-алкил, O-алкил-O-алкил, O-, S- или N-алкенил, или O-, S- или N-алкинил, где алкил, алкенил и алкинил могут быть замещенным или незамещенным C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилом или C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> алкенилом и алкинилом. Особенно предпочтительными являются O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub> и O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, где n и m имеют значения от 1 до примерно 10. Другие предпочтительные олигонуклеотиды содержат в 2'-положении один из следующих: C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> низший алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминоалкиламино, полиалкиламино, замещенный силил, расщепляющая РНК группа, репортерная группа, интеркалятор, группа для улучшения фармакокинетических свойств олигонуклеотида или группа для улучшения фармакодинамических свойств олигонуклеотида, и другие заместители, обладающие подобными свойствами. Одна из модификаций включает 2'-метоксиэтокси (2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, также известный как 2'-O-(2'-метоксиэтил) или 2'-MOE) (Martin et al., *Helv. Chim. Acta* 1995, 78, 486-504), т.е., алкоксиалкоксигруппу. Другие модификации включают 2'-диметиламинооксиэтокси, т.е., O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> группу, также известную как 2'-DMAOE, и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (2'-DMAEOE).

Дополнительные модификации включают 2'-метокси (2'-O-CH<sub>3</sub>), 2'-аминопропокси (2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) и 2'-фтор (2'-F). Аналогичные модификации также могут быть выполнены в других положениях олигонуклеотида, в частности в 3'-положении сахара 3'-концевого нуклеотида или 2'-5'-соединенных олигонуклеотидов, и в 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. Олигонуклеотиды могут также содержать миметики сахара, такие как циклобутильные фрагменты вместо пентофуранозильного сахара. Типичные примеры патентов США, описывающих получение таких модифицированных сахарных структур, включают, без ограничения, 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 олигонуклеотидных миметиках как сахар, так и межнуклеозидная связь, т.е., основная цепь, нуклеотидных звеньев замещается на новые группы, хотя звенья оснований сохраняются для гибридизации с соответствующим соединением-мишенью нуклеиновой кислоты. Одно из таких олигомерных соединений, олигонуклеотидный миметик, продемонстрировавший прекрасную способность к гибридизации, называется пептидной нуклеиновой кислотой (ПНК). В ПНК-соединениях сахарная основная цепь олигонуклеотида замещается на амидсодержащую основную цепь, в частности аминоктилглициновую основную цепь. Гетероциклические основания нуклеиновых кислот сохраняются и связываются непосредственно или опосредованно с аза-атомами азота амидной части основной цепи. Типичные патенты США, описывающие получение ПНК-соединений, включают, без ограничений, патенты США №№ 5539082; 5714331; и 5719262. Дополнительное описание ПНК-соединений приведено у Nielsen et al. (*Science*, 1991, 254, 1497-1500).

Конкретными вариантами исполнения изобретения являются олигонуклеотиды с фосфоротиоатными основными цепями и олигонуклеозиды с гетероатомными основными цепями, в частности, -CH<sub>2</sub>-NH-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>- (называемый метилен(метилиминовой) или MMI основной цепью) -CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>- и -O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- (где нативная фосфодиэфирная основная цепь представлена как -O-P-O-CH<sub>2</sub>-) вышеупомянутого патента США № 5489677, и амидные основные цепи вышеупомянутого патента США № 5602240. Также предпочтительными являются олигонуклеотиды, имеющие морфолиновые структуры основной цепи, по вышеупомянутому патенту США № 5034506.

### Химерные олигонуклеотиды

Нет необходимости в том, чтобы все позиции данного соединения были равномерно модифициро-

ваны, и в действительности, несколько вышеупомянутых модификаций может быть выполнено в одном соединении или даже в одном нуклеозиде олигонуклеотида. Определенные предпочтительные олигонуклеотиды по настоящему изобретению являются химерными олигонуклеотидами. "Химерные олигонуклеотиды" или "химеры" в контексте настоящего изобретения представляют собой олигонуклеотиды, содержащие две или больше химически различные области, каждая из которых состоит из по меньшей мере одного нуклеотида. Такие олигонуклеотиды типично содержат по меньшей мере одну область модифицированных нуклеотидов, которая придает им одно или несколько полезных свойств (таких как, например, повышенная резистентность к нуклеазе, повышенное поглощение клетками, повышенная аффинность связывания с РНК-мишенью) и область, являющуюся субстратом для расщепления РНКазой Н.

В одном варианте исполнения химерный олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну область, модифицированную с целью увеличения аффинности связывания с мишенью. Аффинность олигонуклеотида к его мишени в обычном порядке определяется путем измерения величины  $T_m$  пары олигонуклеотид/мишень, представляющей собой температуру, при которой олигонуклеотид и мишень диссоциируют; диссоциация детектируется спектрофотометрически. Чем выше значение  $T_m$ , тем больше аффинность олигонуклеотида по отношению к мишени. В одном варианте исполнения область олигонуклеотида, модифицированная для увеличения аффинности связывания мРНК-мишени, содержит по меньшей мере один нуклеотид, модифицированный в 2'-положении сахара, наиболее предпочтительно 2'-О-алкил-, 2'-О-алкил-О-алкил-или 2'-фтормодифицированный нуклеотид. Такие модификации в обычном порядке вводятся в олигонуклеотиды и было показано, что такие олигонуклеотиды имеют более высокие значения  $T_m$  (т.е., более высокую аффинность связывания с мишенью), чем 2'-дезоксидолигонуклеотиды по отношению к данной мишени. Эффект такой повышенной аффинности заключается в значительном усилении ингибирования олигонуклеотидом генной экспрессии мишени.

В другом варианте исполнения химерный олигонуклеотид содержит область, выступающую в роли субстрата для РНКазы Н. Конечно, подразумевается, что олигонуклеотиды могут включать любую комбинацию различных модификаций, описанных тут.

Другая модификация олигонуклеотидов по изобретению предусматривает химическое связывание с олигонуклеотидом одного или нескольких фрагментов или конъюгатов, которые повышают активность, клеточное распределение или поглощение олигонуклеотида клетками. Такие конъюгаты и способы их получения известны специалистам.

Квалифицированным специалистам будет понятно, что в отношении пригодности к применению *in vivo*, такой как терапевтическая эффективность, разумное эмпирическое правило заключается в том, что если тионированный вариант последовательности работает в свободной форме, то инкапсулированные частицы этой же последовательности также будут эффективными с любой химией. Инкапсулированные частицы могут также иметь более широкий спектр применения *in vivo*, демонстрируя эффективность в условиях и моделях, которые в других условиях являются невосприимчивыми к антисмысловой терапии. Квалифицированным специалистам понятно, что применяя настоящее изобретение, они могут обнаружить старые модели, которые теперь реагируют на антисмысловую терапию. Кроме того, они могут вернуться к ранее отклоненным антисмысловым последовательностям или химическим процедурам и обнаружить их эффективность при использовании изобретения.

Олигонуклеотиды, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть удобно и просто получены с помощью хорошо известной методики твердофазового синтеза. Оборудование для такого синтеза продается несколькими поставщиками, включая Applied Biosystems. Также могут быть использованы любые другие средства для такого синтеза; в действительности, синтез олигонуклеотидов вполне по силам консервативному специалисту (*routineer*). Также хорошо известно использование аналогичных методик для получения других олигонуклеотидов, таких как фосфоротиоаты и алкилированные производные.

### Определения

Для удобства, ниже приведены значения определенных терминов и фраз, используемых в описании, примерах и приложенной формуле изобретения. При наличии очевидных расхождений между практикой применения термина в других частях настоящего описания и его определением, приведенным в данном разделе, главенствующим должно считаться определение в данном разделе.

Каждый из "G", "C", "A" и "U" в общем обозначает нуклеотид, содержащий в качестве основания гуанин, цитозин, аденин и урацил соответственно. Однако следует понимать, что термин "рибонуклеотид" или "нуклеотид" может также относиться к модифицированному нуклеотиду, как детальнее описано ниже, или к суррогатному замещающему фрагменту. Квалифицированному специалисту хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин, и урацил могут быть замещены на другие фрагменты без существенного изменения способности олигонуклеотида к спариванию оснований, включая нуклеотид, несущий такой замещающий фрагмент. Например, без ограничений, нуклеотид, включающий в качестве основания инозин, может спариваться с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Таким образом, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин, могут быть замещены в нуклеотидных последовательностях по изобретению на нуклеотид, содержащий, например, инозин. Последовательности, включающие такие замещающие фрагменты, являются вариантами исполнения изобретения.

Под "Фактором VII", в используемом тут значении, подразумевается мРНК, белок, пептид или полипептид Фактора VII. Термин "Фактор VII" также известен специалистам как A1132620, Cf7, прекурсор фактора коагуляции VII, фактор коагуляции VII, FVII, сывороточный акселератор конверсии протромбина, белок коагуляции FVII и эптаког-альфа (eptacog alfa).

В используемом тут значении "последовательность-мишень" относится к непрерывному участку нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образующейся в процессе транскрипции гена, включая мРНК, являющуюся продуктом РНК-процессинга первичного продукта транскрипции.

В используемом тут значении термин "цепь, включающая последовательность", относится к олигонуклеотиду, содержащему цепочку нуклеотидов, описываемую упомянутой последовательностью, с использованием стандартной нуклеотидной номенклатуры.

В используемом тут значении и если не указано иное, термин "комплементарный", при использовании в контексте пары нуклеотидов, означает классическую пару по Уотсону-Крику (Watson-Crick), т.е., GC, AT или AU. Он также распространяется на классическое спаривание по Уотсону-Крику, в котором один или оба нуклеотида были модифицированы, как описано тут, например, путем модификации рибозы или модификации фосфатной основной цепи. Он может также включать спаривание с инозином или другим объектом, существенно не меняющим способность оснований к спариванию.

В используемом тут значении, и если не указано иное, термин "комплементарный", при использовании для описания первой нуклеотидной последовательности по отношению ко второй нуклеотидной последовательности относится к способности олигонуклеотида или полинуклеотида, включающего первую нуклеотидную последовательность, гибридизироваться и образовывать дуплексную структуру в определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, включающим вторую нуклеотидную последовательность, как будет понятно квалифицированному специалисту. Комплементарность может включать полную комплементарность, существенную комплементарность и достаточную комплементарность, позволяющие гибридизацию в физиологических условиях, например, в физиологически пригодных условиях, которые могут существовать внутри организма. Полная комплементарность относится к комплементарности, как определено выше для индивидуальной пары, по всем парам первой и второй последовательностей. Если последовательность является "существенно комплементарной" по отношению ко второй последовательности в данном изобретении, то две последовательности могут быть полностью комплементарными или они могут образовывать одну или несколько, но обычно не более 4, 3 или 2 неспаривающихся при гибридизации пар оснований, при сохранении способности к гибридизации в условиях, наиболее пригодных для их целевого применения. Существенная комплементарность также может быть определена как гибридизация в суровых условиях, где суровые условия могут включать: 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA, 50 или 70°C в течение 12-16 ч с последующим промыванием. Квалифицированный специалист может определить набор условий, наиболее пригодных для тестирования комплементарности двух последовательности с учетом целевого применения гибридизованных нуклеотидов.

Однако в тех случаях, когда два олигонуклеотида конструируются с образованием при гибридизации одного или нескольких одноцепочечных выступающих концов, такие выступающие концы не должны считаться неспаривающимися основаниями при определении комплементарности. Например, dsРНК, содержащая один олигонуклеотид, имеющий 21 нуклеотид в длину, и другой олигонуклеотид, имеющий 23 нуклеотида в длину, причем более длинный олигонуклеотид включает последовательность из 21 нуклеотида, полностью комплементарную по отношению к более короткому олигонуклеотиду, может быть названа "полностью комплементарной" в целях изобретения.

"Комплементарные" последовательности в используемом тут значении могут также включать или быть сформированы целиком из пар нуклеотидов, не соответствующих модели Уотсона-Крика и/или пар нуклеотидов, сформированных из неприродных и модифицированных нуклеотидов, при условии выполнения вышеуказанных требований в отношении их способности к гибридизации.

Термины "комплементарный", "полностью комплементарный", "существенно комплементарный" и комплементарность, достаточная для обеспечения гибридизации в физиологических условиях, например в физиологически пригодных условиях, которые могут существовать внутри организма, могут быть использованы тут в отношении спаривания оснований между смысловой цепью и антисмысловой цепью dsРНК или между антисмысловой цепью dsРНК и последовательностью-мишенью, как будет понятно из контекста их применения.

В используемом тут значении полинуклеотид, который является "комплементарным, например, по существу комплементарным к по меньшей мере части" матричной РНК (мРНК), относится к полинуклеотиду, который является комплементарным, например, по существу комплементарным, к непрерывному участку мРНК, представляющей интерес (например, кодирующей Фактор VII). Например, полинуклеотид комплементарен к по меньшей мере части мРНК Фактора VII, если последовательность является, по существу, комплементарной к непрерывному участку мРНК, кодирующей Фактор VII.

Термин "двухцепочечные РНК" или "dsРНК" в используемом тут значении относится к молекуле рибонуклеиновой кислоты или комплексу молекул рибонуклеиновой кислоты, имеющим дуплексную структуру, включающую две антипараллельные и существенно комплементарные, как определено выше,

цепи нуклеиновой кислоты. Две цепи, образующие дуплексную структуру, могут быть разными участками одной более крупной молекулы РНК или они могут быть отдельными молекулами РНК. В тех случаях, когда две цепи являются частью одной более крупной молекулы и поэтому соединены непрерывной цепочкой нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующей дуплексную структуру, соединительная цепочка РНК называется "петлей шпильки". Если две цепи соединены ковалентно другими средствами, отличными от непрерывной цепочки нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующей дуплексную структуру, то соединительная структура называется "линкером". Цепи РНК могут одержать одинаковое или разное число нуклеотидов. Максимальным числом пар нуклеотидов является число нуклеотидов в более короткой цепи dsРНК. В дополнение к дуплексной структуре dsРНК может иметь один или несколько выступающих на концах нуклеотидов. dsРНК в используемом тут значении также называется "малой ингибирующей РНК", "siРНК", "агентом на основе siРНК", "агентом на основе iРНК" или "агентом РНКи".

В используемом тут значении "выступающий нуклеотидный конец" относится к неспаренному нуклеотиду или нуклеотидам, которые выступают за границы дуплексной структуры dsРНК, когда 3'-конец одной цепи dsРНК выступает дальше 5'-конца другой цепи или наоборот. "Тупой" или "тупой конец" означает, что на этом конце dsРНК нет неспаренных нуклеотидов, т.е., отсутствует выступающий нуклеотидный конец. dsРНК "с тупым концом" представляет собой dsРНК, которая является двухцепочечной по всей своей длине, т.е., не имеет выступающих нуклеотидных концов на любом конце молекулы.

Термин "антисмысловая цепь" относится к цепи dsРНК, включающей область, по существу, комплементарную к последовательности-мишени. В используемом тут значении, термин "область комплементарности" относится к участку антисмысловой цепи, который является по существу комплементарным к последовательности, например, последовательности-мишени, как определено в данном описании. Если область комплементарности не является полностью комплементарной к последовательности-мишени, то неспаренные нуклеотиды являются наиболее допустимыми в терминальных участках и, в случае их присутствия, обычно расположены на терминальном участке или участках, например, на расстоянии не более 6, 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов от 5'- и/или 3'-конца.

Термин "смысловая цепь", в используемом тут значении, относится к цепи dsРНК, которая включает область, по существу комплементарную к участку антисмысловой цепи.

Термин "идентичность" обозначает соотношение между двумя или больше полинуклеотидными последовательностями, определяемое путем сравнения последовательностей. Идентичность также означает степень сродства между полинуклеотидными последовательностями, определяемую путем сопоставления цепей таких последовательностей. Хотя существует ряд способов измерения идентичности двух полинуклеотидных последовательностей, термин хорошо известен квалифицированным специалистам (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)). "По существу идентичный", в используемом тут значении, означает наличие очень высокой степени гомологии (предпочтительно 100% идентичности последовательностей) между смысловой нитью dsРНК и соответствующей частью гена-мишени. Однако dsРНК, имеющие идентичность последовательностей более 90 или 95%, могут быть использованы по изобретению и, таким образом, варианты последовательностей, появления которых следует ожидать вследствие генетической мутации, видового полиморфизма или эволюционной дивергенции, могут быть приемлемыми. Хотя 100% идентичность является предпочтительной, dsРНК может содержать единичные или множественные случайные несовпадающие пары оснований между РНК и геном-мишенью.

"Введение в клетку", по отношению к dsРНК означает создание условий, способствующих поглощению или абсорбции клеткой, в значении, понятном квалифицированным специалистам. Абсорбция или поглощение dsРНК может происходить посредством протекающих без посторонней помощи диффузионных или активных клеточных процессов или с помощью вспомогательных агентов или устройств. Значение этого термина не ограничено клетками *in vitro*; dsРНК также могут быть "введены в клетку", когда клетка является частью живого организма. В таком случае введение в клетку будет включать доставку в организм. Например, для *in vivo* доставки dsРНК могут быть введены инъекцией в участок ткани или введены системно. *In vitro* введение в клетку включает способы, известные специалистам, такие как электропорация и липофекция.

Термины "полностью подавлять" (silence) и "ингибировать экспрессию чего-либо", в той мере, в какой они относятся к гену фактора VII, в данном описании относятся к, по меньшей мере, частичному подавлению экспрессии гена фактора VII, что проявляется в уменьшении количества мРНК гена Фактора VII, которая может быть изолирована из первой клетки или группы клеток, в которых происходит транскрипция гена Фактора VII и которая или которые были обработаны с целью ингибирования экспрессии гена Фактора VII, по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по существу, идентичных первой клетке или группе клеток, но которая или которые не были подвергнуты такой обработке (контрольные клетки). Степень ингибирования обычно выражается как:

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

Альтернативно, степень ингибирования может быть выражена через уменьшение параметра, функционально связанного с транскрипцией гена Фактора VII, например количества белка, кодируемого геном Фактора VII, которое секретируется клеткой, или числа клеток, проявляющих определенный фенотип, например, апоптоз. В принципе, подавление активности гена Фактора VII может быть определено в любой клетке, экспрессирующей мишень, будь то конститутивно или в результате применения методов генной инженерии, с использованием любого пригодного анализа. Однако, если необходим эталон для определения того, ингибирует ли данная siРНК экспрессию гена Фактора VII в определенной степени и потому входит в объем настоящего изобретения, то в качестве такого эталона должны использоваться анализы, описанные в приведенных ниже примерах.

Например, в определенных случаях, экспрессия гена Фактора VII подавляется на по меньшей мере примерно 20, 25, 35, 40 или 50% путем введения двухцепочечного олигонуклеотида по изобретению. В одном варианте исполнения, ген Фактора VII подавляется на по меньшей мере примерно 60, 70 или 80% путем введения двухцепочечного олигонуклеотида по изобретению. В более предпочтительном варианте исполнения ген Фактора VII подавляется на по меньшей мере примерно 85, 90 или 95% путем введения двухцепочечного олигонуклеотида по изобретению.

Термины "лечить" (treat), "лечение" (treatment) и т.п. относятся к облегчению или ослаблению болезни или расстройства. В контексте изобретения, в той степени, в которой это относится к любому из других состояний, описанных ниже (например, Фактор VII-медируемое состояние, отличное от тромботического расстройства), термины "лечить", "лечение" и т.п. означают облегчение или ослабление по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с таким состоянием, или замедление или реверсирование развития такого состояния.

"Терапевтически пригодная" (relevant) композиция может облегчать болезнь или расстройство или симптом болезни или расстройства при введении в соответствующей дозе.

В используемом тут значении термин "Фактор VII-медируемое состояние или болезнь" и родственные термины и формулировки относятся к состоянию или расстройству, характеризующемуся неадекватной, например выше нормальной, активностью Фактора VII. Неадекватная функциональная активность Фактора VII может возникнуть в результате экспрессии Фактора VII в клетках, которые нормально не экспрессируют Фактор VII, или повышенной экспрессии Фактора VII (приводящей, например, к симптому вирусной геморрагической лихорадки или тромбу). Фактор VII-медируемое состояние или болезнь могут полностью или частично медиироваться неадекватной функциональной активностью Фактора VII. Однако, Фактор VII-медируемое состояние или болезнь характеризуются тем, что модуляция Фактора VII приводит к определенному влиянию на лежащее в их основе состояние или расстройство (например, ингибитор Фактора VII приводит к некоторому улучшению самочувствия пациента у, по меньшей мере, некоторых пациентов).

"Геморрагическая лихорадка" включает комбинацию болезней, вызываемых вирусной инфекцией. Лихорадка и желудочно-кишечные симптомы типично сопровождаются капиллярным кровотечением.

"Коагулопатия" представляет собой любой дефект механизма свертывания крови у субъекта.

В используемом тут значении "тромботическое расстройство" представляет собой любое расстройство, предпочтительно вызываемое нежелательной экспрессией FVII, включая любое расстройство, характеризующееся нежелательной коагуляцией крови.

В используемом тут значении фразы "терапевтически эффективное количество" и "профилактически эффективное количество" относятся к количеству, обеспечивающему терапевтически полезный эффект при лечении, профилактике или ведении вирусной геморрагической лихорадки или явного симптома такого расстройства, например кровотечения, лихорадки, слабости, боли в мышцах, головной боли, воспаления или циркуляторного шока. Конкретное количество, являющееся терапевтически эффективным, может быть легко определено рядовым практикующим медиком, и может меняться в зависимости от факторов, известных специалистам, таких как, например, тип тромботического расстройства, анамнез и возраст пациента, стадия болезни, и введение других агентов.

В используемом тут значении "фармацевтическая композиция" включает фармакологически эффективное количество dsРНК и фармацевтически приемлемого носителя. В используемом тут значении "фармакологически эффективное количество", "терапевтически эффективное количество" или просто "эффективное количество" относятся к такому количеству РНК, которое эффективно вызывает требуемый фармакологический, терапевтический или профилактический результат. Например, если определенная клиническая терапия считается эффективной, когда наблюдается по меньшей мере 25% снижения измеримого параметра, ассоциированного с болезнью или расстройством, то терапевтически эффективное количество лекарственного средства для лечения этой болезни или расстройства представляет собой количество, необходимое для достижения снижения этого параметра на по меньшей мере 25%.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к носителю для введения терапевтического агента. Такие носители включают, без ограничения, солевой раствор, забуференный солевой рас-

твор, декстрозу, воду, глицерин, этанол и их комбинации. Этот термин определенно исключает культуральную среду для клеток. Для лекарственных средств, вводимых перорально, фармацевтически приемлемые носители включают, без ограничения, фармацевтически приемлемые эксципиенты, такие как инертные разбавители, распадающиеся вещества, связующие агенты, смазывающие агенты, подсластители, вкусовые вещества, красящие агенты и консерванты. Пригодные инертные разбавители включают карбонат натрия и кальция, фосфат натрия и кальция и лактозу, а кукурузный крахмал и альгиновая кислота являются пригодными распадающимися веществами. Связующие агенты могут включать крахмал и желатин, в то время как смазывающий агент, в случае его присутствия, обычно будет стеаратом магния, стеариновой кислотой или тальком. При желании таблетки могут иметь покрытия из такого материала, как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат, для замедления абсорбции в желудочно-кишечном тракте.

В используемом тут значении, "трансформированная клетка" представляет собой клетку, в которую был введен вектор, из которого может экспрессироваться молекула dsРНК.

#### **Характеристика частиц нуклеиновая кислота-липид**

В определенных вариантах исполнения изобретение относится к способам и композициям для получения частиц инкапсулированной в липиде нуклеиновой кислоты, в которых нуклеиновые кислоты инкапсулированы липидным слоем. Такие частицы нуклеиновая кислота-липид, содержащие олигонуклеотиды siРНК, характеризуются с помощью различных биофизических параметров, включая: (1) соотношение лекарственного средства и липида; (2) эффективность инкапсулирования и (3) размер частиц. Желательными являются высокие значения отношения лекарственного средства к липиду, высокая эффективность инкапсулирования, хорошая резистентность к нуклеазе и стабильность в сыворотке и контролируемый размер частиц, обычно менее 200 нм в диаметре. В дополнение к этому большое значение имеет природа полимера нуклеиновой кислоты, поскольку модификация нуклеиновых кислот с целью придания резистентности к нуклеазе увеличивает стоимость терапевтических средств, обеспечивая во многих случаях лишь ограниченную резистентность. Если не указано иное, эти критерии рассчитываются в данном описании следующим образом:

Величина отношения нуклеиновой кислоты к липиду представляет собой количество нуклеиновой кислоты в определенном объеме препарата, деленное на количество липида в этом же объеме. Эта величина может определяться как молярное соотношение (моль на моль) или как весовое соотношение (вес на вес) или как молярно-весовое отношение (вес на количество молей). Для конечной формы, готовой к введению композиции, отношение нуклеиновая кислота:липид рассчитывается после использования диализа, хроматографии и/или ферментативного (например, нуклеазой) гидролиза для удаления как можно большего количества посторонней нуклеиновой кислоты;

Эффективность инкапсулирования относится к отношению лекарственного средства к липиду в исходной смеси, деленному на отношение лекарственного средства к липиду в готовой пригодной для введения композиции. Этот показатель является мерой относительной эффективности. Для измерения абсолютной эффективности также может быть рассчитано общее количество нуклеиновой кислоты, прибавляемой к исходной смеси, из которой получают пригодную для введения композицию. Также может быть рассчитано количество потерь липида в процессе приготовления. Эффективность является мерой количества отходов и затрат на изготовление.

Размер указывает размер (диаметр) сформированных частиц. Распределение по размерам может быть определено с помощью метода квазиупругого светорассеяния (QELS) на приборе Nicomp Model 370 для определения размера субмикронных частиц. Частицы менее 200 нм являются предпочтительными для распределения в неоваскуляризованных (неплотных) тканях, таких как новообразования и очаги воспаления.

#### **Способы получения липидных частиц**

В способах и композициях по изобретению используются определенные катионные липиды, синтез, получение и определение характеристик которых описаны ниже и в сопровождающих примерах. В дополнение к этому настоящее изобретение предусматривает способы получения липидных частиц, включая ассоциированные с терапевтическим агентом, например нуклеиновой кислотой. В описанных тут способах смесь липидов объединяют с забуференным водным раствором нуклеиновой кислоты для получения промежуточной смеси, содержащей нуклеиновую кислоту, инкапсулированную в липидные частицы, в которой инкапсулированные нуклеиновые кислоты присутствуют при соотношении нуклеиновая кислота/липид от примерно 3 до примерно 25 мас.%, предпочтительно 5-15 мас.%. Промежуточная смесь может быть необязательно подвергнута классификации по размеру для получения частиц липид-инкапсулированная нуклеиновая кислота, в которых липидная часть представляет собой однослойные везикулы, предпочтительно имеющие диаметр от 30 до 150 нм, более предпочтительно примерно от 40 до 90 нм. Затем повышают pH для нейтрализации по меньшей мере части поверхностных зарядов частиц липид-нуклеиновая кислота, получая в результате этого по меньшей мере частично поверхностно-нейтрализованную композицию липид-инкапсулированная нуклеиновая кислота.

Как описано выше, несколько из таких катионных липидов представляют собой аминоклипыды, которые являются заряженными при pH ниже  $pK_a$  аминоклипыды и по существу нейтральными при pH выше

$pK_a$ . Такие катионные липиды называются титруемыми катионными липидами и могут быть использованы в композициях по изобретению с применением двухстадийного процесса. Сначала, липидные везикулы могут быть сформированы при более низких значениях pH из титруемых катионных липидов и других компонентов везикул в присутствии нуклеиновых кислот. При этом везикулы инкапсулируют и захватывают нуклеиновые кислоты. Затем поверхностный заряд только что образованных везикул может быть нейтрализован путем повышения pH среды до уровня выше  $pK_a$  присутствующих титруемых катионных липидов, т.е., до физиологического значения pH или выше. Особенно предпочтительные аспекты этого процесса включают как легко достижимое удаление любых поверхностно адсорбированных нуклеиновых кислот, так и образующийся в результате этого носитель для доставки нуклеиновой кислоты, имеющий нейтральную поверхность. Ожидается, что липосомы или липидные частицы, имеющие нейтральную поверхность, позволят избежать быстрого клиренса из циркуляции и не допустить определенных токсичностей, ассоциированных с препаратами катионных липосом. Дополнительные подробности, касающиеся такого применения указанных титруемых катионных липидов в композициях частиц нуклеиновая кислота-липид приведены в патенте US 6287591 и патенте US 6858225, включенных сюда посредством ссылок.

Далее следует отметить, что везикулы, сформированные таким образом, дают композиции однородных по размеру везикул с высоким содержанием нуклеиновых кислот. Дополнительно везикулы имеют размер в интервале значений от примерно 30 до примерно 150 нм, более предпочтительно от примерно 30 до примерно 90 нм.

Без намерения ограничиваться какой-либо конкретной теорией, укажем, что, как считается, очень высокая эффективность инкапсулирования нуклеиновой кислоты является результатом электростатических взаимодействий при низких pH. При кислотном pH (например, pH 4,0) поверхность везикулы заряжена и связывает часть нуклеиновых кислот путем электростатических взаимодействий. Когда внешний кислотный буфер заменяют на более нейтральный буфер (например, pH 7,5), поверхность липидной частицы или липосомы нейтрализуется, что позволяет удалить любую внешнюю нуклеиновую кислоту. Более детальная информация о процессе приготовления содержится в различных публикациях (например, патент US 6287591 и патент US 6858225).

В учетом вышеизложенного настоящее изобретение предусматривает способы получения композиций липид/нуклеиновая кислота. В описанных тут способах смесь липидов объединяют с забуференным водным раствором нуклеиновой кислоты для получения промежуточной смеси, содержащей нуклеиновую кислоту, инкапсулированную в липидных частицах, например с присутствием инкапсулированной нуклеиновой кислоты при соотношении нуклеиновая кислота/липид, равном от примерно 10 до примерно 20 мас.%. Промежуточная смесь может быть необязательно классифицирована по размеру для получения частиц инкапсулированной в липиде нуклеиновой кислоты, где липидная часть представляет собой однослойные везикулы, предпочтительно имеющие диаметр от 30 до 150 нм, более предпочтительно примерно от 40 до 90 нм. Затем значение pH повышают для нейтрализации по меньшей мере части поверхностных зарядов частиц липид-нуклеиновая кислота, с образованием в результате этого по меньшей мере частично поверхностно нейтрализованной композиции липид-инкапсулированная нуклеиновая кислота.

В определенных вариантах исполнения смесь липидов включает по меньшей мере два липидных компонента: первый аминоклипидный компонент по настоящему изобретению, который выбирают из липидов, имеющих такое  $pK_a$ , чтобы липид был катионным при pH ниже  $pK_a$  и нейтральным при pH выше  $pK_a$ , и второй липидный компонент, который выбирают из липидов, предотвращающих агрегацию частиц в процессе образования частиц липид-нуклеиновая кислота. В конкретных вариантах исполнения аминоклипид представляет собой новый катионный липид по настоящему изобретению.

При изготовлении частиц нуклеиновая кислота-липид по изобретению, смесь липидов типично представляет собой раствор липидов в органическом растворителе. Эта смесь липидов может быть затем высушена с образованием тонкой пленки или лиофилизована с образованием порошка, с последующей гидратацией водным буфером с образованием липосом. Альтернативно, в предпочтительном способе смесь липидов может быть солюбилизирована в смешивающемся с водой спирте, таком как этанол, и этот этанольный раствор прибавляют к водному буферу, что приводит к спонтанному образованию липосом. В большинстве вариантов исполнения, спирт используется в той форме, в которой он доступен коммерчески. Например, этанол может быть использован в виде абсолютного этанола (100%) или в виде 95% этанола, где остаток представляет собой воду. Этот способ описан более подробно в патенте US 5976567).

В соответствии с изобретением липидную смесь объединяют с забуференным водным раствором, который может содержать нуклеиновые кислоты. Забуференный водный раствор типично представляет собой раствор, в котором буфер имеет pH ниже значения  $pK_a$  протонируемого липида в липидной смеси. Примеры пригодных буферов включают цитратный, фосфатный, ацетатный и MES. Особенно предпочтительным буфером является цитратный буфер. Предпочтительные буферы будут иметь содержание аниона в интервале значений 1-1000 мМ, в зависимости от химии инкапсулируемой нуклеиновой кислоты, и оптимизация концентрации буфера может быть значительной для достижения высоких уровней

содержания компонентов (см., например, патент US 6287591 и патент US 6858225). Альтернативно, может быть использована чистая вода, подкисленная до pH 5-6 хлоридом, сульфатом и т.п. В этом случае может быть пригодным добавление 5% глюкозы или другого неионного растворенного вещества, которое бы уравнивало осмотический потенциал мембраны частиц при диализе частиц для удаления этанола, повышения pH или смешения с фармацевтически приемлемым носителем, таким как нормальный солевой раствор. Количество нуклеиновой кислоты в буфере может меняться, но типично 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 забуференного водного раствора терапевтических нуклеиновых кислот объединяют для получения промежуточной смеси. Промежуточная смесь типично представляет собой смесь липидных частиц, содержащих инкапсулированные нуклеиновые кислоты. Дополнительно промежуточная смесь может также содержать некоторую часть нуклеиновых кислот, присоединенных к поверхности липидных частиц (липосом или липидных везикул) под действием ионного притяжения отрицательно заряженных нуклеиновых кислот и положительно заряженных липидов на поверхности липидной частицы (аминолипиды или другие липиды, составляющие компонент протонируемого первого липида, положительно заряжены в буфере, имеющем pH ниже значения  $pK_a$  протонируемой группы липида). В одной группе предпочтительных вариантов исполнения смесь липидов представляет собой спиртовой раствор липидов и объемы каждого из растворов регулируют таким образом, чтобы при объединении полученное содержание спирта составляло от примерно 20 до примерно 45 об.%. Способ объединения смесей может включать любые из различных процессов, часто зависящие от масштабов производства композиции. Например, если общий объем составляет примерно 10-20 мл или меньше, растворы могут быть объединены в пробирке и перемешаны с помощью вихревой мешалки. Крупномасштабные процессы могут быть проведены в стеклянной посуде, пригодной для промышленного производства.

Необязательно, комплексы инкапсулированного в липиде терапевтического агента (например, нуклеиновой кислоты), получаемые путем объединения липидной смеси и забуференного водного раствора терапевтических агентов (нуклеиновых кислот), могут быть классифицированы по размеру для достижения желательного диапазона значений размеров и относительно узкого распределения липидных частиц по размеру. Предпочтительно предлагаемые тут композиции будут классифицированы до величины среднего диаметра от примерно 70 до примерно 200 нм, более предпочтительно от примерно 90 до примерно 130 нм. Существует несколько методик классификации липосом до желательного размера. Один способ классификации описан в патенте США № 4737323, включенном сюда посредством ссылки. Озвучивание суспензии липосом путем озвучивания в ванне или озвучивания пробы приводит к прогрессирующему уменьшению размеров до малых однослойных везикул (SUV), имеющих размеры менее примерно 0,05 мкм. Другим способом является гомогенизация, основанная на приложении сдвиговой нагрузки для фрагментации крупных липосом на более мелкие. При типичной процедуре гомогенизации многослойные везикулы рециркулируют в стандартном гомогенизаторе для эмульсий до достижения выбранного размера липосом, типично, от примерно 0,1 до 0,5 мкм. В обоих способах распределение частиц по размерам можно контролировать обычным лазерным способом определения размера частиц. Для определенных способов по настоящему изобретению, для получения однородного размера везикул используется экструзия.

Экструзия липосомальных композиций через мелкопористую поликарбонатную мембрану или асимметричную керамическую мембрану приводит к получению относительно четко определенного распределения по размерам. Типично, суспензию рециркулируют через мембрану один или несколько раз до достижения желательного распределения по размерам липосомального комплекса. Липосомы могут экструдироваться через мембраны с последовательно уменьшающимся размером пор для достижения постепенного уменьшения размера липосом. В некоторых случаях образующиеся композиции липид-нуклеиновая кислота могут быть использованы без какой-либо классификации.

В конкретных вариантах исполнения способы по настоящему изобретению дополнительно включают стадию нейтрализации по меньшей мере некоторой части поверхностных зарядов на липидных частях композиций липид-нуклеиновая кислота. В результате по меньшей мере частичной нейтрализации поверхностных зарядов, неинкапсулированная нуклеиновая кислота высвобождается с поверхности липидных частиц и может быть удалена из композиции обычными методиками. Предпочтительно неинкапсулированные и адсорбированные на поверхности нуклеиновые кислоты удаляются из полученных композиций путем обмена буферных растворов. Например, замена цитратного буфера (pH примерно 4,0, используется для приготовления композиций) на забуференный HEPES солевой раствор (HBS, pH примерно 7,5), приводит к нейтрализации поверхности липосом и высвобождению нуклеиновых кислот с поверхности. Высвобожденная нуклеиновая кислота затем может быть удалена с помощью хроматографии с использованием стандартных методов, после чего переходят на буфер с pH выше  $pK_a$  используемого липида.

Необязательно, липидные везикулы (т.е., липидные частицы) могут быть сформированы путем гидратации в водном буфере и классифицированы с использованием любых из описанных выше способов перед добавлением нуклеиновой кислоты. Как описано выше, водный буфер должен иметь pH ниже зна-

чения  $pK_a$  аминокислоты. Затем к таким классифицированным по размеру, предварительно сформированным везикулам может быть добавлен раствор нуклеиновых кислот. Для обеспечения инкапсулирования нуклеиновых кислот в такие "предварительно сформированные" везикулы смесь должна содержать спирт, такой как этанол. В случае этанола, он должен присутствовать в концентрации, равной от примерно 20% (мас./мас.) до примерно 45% (мас./мас.). В дополнение к этому, может быть необходимо нагреть смесь предварительно сформированных везикул и нуклеиновой кислоты в смеси водного буфера-этанола до температуры от примерно 25 до примерно 50°C, в зависимости от состава липидных везикул и природы нуклеиновой кислоты. Рядовому специалисту в данной области техники будет понятно, что оптимизация процесса инкапсулирования для достижения желательного уровня нуклеиновой кислоты в липидных везикулах потребует манипуляций с переменными, такими как концентрация этанола и температура. Примеры пригодных условий для инкапсулирования нуклеиновой кислоты приведены в примерах. После инкапсулирования нуклеиновых кислот в предварительно сформированных везикулах, внешний pH может быть повышен для по меньшей мере частичной нейтрализации поверхностного заряда. Неинкапсулированные и поверхностно адсорбированные нуклеиновые кислоты могут быть затем удалены, как описано выше.

### Способ применения

Липидные частицы по изобретению могут быть использованы для доставки терапевтического агента в клетку, *in vitro* или *in vivo*. В конкретных вариантах исполнения терапевтический агент представляет собой нуклеиновую кислоту, которая доставляется в клетку с помощью частиц нуклеиновая кислота-липид по изобретению. Хотя приведенное ниже описание различных способов применения липидных частиц и соответствующих фармацевтических композиций по изобретению иллюстрируется с помощью описания, относящегося к частицам нуклеиновая кислота-липид, подразумевается, что такие способы и композиции могут быть легко адаптированы для доставки любого терапевтического агента для лечения любой болезни или расстройства, при которых такое лечение может оказать положительный эффект.

В определенных вариантах исполнения изобретение предусматривает способы введения нуклеиновой кислоты в клетку. Предпочтительными нуклеиновыми кислотами для введения в клетки являются siРНК, иммуностимулирующие олигонуклеотиды, плазмиды, антисмысловые материалы и рибозимы. Такие способы могут быть реализованы путем введения в контакт частиц или композиций по изобретению с клетками на протяжении периода времени, достаточного для осуществления внутриклеточной доставки.

Композиции по изобретению могут быть адсорбированы почти любым типом клеток. После адсорбции частицы нуклеиновая кислота-липид могут подвергаться эндоцитозу частью клеток, обмениваться липидами с клеточными мембранами или сливаться с клетками. Перенос или включение компонента нуклеиновой кислоты комплекса может происходить по любому из этих путей. Укажем, без намерения ограничить объем изобретения, что, как считается, в случае поглощения частиц клеткой в результате эндоцитоза частицы затем взаимодействуют с эндосомальной мембраной, приводя к дестабилизации эндосомальной мембраны, возможно, путем формирования не-бислойных фаз, что приводит к попаданию инкапсулированной нуклеиновой кислоты в цитоплазму клетки. Аналогично, в случае прямого слияния частиц с плазматической мембраной клетки, мембрана липосомы в процессе слияния интегрируется в мембрану клетки и содержимое липосомы объединяется с внутриклеточной жидкостью. Контакт между клетками и композициями липид-нуклеиновая кислота при его проведении *in vitro* происходит в биологически совместимой среде. Концентрация композиций может меняться в широких пределах в зависимости от конкретного применения, но обычно находится в интервале от примерно 1 мкмоль до примерно 10 ммоль. В определенных вариантах исполнения обработка клеток композициями липид-нуклеиновая кислота будет обычно проводиться при физиологической температуре (примерно 37°C) на протяжении периода времени от примерно 1 до 24 ч, предпочтительно, от примерно 2 до 8 ч. Для применения *in vitro* доставка нуклеиновых кислот может осуществляться в любую выращиваемую в культуре клетку, растительного или животного происхождения, позвоночных или беспозвоночных, принадлежащую к любой ткани или типу. В предпочтительных вариантах исполнения клетки будут животными клетками, более предпочтительно клетками млекопитающих и наиболее предпочтительно клетками человека.

В одной группе вариантов исполнения суспензию частиц липид-нуклеиновая кислота прибавляют к высеянному на чашках клеткам со степенью слияния 60-80%, имеющим плотность клеток от примерно  $10^3$  до примерно  $10^5$  клеток/мл, более предпочтительно примерно  $2 \times 10^4$  клеток/мл. Концентрация суспензии, прибавляемой к клеткам, предпочтительно составляет от примерно 0,01 до 20 мкг/мл, более предпочтительно примерно 1 мкг/мл.

Типичные способы применения включают использование хорошо известных процедур обеспечения внутриклеточной доставки siРНК для прекращения экспрессии или подавления активности специфических клеточных мишеней. Альтернативные способы применения включают доставку ДНК или мРНК последовательностей, кодирующих терапевтически пригодные полипептиды. Таким образом, обеспечивается терапия генетических болезней путем доставки дефицитных или отсутствующих генных продуктов (например, при дистрофии Дюшенна, см. Kunkel et al., Brit. Med. Bull. 45(3):630-643 (1989), и при кистозном фиброзе, см. Goodfellow, Nature 341:102-103 (1989)). Другие применения композиций по изо-

бретению включают введение антисмысловых олигонуклеотидов в клетки (см. Bennett, et al., *Mol. Pharm.* 41:1023-1033 (1992)).

Альтернативно, композиции по изобретению также могут быть использованы для доставки нуклеиновых кислот в клетки *in vivo*, с использованием способов, известных квалифицированным специалистам. По отношению к применению изобретения для доставки ДНК или мРНК последовательностей, Zhu, et al., *Science* 261:209-211 (1993), включенный сюда посредством ссылки, описывает внутривенную доставку плазмиды экспрессии цитомегаловируса (CMV)-хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT) с использованием комплексов DOTMA-DOPE. Hyde, et al., *Nature* 362:250-256 (1993), включенный сюда посредством ссылки, описывает доставку гена регулятора трансмембранной проводимости кистозного фиброза (CFTR) в эпителий дыхательных путей и альвеолы легкого мышей с помощью липосом. Brigham, et al., *Am. J. Med. Sci.* 298:278-281 (1989), включенный сюда посредством ссылки, описывает *in vivo* трансфекцию легких мышей функционирующим прокариотическим геном, кодирующим внутриклеточный фермент хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT). Таким образом, композиции по изобретению могут быть использованы при лечении инфекционных болезней.

Для *in vivo* введения фармацевтические композиции предпочтительно вводятся парентерально, например внутрисуставно, внутривенно, интраперитонеально, подкожно или внутримышечно. В конкретных вариантах исполнения фармацевтические композиции вводят внутривенно или интраперитонеально путем болюсной инъекции. В качестве одного примера, см. Stadler, et al., патент США № 5286634, который включен сюда посредством ссылки. Внутриклеточная доставка нуклеиновой кислоты также была описана 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). Другие способы введения терапевтических средств на основе липидов описаны, например, 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 № 4522803 и Fountain et al., патент США № 4588578.

В других способах фармацевтические препараты могут быть введены в контакт с тканью-мишенью путем прямого нанесения препарата на ткань. Нанесение может быть выполнено с помощью местной, "открытой" или "закрытой" процедуры. Под "местным" подразумевается прямое нанесение фармацевтического препарата на ткань, контактирующую с окружающей средой, такую как кожа, ротоглотка, наружный слуховой проход и т.п. "Открытыми" процедурами являются такие процедуры, которые включают выполнение надреза кожи пациента и обнажение подлежащей ткани, на которую наносятся фармацевтические препараты. Это обычно выполняется путем хирургической процедуры, такой как торакотомия для доступа к легким, абдоминальная лапаротомия для доступа к внутренним органам брюшной полости или с помощью других прямых хирургических подходов к ткани-мишени. "Закрытые" процедуры представляют собой инвазивные процедуры, в которых ткани внутренней мишени не обнажаются непосредственно, а доступ к ним осуществляется путем введения инструментов через маленькие разрезы в коже. Например, препараты могут быть введены в брюшину путем лаважа через иглу. Аналогично, фармацевтические препараты могут быть введены в мягкие мозговые оболочки или спинной мозг путем инфузии при люмбальной пункции с последующей соответствующей регулировкой положения пациента, как это обычно практикуется при спинномозговой анестезии или визуализации метразамидом спинного мозга. Альтернативно, препараты могут быть введены через эндоскопические приспособления.

Композиции липид-нуклеиновая кислота также могут быть введены в легкие в ингалируемом аэрозоле (см. Brigham, et al., *Am. J. Sci.* 298(4): 278-281 (1989)) или прямой инъекцией в очаг болезни (Culver, *Human Gene Therapy*, Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, New York, pp.70-71 (1994)).

Способы по изобретения могут практиковаться на различных хозяевах. Предпочтительные хозяева включают разные виды млекопитающих, такие как человек, приматы, кроме человека, собаки, кошки, крупный рогатый скот, лошади, овцы и т.п.

Дозировки частиц липид-терапевтический агент по изобретению будут зависеть от соотношения терапевтического агента и липида и определяться по заключению врача, назначающего введение, на основании возраста, веса и состояния пациента.

В одном варианте исполнения, изобретение предусматривает способ модуляции экспрессии полинуклеотида-мишени или полипептида. Такие способы обычно включают введение в контакт клетки с липидной частицей по изобретению, ассоциированной с нуклеиновой кислотой, способной модулировать экспрессию полинуклеотида-мишени или полипептида. В используемом тут значении, термин "модулирующий" относится к изменению экспрессии полинуклеотида-мишени или полипептида. В разных вариантах исполнения, модулирование может означать повышение или усиление, или оно может означать понижение или уменьшение. Способы измерения уровней экспрессии полинуклеотида-мишени или полипептида известны и доступны специалистам и включают, например, способы, использующие полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (RT-PCR) и иммуногистохимические методики. В конкретных вариантах исполнения, уровень экспрессии полинуклеотида-мишени или полипептида увеличивается или уменьшается по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50% или больше чем на 50% по сравнению с соответствующим контрольным значением. Например, если желательна повышенная экспрессия

полипептида, то нуклеиновая кислота может быть вектором экспрессии, включающим полинуклеотид, кодирующий желательный полипептид. С другой стороны, если желательна пониженная экспрессия полинуклеотида или полипептида, то в этом случае нуклеиновая кислота может быть, например, антисмысловым олигонуклеотидом, siРНК или микроРНК, содержащими полинуклеотидную последовательность, которая специфически гибридизуется с полинуклеотидом, кодирующим полипептид-мишень, тем самым нарушая экспрессию полинуклеотида-мишени или полипептида. Альтернативно, нуклеиновая кислота может быть плазмидой, которая экспрессирует такой антисмысловый олигонуклеотид, siРНК или микроРНК.

В одном конкретном варианте исполнения, изобретение предусматривает способ модуляции экспрессии полипептида клеткой, включающий доставку к клетке липидной частицы, состоящей из или состоящей по существу из катионного липида формулы (I) (например, липида формулы (II), (III), (IV), (V) или (VI)), нейтрального липида, стерола, ПЭГ или (of) модифицированного ПЭГ липида, например, в молярном соотношении примерно 35-65% катионного липида формулы (I), 3-12% нейтрального липида, 15-45% стерола, и 0,5-10% ПЭГ или модифицированного ПЭГ липида, где липидная частица ассоциирована с нуклеиновой кислотой, способной модулировать экспрессию полипептида. В конкретных вариантах исполнения, молярное соотношение липида составляет приблизительно 60/7,5/31/1,5 или 57,5/7,5/31,5/3,5 (мол.% липида I/DSPC/Chol/ПЭГ-DMG). В конкретных вариантах исполнения, молярное соотношение равно приблизительно 50/10/38,5/1,5 (% мол. липида V/DSPC/Chol/ПЭГ-DMG) или приблизительно 50/10/38,5/1,5 (мол.% липида VI/DSPC/Chol/ПЭГ-DSG). В другой группе вариантов исполнения, нейтральный липид в таких композициях замещают на DPPC, POPC, DOPE или SM. В другой группе вариантов исполнения, ПЭГ или модифицированный ПЭГ липид представляет собой ПЭГ-DSG.

В конкретных вариантах исполнения, терапевтический агент выбирают из siРНК, микроРНК, антисмыслового олигонуклеотида и плазмиды, способной экспрессировать siРНК, микроРНК или антисмысловый олигонуклеотид, где siРНК, микроРНК или антисмысловая РНК содержит полинуклеотид, который специфически связывается с полинуклеотидом, кодирующим полипептид, или его комплементом, так чтобы экспрессия полипептида снижалась.

В других вариантах исполнения нуклеиновая кислота представляет собой плазмиду, кодирующую полипептид или его функциональный вариант или фрагмент, так чтобы экспрессия полипептида или его функционального варианта или фрагмента возрастала.

В близких к этим вариантам исполнения изобретение предусматривает способ лечения болезни или расстройства, характеризующегося надэкспрессией полипептида у субъекта, включающий обеспечение для субъекта фармацевтической композиции по изобретению, в которой терапевтический агент выбирают из siРНК, микроРНК, антисмыслового олигонуклеотида и плазмиды, способной экспрессировать siРНК, микроРНК или антисмысловый олигонуклеотид, и в которой siРНК, микроРНК или антисмысловая РНК содержит полинуклеотид, специфически связывающийся с полинуклеотидом, кодирующим полипептид или его комплемент.

В одном варианте исполнения фармацевтическая композиция содержит липидную частицу, которая состоит из или состоит по существу из липида А, DSPC, Chol и ПЭГ-DMG, ПЭГ-С-DOMG или ПЭГ-DMA, например, в молярном соотношении примерно 35-65% катионного липида формулы (I) (например, липида формулы (II), (III), (IV), (V) или (VI)), 3-12% нейтрального липида, 15-45% стерола, и 0,5-10% ПЭГ или модифицированного ПЭГ липида ПЭГ-DMG, ПЭГ-С-DOMG или ПЭГ-DMA, где липидная частица ассоциирована с терапевтической нуклеиновой кислотой. В конкретных вариантах исполнения молярное соотношение липида составляет приблизительно 60/7,5/31/1,5 или 57,5/7,5/31,5/3,5 (% мол. липида I/DSPC/Chol/ПЭГ-DMG). В конкретных вариантах исполнения, молярное соотношение равно приблизительно 50/10/38,5/1,5 (мол.% липида V/DSPC/Chol/ПЭГ-DMG) или приблизительно 50/10/38,5/1,5 (мол.% липида VI/DSPC/Chol/ПЭГ-DSG). В другой группе вариантов исполнения, нейтральный липид в таких композициях замещают на DPPC, POPC, DOPE или SM. В другой группе вариантов исполнения ПЭГ или модифицированный ПЭГ липид представляет собой ПЭГ-DSG.

В другом близком варианте исполнения изобретение включает способ лечения болезни или расстройства, характеризующегося надэкспрессией полипептида у субъекта, включающий обеспечение для субъекта фармацевтической композиции по изобретению, в которой терапевтический агент представляет собой плазмиду, кодирующую полипептид или его функциональный вариант или фрагмент.

Изобретение далее предусматривает способ индуцирования иммунного ответа у субъекта, включающий обеспечение для субъекта фармацевтической композиции по изобретению, в которой терапевтический агент представляет собой иммуностимулирующий олигонуклеотид. В определенных вариантах исполнения иммунный ответ является гуморальным или мукозальным иммунным ответом, состоит из или состоит по существу из липида А, DSPC, Chol и ПЭГ-DMG, ПЭГ-С-DOMG или ПЭГ-DMA, например, в молярном соотношении примерно 35-65% катионного липида формулы (I) (например, липида формулы (II), (III), (IV), (V) или (VI)), 3-12% нейтрального липида, 15-45% стерола, и 0,5-10% ПЭГ или модифицированного ПЭГ липида ПЭГ-DMG, ПЭГ-С-DOMG или ПЭГ-DMA, где липидная частица ассоциирована с терапевтической нуклеиновой кислотой. В конкретных вариантах исполнения молярное соотношение липида составляет приблизительно 60/7,5/31/1,5 или 57,5/7,5/31,5/3,5 (мол.% липида

I/DSPC/Chol/ПЭГ-DMG). В конкретных вариантах исполнения молярное соотношение равно приблизительно 50/10/38,5/1,5 (мол.% липида V/DSPC/Chol/ПЭГ-DMG) или приблизительно 50/10/38,5/1,5 (мол.% липида VI/DSPC/Chol/ПЭГ-DSG). В другой группе вариантов исполнения нейтральный липид в таких композициях замещают на DPPC, POPC, DOPE или SM. В другой группе вариантов исполнения ПЭГ или модифицированный ПЭГ липид представляет собой ПЭГ-DSG.

В дополнительных вариантах исполнения фармацевтическая композиция предоставляется субъекту в комбинации с вакциной или антигеном. Таким образом, изобретение само предусматривает вакцины, включающие липидные частицы по изобретению, которые содержат иммуностимулирующий олигонуклеотид и также ассоциированы с антигеном, иммунный ответ на который является желательным. В конкретных вариантах исполнения антиген является опухолевым антигеном или ассоциирован с инфекционным агентом, таким как, например, вирус, бактерия или паразит.

Различные опухолевые антигены, антигены инфекционных агентов и антигены, ассоциированные с другими болезнями, хорошо известны специалистам и их примеры описаны в приведенных тут ссылках. Примеры антигенов, пригодных для использования по изобретению, включают, без ограничения, полипептидные антигены и ДНК-антигены. Конкретными примерами антигенов являются антигены гепатита А, гепатита В, оспы, полиомиелита, сибирской язвы, гриппа, тифа, столбняка, кори, ротавируса, дифтерии, коклюша, туберкулеза и краснухи. В одном варианте исполнения антиген представляет собой рекомбинантный антиген гепатита В. В других аспектах антиген представляет собой рекомбинантный антиген гепатита А. В другом аспекте антиген является опухолевым антигеном. Примерами таких опухолево-ассоциированных антигенов являются MUC-1, антиген EBV (вирус Эпштейна-Барр) и антигены, ассоциированные с лимфомой Беркитта. В дополнительном аспекте антиген представляет собой рекомбинантный антиген тирозиназа-родственного белка опухолевого антигена. Квалифицированным специалистам будут известны другие антигены, пригодные для использования по изобретению.

Опухоль-ассоциированные антигены, пригодные для использования в данном изобретении, включают как мутированные, так и немутированные молекулы, которые могут быть индикативными для одного типа опухоли, общими для нескольких типов опухолей и/или экспрессироваться исключительно или надэкспрессироваться в опухолевых клетках в отличие от нормальных клеток. В дополнение к белкам и гликопротеинам был также документально зафиксирован опухоль-специфический характер экспрессии углеводов, ганглиозидов, гликолипидов и муцинов. Типичные примеры опухоль-ассоциированных антигенов для использования в противораковых вакцинах по настоящему изобретению включают белковые продукты онкогенов, гены-супрессоры опухолей и другие гены с мутациями или перестройками, уникальными для опухолевых клеток, продукты реактивированных эмбриональных генов, карциноэмбриональные антигены, антигены ткань-специфической (но не опухоль-специфической) дифференцировки, рецепторы фактора роста, углеводные остатки клеточной поверхности, чужеродные вирусные белки и ряд других собственных белков.

Конкретные варианты исполнения опухоль-ассоциированных антигенов включают, например, мутированные антигены, такие как белковые продукты протоонкогенов Ras p21, онкогены опухолевых супрессоров p53 и BCR-abl, а также CDK4, MUM1, каспазу 8, и бета-катенин; надэкспрессируемые антигены, такие как галектин 4, галектин 9, карбоангидраза, альдозаза А, PRAME, Her2/neu, ErbB-2 и KSA, карциноэмбриональные антигены, такие как альфа-фетопротеин (AFP), человеческий хориогонадотропин (hCG); собственные антигены, такие как карциноэмбриональный антиген (CEA) и антигены дифференцировки меланоцитов, такие как Mart 1/Melan A, gp100, gp75, тирозиназа, TRP1 и TRP2; простата-ассоциированные 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 рака яичка, такие как NY-ESO1, SSX2 и SCP1; муцины, такие как Muc-1 и Muc-2; ганглиозиды, такие как GM2, GD2 и GD3, нейтральные гликолипиды и гликопротеины, такие как Lewis (y) и globo-H; и гликопротеины, такие как Tn, антиген Томпсона-Фриденрайха (Thompson-Freidenreich) (TF) и sTn. Настоящее изобретение также включает в качестве опухоль-ассоциированных антигенов лизаты цельных клеток и опухолевых клеток, а также их иммуногенные компоненты, а также идиотипы иммуноглобулина, экспрессируемые при моноклональных пролиферациях В-клеток для использования против В-клеточных лимфом.

Патогены включают, без ограничения, инфекционные агенты, например вирусы, которые инфицируют млекопитающих, в частности человека. Примеры инфекционных вирусов включают, без ограничения: ретровирусы (Retroviridae) (например, вирусы иммунодефицита человека, такие как ВИЧ-1 (также называемый HTLV-III, LAV или HTLV-III/LAV или ВИЧ-III; и другие изоляты, такие как ВИЧ-LP; пикорнавирусы (Picornaviridae) (например, вирусы полиомиелита, вирус гепатита А; энтеровирусы, вирусы герпетической ангины (Коксаки) человека, риновирусы, эховирусы); калицивирусы (Caliciviridae) (например, штаммы, вызывающие гастроэнтерит); тогавирусы (Togaviridae) (например, вирусы конского энцефалита, вирусы краснухи); флавивирусы (Flaviviridae) (например, вирусы денге, вирусы энцефалита, вирусы желтой лихорадки); короновирусы (Coronaviridae) (например, короновирусы); рабдовирусы (Rhabdoviridae) (например, вирусы везикулярного стоматита, вирусы бешенства); короновирусы (Coronaviridae) (например, короновирусы); рабдовирусы (Rhabdoviridae) (например, вирусы везикулярного

стоматита, вирусы бешенства); филовирусы (Filoviridae) (например, вирусы лихорадки эбола); парамиксовирусы (Paramyxoviridae) (например, вирусы парагриппа, вирус свинки, вирус кори, респираторно-синцитиальный вирус); ортомиксовирусы (Orthomyxoviridae) (например, вирусы гриппа); бунгавирусы (Bungaviridae) (например, вирусы Хангаан (Hantaan), вирусы бунга, флебовирусы и вирусы геморрагической лихорадки Конго-Крым (Nairo)); аренавирусы (Arenaviridae) (вирусы геморрагической лихорадки); реовирусы (Reoviridae) (например, реовирусы или бивирусы (biviurses) и ротавирусы); бирнавирусы (Birnaviridae); гепаднавирусы (Hepadnaviridae) (вирус гепатита В); парвовирусы (Parvoviridae) (парвовирусы); паповавирусы (Papovaviridae) (вирусы папилломы, вирусы полиомы); аденовирусы (Adenoviridae) (большинство аденовирусов); герпесвирусы (Herpesviridae) (вирус простого герпеса (HSV) 1 и 2, вирус ветряной оспы, цитомегаловирус (CMV), герпесвирус; поксвирусы (Poxviridae) (вирусы оспы, вирусы коровьей оспы, поксвирусы) и иридовирусы (Iridoviridae) (например, вирус африканской чумы свиней); и неклассифицированные вирусы (например, этиологические агенты губчатой энцефалопатии, агент гепатита-дельта (считается дефектным сателлитом вируса гепатита В), агенты не-А, не-В гепатита (класс 1=внутренне (internally) передаваемый; класс 2=парентерально передаваемый (т.е., гепатит С); "Норуолк" (Norwalk) и родственные вирусы, и астровирусы).

У позвоночных животных в качестве антигенов выступают также грамотрицательные и грамположительные бактерии. Такие грамположительные бактерии включают, без ограничения, виды *Pasteurella*, виды *Staphylococci* и виды *Streptococcus*. Грамотрицательные бактерии включают, без ограничения, *Escherichia coli*, виды *Pseudomonas* и виды *Salmonella*. Конкретные примеры инфекционных бактерий включают, без ограничения *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 viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (анаэробные виды), *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*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenuis*, *Leptospira*, *Rickettsia*, и *Actinomyces israelii*.

Дополнительные примеры патогенов включают, без ограничения, инфекционные грибы, инфицирующие млекопитающих, в частности человека. Примеры инфекционных грибов включают, без ограничения: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*. Примеры инфекционных паразитов включают *Plasmodium*, такие как *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* и *Plasmodium vivax*. Другие инфекционные организмы (например, простейшие) включают *Toxoplasma gondii*.

#### **Фармацевтические композиции**

В одном варианте исполнения изобретения предусматривает фармацевтические композиции, содержащие агент на основе нуклеиновой кислоты, идентифицируемый по описанной тут модели скрининга печени. Композиция включает агент, например dsРНК, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция пригодна для лечения болезни или расстройства, ассоциированного с экспрессией или активностью гена. Такие фармацевтические композиции составляются в соответствии со способом доставки. Одним из примером являются композиции, составленные для системного введения путем парентеральной доставки.

Фармацевтические композиции, включающие идентифицированный агент, вводятся в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена-мишени, например гена фактора VII. В общем, пригодная доза агента dsРНК будет находиться в интервале значений от 0,01 до 5,0 мг на килограмм веса тела реципиента в сутки, обычно в интервале значений от 1 мкг до 1 мг на килограмм веса тела в сутки. Фармацевтическая композиция может быть введена раз в день или dsРНК может быть введена в виде двух, трех или больше поддоз с соответствующими интервалами на протяжении дня или даже с использованием непрерывной инфузии или доставки с помощью композиции с регулируемым высвобождением. В этом случае, dsРНК, содержащаяся в каждой поддозе, должна быть соответственно меньше для обеспечения полной суточной дозы. Дозированная форма также может быть объединена для доставки на протяжении нескольких дней, например, с использованием обычной композиции с замедленным высвобождением, которая обеспечивает замедленное высвобождение dsРНК на протяжении периода в несколько дней. Композиции с замедленным высвобождением хорошо известны специалистам и особенно пригодны для вагинальной доставки агентов, которая может быть использована с агентами по изобретению. В этом варианте исполнения дозированная форма содержит соответствующие кратные величины суточной дозы.

Квалифицированному специалисту будет понятно, что определенные факторы могут повлиять на дозу и выбор времени введения, необходимые для эффективного лечения субъекта, включая, без ограничений, тяжесть болезни или расстройства, предыдущее лечение, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта, и другие имеющиеся болезни. Кроме того, лечение субъекта терапевтически эффективными количествами композиции может включать один курс лечения или ряд курсов лечения. Оценка эффективных доз и *in vivo* периодов полувыведения для индивидуальных dsРНК, охватываемых изобретением,

может быть выполнена с использованием обычной методологии или на основании *in vivo* испытаний с использованием пригодной животной модели, как описано в другом разделе данной заявки.

В конкретных вариантах исполнения фармацевтические композиции, содержащие частицы липид-нуклеиновая кислота по изобретению, получают в соответствии со стандартными методиками, и они дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель. Как правило, в качестве фармацевтически приемлемого носителя будет использоваться нормальный солевой раствор. Другие пригодные носители включают, например, воду, забуференную воду, 0,9% солевой раствор, 0,3% глицин и т.п., включая гликопротеины для повышения стабильности, такие как альбумин, липопротеин, глобулин и т.д. В композициях, содержащих солевой раствор или другие содержащие соль носители, носитель предпочтительно прибавляют после формирования липидных частиц. Таким образом, после формирования композиций липид-нуклеиновая кислота, композиции могут быть разбавлены фармацевтически приемлемыми носителями, такими как нормальный солевой раствор.

Полученные фармацевтические препараты могут быть стерилизованы обычными, хорошо известными методами стерилизации. Водные растворы могут быть затем упакованы для использования или профильтрованы в асептических условиях и лиофилизированы, причем лиофилизированный препарат объединяют со стерильным водным раствором перед введением. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как агенты регуляции pH и буферные агенты, агенты регуляции тоничности и т.п., например, ацетат натрия, лактат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция и т.д. Дополнительно липидная суспензия может содержать защитные агенты для липидов, которые защищают липиды от повреждения свободными радикалами и липидпероксидазой при хранении. Пригодными являются липофильные поглотители свободных радикалов, такие как  $\alpha$ -токоферол и водорастворимые специфические по отношению к железу комплексообразователи, такие как ферриоксамин.

Концентрация липидных частиц или частиц липид-нуклеиновая кислота в фармацевтических композициях может меняться в широких пределах, например, от менее примерно 0,01%, обычно от количества, равного или по меньшей мере близкого к примерно 0,05-5%, до 10-30% мас., и выбирается преимущественно с учетом объемов жидких компонентов, вязкостей и т.д., в соответствии с выбранным конкретным способом введения. Например, концентрация может быть увеличена для уменьшения жидкостной нагрузки, ассоциированной с лечением. Это может быть особенно желательным для пациентов с атеросклероз-ассоциированной застойной сердечной недостаточностью или тяжелой формой гипертензии. Альтернативно, комплексы, состоящие из липидов, вызывающих раздражение, могут быть разбавлены до низких концентраций для уменьшения воспаления в месте введения. В одной группе вариантов исполнения нуклеиновая кислота будет иметь присоединенную метку и будет использоваться для диагностики (путем указания присутствия комплементарной нуклеиновой кислоты). В этом случае количество введенных комплексов будет зависеть от конкретной используемой метки, диагностируемого болезненного состояния и суждения врача-клинициста, но обычно будет находиться в интервале от примерно 0,01 до примерно 50 мг на килограмм веса тела, предпочтительно от примерно 0,1 до примерно 5 мг/кг веса тела.

Как отмечалось выше, частицы липид-терапевтический агент (например, нуклеиновая кислота) по изобретению могут содержать модифицированные полиэтиленгликолем (ПЭГ) фосфолипиды, ПЭГ-церамид или липиды, модифицированные ганглиозидом G<sub>M1</sub> или другие липиды, эффективно предотвращающие или ограничивающие агрегацию. Прибавление таких компонентов не просто предотвращает агрегацию комплекса. Скорее, оно может также обеспечивать средства увеличения периода жизни в циркуляции и увеличения доставки композиции липид-нуклеиновая кислота к тканям-мишеням.

Изобретение также предусматривает композиции липид-терапевтический агент в форме набора. Набор типично будет состоять из контейнера, разделенного на отделения для размещения различных элементов набора. Набор будет содержать частицы или фармацевтические композиции по изобретению, предпочтительно в дегидратированной или концентрированной форме, с инструкциями по их регидратации или разведению и введению. В определенных вариантах исполнения частицы содержат активный агент, тогда как в других вариантах исполнения они его не содержат.

Фармацевтические композиции, содержащие агент, идентифицированный на модели скрининга печени, могут быть введены рядом способов в зависимости от желательности местного или системного лечения и от участка лечения. Введение может быть местным, легочным, например путем ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, в том числе с помощью распылителя; интратрахеальным, интраназальным, эпидермальным и трансдермальным) пероральным или парентеральным. Введение также может быть рассчитано на то, чтобы обеспечить предпочтительную локализацию в определенных тканях путем местной доставки, например путем прямой внутрисуставной инъекции в суставы, путем ректального введения для прямой доставки в пищеварительный тракт и кишечник, путем интравагинального введения для доставки в шейку матки и влагалище, путем интравитреального введения для доставки в глаз. Парентеральное введение включает внутривенную, внутриартериальную, внутрисуставную, подкожную, интраперитонеальную или внутримышечную инъекцию или инфузию; или внутрочерепное, например, интракраниальное или интравентрикулярное, введение.

Фармацевтические композиции и составы для местного введения могут содержать трансдермальные пластыри, жидкие мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Обычные фармацевтические носители, водные, порошкообразные или жировые основы, загустители и т.п. могут быть необходимыми или желательными. Также пригодными могут быть презервативы, перчатки и т.п. с нанесенным покрытием. Предпочтительные составы для местного применения включают такие, в которых dsPHK по 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, диолеилфосфатидилэтанолламин DOPE, димиристоилфосфатидилхолин DMPC, дистеароилфосфатидилхолин), отрицательно заряженные (negative) (например, димиристоилфосфатидилглицерин DMPG) и катионные (например, диолеилтетраметиламинопропил DOTAP и диолеилфосфатидилэтанолламин DOTMA). dsPHK по изобретению могут быть инкапсулированы в липосомах или могут образовывать комплексы с ними, в частности, с катионными липосомами. Альтернативно, dsPHK могут образовывать комплексы с липидами, в частности с катионными липидами. Предпочтительные жирные кислоты и сложные эфиры включают, без ограничений, арахидоновую кислоту, олеиновую кислоту, эйкозановую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолеовую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или C<sub>1-10</sub> алкильный сложный эфир (например изопропилмирилат, IPM), моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль). Композиции для местного применения описаны детально в патентной заявке США № 09/315298, поданной 20 мая 1999 г., которая целиком включена сюда посредством ссылки.

Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, микропорошки, нанопорошки, суспензии или растворы в водной или неводной среде, капсулы, гелевые капсулы, саше, таблетки или минитаблетки.

Загустители, вкусовые вещества, разбавители, эмульгаторы, диспергирующие агенты или связующие могут быть желательными. Предпочтительными композициями для перорального введения являются такие, в которых dsPHK по изобретению вводятся в сочетании с одним или несколькими веществами, усиливающими всасывание, поверхностно-активными веществами и комплексообразователями. Предпочтительные поверхностно-активные вещества включают жирные кислоты и/или сложные эфиры или их соли, желчные кислоты и/или их соли. Предпочтительные желчные кислоты/соли включают хенодезоксихолевую кислоту (CDCA) и урсодезоксихоленоезидоксихолевую кислоту (UDCA), холевую кислоту, дегидрохолевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, глухолевую кислоту, глихолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту, таурохолевую кислоту, тауродезоксихолевую кислоту, натрия тауро-24,25-дигидрофузидат и натрия гликодигидрофузидат. Предпочтительные жирные кислоты включают арахидоновую кислоту, ундекановую кислоту, олеиновую кислоту, луриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолеовую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или его моноглицерид, диглицерид или фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую). Также предпочтительными являются комбинации веществ, усиливающих всасывание, например жирных кислот/солей в комбинации с желчными кислотами/солями. Особенно предпочтительной комбинацией является натриевая соль лауриновой кислоты, каприновой кислоты и UDCA. Дополнительные вещества, усиливающие всасывание, включают простой полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир, простой полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир. DsPHK по изобретению могут быть введены перорально, в гранулированной форме, включающей высушенные методом распылительной сушки частицы, или в виде комплексов с образованием микро- или наночастиц. Комплексообразующие агенты для DsPHK включают полиаминокислоты; полиимины; полиакрилаты; полиалкилакрилаты, полиоксетаны, полиалкилцианоакрилаты; катионизированные желатины, альбумины, крахмалы, акрилаты, полиэтиленгликоли (ПЭГ) и крахмалы; полиалкилцианоакрилаты; DEAE-derivatизированные полиимины, пуллуланы (pollulans), целлюлозы и крахмалы. Особенно предпочтительные комплексообразующие агенты включают хитозан, N-триметилхитозан, поли-L-лизин, полигистидин, полиорнитин, полиспермины, протамин, поливинилпиридин, политиодиэтиламинометилэтилен P(TDAE), полиаминостирол (например p-амино), поли(метилцианоакрилат), поли(этилцианоакрилат), поли(бутилцианоакрилат), поли(изобутилцианоакрилат), поли(изогексилцианоакрилат), DEAE-метакрилат, DEAE-гексилакрилат, DEAE-акриламид, DEAE-альбумин и DEAE-декстран, полиметилакрилат, полигексилакрилат, поли(D,L-молочная кислота), поли(DL-молочная-ко-гликолевая кислота (PLGA), альгинат и полиэтиленгликоль (ПЭГ). Композиции для перорального введения dsPHK и их препараты описаны детально в заявках США № 08/886829 (поданной 1 июля 1997 г.), № 09/108673 (поданной 1 июля 1998 г.), № 09/256515 (поданной 23 февраля 1999 г.), 09/082624 (поданной 21 мая 1998 г.) и № 09/315298 (поданной 20 мая 1999 г.), которые все целиком включены сюда посредством ссылок.

Композиции и составы для парентерального, интратекального или интравентрикулярного введения могут содержать стерильные водные растворы, которые могут также включать буферы, разбавители и

другие пригодные добавки, такие как, без ограничений, вещества, усиливающие всасывание, соединения-носители и другие фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты.

Фармацевтические композиции включают, без ограничений, растворы, эмульсии и содержащие липосомы композиции. Такие композиции могут быть получены из различных компонентов, включая, без ограничений, предварительно подготовленные (preformed) жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества.

Фармацевтические композиции, которые могут быть удобно представлены в дозированных лекарственных формах, могут быть приготовлены в соответствии с обычными методиками, хорошо известными в фармацевтической промышленности. Такие методики включают стадию объединения активных ингредиентов с фармацевтическим носителем (носителями) или эксципиентом (эксципиентами). В общем, композиции готовят путем тщательного смешения до однородного состояния активных ингредиентов с жидкими носителями или тонкодисперсными твердыми носителями или обоими этими материалами, и затем, при необходимости, формования продукта.

Композиции могут быть изготовлены в виде любых из многих возможных дозированных форм, таких как, без ограничений, таблетки, капсулы, гелевые капсулы, жидкие сиропы, мягкие гели, суппозитории и клизмы. Композиции по изобретению также могут быть составлены в виде суспензий в водной, неводной или смешанной среде. Водные суспензии могут дополнительно содержать вещества, увеличивающие вязкость суспензии, включая, например, натрия карбоксиметилцеллюлозу, сорбит и/или декстран. Суспензия может также содержать стабилизаторы.

В одном варианте исполнения изобретения фармацевтические композиции могут быть приготовлены и использоваться в виде пен. Фармацевтические пены включают такие композиции, как, без ограничений, эмульсии, микроэмульсии, кремы, желе и липосомы. Будучи по существу схожими по природе, эти композиции различаются по входящим в их состав компонентам и консистенции конечного продукта. Приготовление таких композиций и составов является общеизвестным для квалифицированных специалистов в области фармацевтики и технологии составления композиций и может быть применено к составлению композиций по изобретению.

Настоящее изобретение не ограничено в его использовании деталями конструкции и расположения компонентов, указанными в приведенном далее описании. Изобретение охватывает другие варианты исполнения и может практиковаться или быть осуществленным различными способами. Также, фразеология и терминология, используемые в настоящем изобретении, применяются для описания и не должны считаться ограничивающими. Предусматривается, что использование терминов "включающий", "содержащий" или "имеющий", "с входящим в состав", "предусматривающий" и их варианты в данном описании, должны охватывать перечисленные после них элементы и их эквиваленты, а также дополнительные элементы.

### Примеры

Приведенные далее примеры предназначены для иллюстрации, без ограничения объема заявляемого изобретения.

Пример 1. In vivo эксперименты по подавлению экспрессии Фактора VII грызунов.

Мыши C57BL/6 (Charles River Labs, MA) и крысы Sprague-Dawley (Charles River Labs, MA) получали солевой раствор или композицию siРНК путем инъекции в хвостовую вену в объеме 0,01 мл/г. В различные моменты времени после введения, образцы сыворотки отбирали путем взятия проб крови из ретроорбитального синуса. Уровни белка Фактора VII в сыворотке определяют в образцах с использованием хромогенного анализа (Biophen FVII, Aniera Corporation, OH). Для определения уровней мРНК Фактора VII в печени животных умерщвляют и печень извлекают и мгновенно замораживают в жидком азоте. Готовят тканевые лизаты из замороженных тканей и уровни мРНК Фактора VII в печени количественно определяют с использованием анализа разветвленной ДНК (QuantiGene Assay, Panomics, CA).

Пример 2. Регуляция генной экспрессии млекопитающего с использованием частиц нуклеиновая кислота-липид.

Фактор VII (FVII), выдающийся белок в каскаде коагуляции, синтезируется в печени (гепатоциты) и секретируется в плазму. Уровни FVII в плазме могут быть определены путем простого, планшетного колориметрического анализа. По существу, FVII представляет собой удобную модель для определения siРНК-медируемой понижающей регуляции вырабатываемых гепатоцитами белков, а также для контроля концентраций в плазме и распределения в ткани частиц нуклеиновая кислота-липид и siРНК.

#### Резкое снижение активности Фактора VII у мышей

Оценивают активность FVII у получающих siРНК FVII животных через 24 ч после внутривенной (болюсной) инъекции C57BL/6 мышам. FVII измеряют с помощью коммерчески доступного набора для определения уровней белка в сыворотке или ткани, в соответствии с инструкциями производителя, на микропланшете. Определяют снижение FVII по сравнению с не получавшими препарата контрольными мышами, и результаты выражают в % остаточного FVII. Для начального скрининга каждой новой композиции липосом используют четыре уровня доз (2, 5, 12,5, 25 мг/кг siРНК FVII) и этот интервал доз расширяют в последующих исследованиях, основанных на результатах, полученных при первичном скрининге.

### Определение переносимости

Переносимость каждой новой липосомальной композиции siРНК оценивают путем контроля изменений веса, наблюдений за поведением в клетке, методами клинической химии и в некоторых случаях гематологии. Вес животных регистрируют перед введением препарата и через 24 ч после его введения. Данные регистрируют как % изменения веса тела. В дополнение к измерениям веса тела для каждого уровня доз (2, 5, 12,5 и 25 мг/кг siРНК) получали полный набор параметров клинической химии, включая маркеры функции печени, через 24 ч после инъекции, используя аликвоту сыворотки, взятой для анализа на FVII. Образцы направлялись для анализа в Центральную ветеринарную лабораторию (Central Laboratory for Veterinarians, Langley, BC). В некоторых случаях, в исследуемую группу включали дополнительных мышей для обеспечения возможности взятия цельной крови для гематологического анализа.

### Определение терапевтического индекса

Терапевтический индекс (ТИ) представляет собой произвольно устанавливаемый параметр, получаемый путем сравнения показателей токсичности и активности. Для данных исследований ТИ определяют как

$$TI = MTD \text{ (максимально переносимая доза)} / ED_{50} \text{ (доза, необходимая для 50\% подавления активности FVII)}$$

Для данных исследований MTD был определен как наименьшая доза, вызывающая >7% снижения веса тела и >200-кратное повышение аланинаминотрансферазы (ALT), маркера клинической химии с хорошей специфичностью к поражениям печени у грызунов. Величину ED50 определяют по кривым доза-активность для FVII.

Пример 3. Общий протокол метода экструзии

Липиды (Липид (I), (II), (III), (IV), (V) или (VI):DSPC:холестерин:DMG-ПЭГ) солюбилизируют и перемешивают в этаноле в соответствии с желательным молярным соотношением. Липосомы получают способом впрыскивания этанола, при котором смешанные липиды прибавляют к натрий-ацетатному буферу с 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. Готовят маточный раствор siРНК в ацетате натрия и 35% этаноле и прибавляют к липосомам для их наполнения. Раствор siРНК-липосомы инкубируют при 37°C в течение 30 мин и затем разбавляют. Этанол удаляют и заменяют на фосфатно-солевой (PBS) буфер путем диализа или проточной фильтрации с тангенциальным потоком.

Пример 4. Общий протокол метода смешения в потоке

Готовят индивидуальные и отдельные маточные растворы - один содержащий липид, и другой - siРНК. Липидный маточный раствор, содержащий Липид (I), (II), (III), (IV), (V) или (VI):DSPC:холестерин:ПЭГ-липид, получают путем солюбилизации в 90% этаноле. Остальные 10% приходятся на цитратный буфер с низким значением pH. Концентрация липидного маточного раствора составляет 4 мг/мл. Величина pH такого цитратного буфера может находиться в интервале значений pH 3-5, в зависимости от типа используемого способствующего слиянию липида. siРНК также солюбилизируют в цитратном буфере в концентрации 4 мг/мл. Для лабораторного (small scale) эксперимента готовят по 5 мл каждого маточного раствора.

Маточные растворы полностью прозрачны и липиды должны быть полностью солюбилизованы перед объединением с siРНК. Поэтому маточные растворы могут быть нагреты для полной солюбилизации липидов. Используемая в данном процессе siРНК может быть немодифицированными или модифицированными олигонуклеотидами и может быть конъюгирована с липофильными фрагментами, такими как холестерин.

Индивидуальные маточные растворы объединяют путем прокачивания насосом каждого раствора через тройниковый смеситель. Используют двухголовочный насос Watson-Marlow для одновременного контроля за началом и остановкой подачи двух потоков. К полипропиленовой трубке 1,6 мм присоединяют меньшую по размеру трубку диаметром 0,8 мм для увеличения линейной скорости подачи. Полипропиленовую трубку (внутренний диаметр (ID) = 0,8 мм) присоединяют к тройнику с обеих сторон. Полипропиленовый тройник имеет линейную кромку 1,6 мм с итоговым объемом 4,1 мм<sup>3</sup>. Каждый из больших концов (1,6 мм) полипропиленовой трубки помещают в лабораторные пробирки, содержащие маточный раствор солюбилизованного липида или солюбилизованной siРНК. После тройника устанавливают одну трубку, по которой должен выходить объединенный поток. Трубку заводят в контейнер с 2-кратным объемом по сравнению с PBS. PBS перемешивают с большой скоростью. Объемный расход насоса устанавливают на отметку 300 об/мин (rpm) или 110 мл/мин. Этанол удаляют и заменяют на PBS путем диализа. Липидные композиции затем концентрируют с помощью центрифугирования или диалитриции до требуемой рабочей концентрации.

Пример 5. Эффективность композиций с различными соотношениями липида

Испытывают различные соотношения липида, как указано в таблице ниже. Используют липид Т ("Т"), холестерин ("С") и ПЭГ-липид (ПЭГ-DMG). Относительное молярное процентное содержание компонентов приведено ниже. Так, "Т50-С40-Р10" содержит 50 мол.% липида Т, 40 мол.% холестерина и 10 мол.% ПЭГ-DMG. Используемый дуплекс siРНК представляет собой нацеливающий ген AD-1661

Фактора VII (FVII):

Обозначение дуплекса	Цель	Последовательность олигонуклеотида (oligoSeq)
AD-1661	смысловая	GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfdTsdT
	антисмысловая	GUfAAGACfUfUfGAGAUFGAUfCfCfdTsdT
План эксперимента		
Животные	C57BL/6	
Всего	57	
siPHK	1661	

Группа	Размер группы	Конц. (мг/мл)	Объем инъекции (мкл/г)	Доза (мг/кг)	Носитель
1	3		10	0,00	PBS
2	3	0,005	10	0,050	T50-C40-P10
3	3	0,001	10	0,010	T50-C40-P10
4	3	0,000	10	0,002	T50-C40-P10
5	3	0,005	10	0,050	T60-C30-P10
6	3	0,001	10	0,010	T60-C30-P10
7	3	0,000	10	0,002	T60-C30-P10
8	3	0,005	10	0,050	T55-C40-P5
9	3	0,001	10	0,010	T55-C40-P5
10	3	0,000	10	0,002	T55-C40-P5
11	3	0,005	10	0,050	T65-C40-P5
12	3	0,001	10	0,010	T65-C40-P5
13	3	0,000	10	0,002	T65-C40-P5
14	3	0,005	10	0,050	T40-D10-C40-P10
15	3	0,001	10	0,010	T40-D10-C40-P10
16	3	0,000	10	0,002	T40-D10-C40-P10
17	3	0,005	10	0,050	T50-D7,5-C37,5-P5
18	3	0,001	10	0,010	T50-D7,5-C37,5-P5
19	3	0,000	10	0,002	T50-D7,5-C37,5-P5

## Результаты (фиг. 1)

	Нормированные результаты			Среднее	Станд. отклонение
PBS	1,0777	0,8956	1,0267	1,0000	0,0940
T50-C40-P10	0,0130	0,0282	0,0413	0,0275	0,0142
	0,1673	0,2415	0,3961	0,2683	0,1167
	0,7941	0,6029	0,6279	0,6750	0,1039
T60-C30-P10	0,0155	0,0210	0,0115	0,0160	0,0048
	0,1984	0,1737	0,2282	0,2001	0,0273
	0,7082	0,7646	0,6351	0,7026	0,0649
T55-C40-P5	0,0727	0,0425	0,0885	0,0679	0,0234
	0,3301	0,5261	0,4033	0,4198	0,0990
	0,7570	0,7983	0,7479	0,7677	0,0269
T65-C40-P5	0,0348	0,0756	0,0308	0,0470	0,0248
	0,3034	0,3036	0,5193	0,3754	0,1246
	0,5293	0,5894	0,5610	0,5599	0,0300
T40-D10-C40-P10	0,0827	0,1229	0,1694	0,1250	0,0434
	0,5354	0,6237	0,6473	0,6021	0,0590
	1,1071	0,6696	0,8280	0,8682	0,2215
T50-D7,5-C37,5-P5	0,1257	0,0687	0,0650	0,0865	0,0340
	0,2956	0,6145	0,5443	0,4848	0,1676
	0,7589	0,7758	0,7661	0,7669	0,0084

Пример 6. Эффективность композиций, полученных смешением в потоке, на мышах

План эксперимента	
Животные	C57BL/6
Всего	21
siРНК	1661

Группа	Размер группы	Конц. (мг/мл)	Объем инъекции (мкл/г)	Доза (мг/кг)	Носитель
1	3		10	0,00	PBS
2	3	0,001	10	0,010	T60-D7,5-C31-P1,5 IL [0,4]
3	3	0,000	10	0,002	T60-D7,5-C31-P1,5 IL [0,4]
4	3	0,001	10	0,010	T60-D7,5-C31-P1,5 IL 12,5:1 липид:siРНК
5	3	0,000	10	0,002	T60-D7,5-C31-P1,5 IL 12,5:1 липид:siРНК
6	3	0,001	10	0,010	T50-D10-C38,5-P1,5 IL
7	3	0,000	10	0,002	T50-D10-C38,5-P1,5 IL

Результаты (фиг. 2)

Группа	мг/кг	Белок FVII			Нормированные		
		Ср.	Ст. откл.	Ингибирование, %	Ср.	Ст. откл.	Ингибирование, %
PBS		1,17	0,10	-17	1,00	0,08	0
T60-D7,5-C31-P1,5 IL [0,4]	0,01	0,55	0,01	45	0,47	0,01	53
	0,002	0,82	0,12	18	0,70	0,10	30
T60-D7,5-C31-P1,5 IL 12,5:1 липид:siРНК	0,01	0,21	0,05	80	0,18	0,04	82
	0,002	0,69	0,10	31	0,59	0,09	41
T50-D10-C38,5-P1,5 IL	0,01	0,59	0,16	41	0,50	0,14	50
	0,002	0,85	0,14	15	0,73	0,12	27

Пример 7. Эффективность на мышцах композиций, полученных смешением в потоке (IL), с различным составом липосом

План эксперимента	
Животные	C57BL/6
Всего	39
siРНК	1661

Группа	Размер группы	Конц. (мг/мл)	Объем инъекции (мкл/г)	Доза (мг/кг)	Носитель
1	3		10	0,00	PBS
2	3	0,0050	10	0,050	IL 60-7,5-31-1,5 10 mM цитрат рН3
3	3	0,0010	10	0,010	IL 60-7,5-31-1,5 10 mM цитрат рН3
4	3	0,0002	10	0,002	IL 60-7,5-31-1,5 10 mM цитрат рН3
5	3	0,0050	10	0,050	IL 50-10-38,5-1,5
6	3	0,0010	10	0,010	IL 50-10-38,5-1,5
7	3	0,0002	10	0,002	IL 50-10-38,5-1,5
8	3	0,0050	10	0,050	IL 60-38,5-1,5
9	3	0,0010	10	0,010	IL 60-38,5-1,5
10	3	0,0002	10	0,002	IL 60-38,5-1,5
11	3	0,0050	10	0,050	IL 40-20-38,5-1,5
10	3	0,0010	10	0,010	IL 40-20-38,5-1,5
11	3	0,0002	10	0,002	IL 40-20-38,5-1,5

Результаты (фиг. 3)

Группа	мг/кг	Белок FVII			Нормированные		
		Ср.	Ст. откл.	Ингибирование, %	Ср.	Ст. откл.	Ингибирование, %
PBS		0,88	0,13	12	1,00	0,14	0
IL 60-7,5-31-1,5 10 мМ цитрат рН3	0,05	0,04	0,01	96	0,05	0,01	95
	0,01	0,32	0,04	68	0,36	0,04	64
	0,002	0,74	0,05	26	0,84	0,06	16
IL 50-10-38,5-1,5	0,05	0,07	0,02	93	0,08	0,02	92
	0,01	0,45	0,09	55	0,51	0,10	49
	0,002	0,89	0,15	11	1,02	0,17	-2
IL 60-38,5-1,5	0,05	0,02	0,00	98	0,02	0,00	98
	0,01	0,32	0,12	68	0,36	0,13	64
	0,002	0,75	0,15	25	0,86	0,17	14
IL 40-20-38,5-1,5	0,05	0,29	0,04	71	0,33	0,05	67
	0,01	0,71	0,24	29	0,81	0,28	19
	0,002	0,76	0,11	24	0,87	0,12	13

Пример 8. Эффективность IL-композиций с различными ПЭГ и нейтральными липидами у мышей. Оценивали эффект длины цепи модифицирующего ПЭГ или нейтральных липидов. В качестве нейтральных липидов испытывали DOPC (диолеоилфосфатидилхолин) или DMPC (димиристоилфосфатидилхолин). Также тестировали липиды, конъюгированные с mПЭГ 2000 с длиной цепи C10 или C18, в количестве 1,5 мол.% Обозначение "IL" ниже указывает, что частицы были получены методом смешения в потоке.

План эксперимента	
Животные	C57BL/6
Всего	57
siРНК	1661

Группа	Размер группы	Конц (мг/мл)	Объем инъекции (мкл/г)	Доза (мг/кг)	Носитель
1	3		10	0,00	PBS
2	3	0,0050	10	0,050	50-10-38,5-1,5
3	3	0,0010	10	0,010	50-10-38,5-1,5
4	3	0,0002	10	0,002	50-10-38,5-1,5
5	3	0,0050	10	0,050	IL 45-15-38,5-1,5 (DOPC)
6	3	0,0010	10	0,010	IL 45-15-38,5-1,5 (DOPC)
7	3	0,0002	10	0,002	IL 45-15-38,5-1,5 (DOPC)
8	3	0,0050	10	0,050	IL 45-15-38,5-1,5 (DMPC)
9	3	0,0010	10	0,010	IL 45-15-38,5-1,5 (DMPC)
10	3	0,0002	10	0,002	IL 45-15-38,5-1,5 (DMPC)
11	3	0,0050	10	0,050	IL 45-15-38,5-1,5
12	3	0,0010	10	0,010	IL 45-15-38,5-1,5
13	3	0,0002	10	0,002	IL 45-15-38,5-1,5
14	3	0,0050	10	0,050	50-10-38,5-1,5 (C10ПЭГ)
15	3	0,0010	10	0,010	50-10-38,5-1,5 (C10ПЭГ)
16	3	0,0002	10	0,002	50-10-38,5-1,5 (C10ПЭГ)
17	3	0,0050	10	0,050	50-10-38,5-1,5 (C18ПЭГ)
18	3	0,0010	10	0,010	50-10-38,5-1,5 (C18ПЭГ)
19	3	0,0002	10	0,002	50-10-38,5-1,5 (C18ПЭГ)

Результаты: (фиг. 4)

Группа	Белок FVII				Нормированные		
	мг/кг	Ср.	Ст. откл.	Ингибирование, %	Ср.	Ст. откл.	Ингибирование, %
PBS		1,33	0,14	-33	1,00	0,11	0
50-10-38,5-1,5	0,05	0,12	0,02	88	0,09	0,02	91
	0,01	0,90	0,13	10	0,68	0,10	32
	0,002	1,09	0,13	-9	0,82	0,10	18
50-10-38,5-1,5 (C10ПЭГ)	0,05	0,28	0,01	72	0,21	0,01	79
	0,01	0,98	0,08	2	0,73	0,06	27
	0,002	1,32	0,09	-32	0,99	0,07	1
50-10-38,5-1,5 (C18ПЭГ)	0,05	0,11	0,01	89	0,08	0,01	92
	0,01	0,81	0,06	19	0,61	0,04	39
	0,002	1,26	0,20	-26	0,95	0,15	5
IL 45-15-38,5-1,5	0,05	0,14	0,02	86	0,10	0,01	90
	0,01	0,67	0,27	33	0,50	0,20	50
	0,002	1,01	0,16	-1	0,76	0,12	24
IL 45-15-38,5-1,5 (DOPC)	0,05	0,06	0,02	94	0,04	0,01	96
	0,01	0,32	0,11	68	0,24	0,08	76
	0,002	1,21	0,23	-21	0,91	0,17	9
IL 45-15-38,5-1,5 (DMPC)	0,05	0,33	0,20	67	0,25	0,15	75
	0,01	0,46	0,15	54	0,35	0,11	65
	0,002	0,20	0,02	80	0,15	0,02	85

Пример 9. Реакция на дозу AF12 у мышей

Мышам C57BL/6 (Charles River Labs, MA) и крысам Sprague-Dawley (Charles River Labs, MA) вводили солевой раствор или приготовленную композицию siРНК инъекцией в хвостовую вену в объеме 0,01 мл/г. В различные моменты времени после введения берут образцы сыворотки из крови ретроорбитального синуса. Уровни белка Фактора VII в сыворотке определяют в образцах методом хромогенного анализа (Biophen FVII, Aniaga Corporation, OH). Для определения уровней мРНК Фактора VII в печени животных умерщвляют, извлекают печень и мгновенно замораживают в жидком азоте. Готовят лизаты из замороженной ткани и уровни мРНК Фактора VII в печени количественно оценивают методом анализа разветвленной ДНК (QuantifGene Assay, Panomics, CA).

Эксперименты *in vivo* проводили с использованием липосомальных композиций, содержащих различные концентрации AF12 в композиции липосом. Проводят испытания для определения реакции на дозу AF12 от 0,001 до 0,3 мг/кг, используя стандартный дуплекс 1661 siРНК Фактора VII (FVII). Эти результаты сравнивают с контролем люциферазой (дуплекс 1955), как показано на фиг. 6. Используют по пять животных в каждой из восьми групп на генотип в эксперименте - в общей сложности 40 животных. Как показано на фиг. 6, увеличение дозы композиции липосом обычно приводит к увеличению величины резкого снижения FVII.

План эксперимента	
Животные	C57BL6
Всего	40

Группа	Размер группы	Мишень	siРНК	Конц. (мг/мл)	Объем инъекции (мкл/г)	Доза (мг/кг)	Носитель/Композиция
1	5	Luc	1955		10		PBS
2	5	FVII	1661	0,03	10	0,300	AF12
3	5	FVII	1661	0,03	10	0,300	AF12
4	5	FVII	1661	0,01	10	0,100	AF12
5	5	FVII	1661	0,003	10	0,030	AF12
6	5	FVII	1661	0,001	10	0,010	AF12
7	5	FVII	1661	0,0003	10	0,003	AF12
8	5	FVII	1661	0,0001	10	0,001	AF12

Пример 10. Эффективность липосомальных композиций AF12 у AроЕ нокаут (KO)-мышей

Для дополнительных исследований роли AроЕ в эффективности различных AF12 вводили липосо-

мальные композиции, содержащие композицию siPHK AD-1661, в различных концентрациях.

Эксперименты *in vivo* проводят с использованием липосомальных композиций, содержащих липиды, конъюгированные с ApoE или N-ацетилгалактозамином (GalNAc). GalNAc был выбран как возможный нацеливающий лиганд, так как считается, что рецептор GalNAc экспрессируется в печени в больших количествах. Поэтому были проведены исследования с использованием C57BL/6 и ApoE нокаут-мышей, по существу, как описано в примере 6, для испытаний эффективности композиций AF12, дополнительно содержащих различные концентрации GalNAc3-ПЭГ-DSG липидов. Во всех экспериментах общее количество ПЭГ-конъюгированных липидов поддерживали постоянным (например, в случае прибавления 0,5 мол.% GalNAc3-ПЭГ, соответствующее количество ПЭГ-DMG уменьшали на 0,5 мол.% для сохранения общего количества ПЭГ-липидов, равного 1,5 мол.%).

Как показано на фиг. 7, прибавление ApoE к композиции липосом оказывает эффект от незначительного до отсутствия влияния на реакцию на дозу композиции липосом, содержащей AF12. Композиции, содержащие GalNAc3, по-видимому, являются немного менее эффективными по подавлению активности FVII.

План эксперимента							
Животные		ApoE нокаут (KO)-мыши					
Всего		39					
Группа	Размер группы	Мишень	siPHK	Конц. (мг/мл)	Объем инъекции (мкл/г)	Доза (мг/кг)	Носитель
1	3				10		C12-200BS
2	3	FVII	1661	0,02	10	0,200	AF12
3	3	FVII	1661	0,006	10	0,060	
4	3	FVII	1661	0,002	10	0,020	
5	3	FVII	1661	0,0006	10	0,006	
6	3	FVII	1661	0,020	10	0,200	C12-200 + ApoE
7	3	FVII	1661	0,006	10	0,060	
8	3	FVII	1661	0,002	10	0,020	AF12
9	3	FVII	1661	0,0006	10	0,006	
10	3	FVII	1661	0,020	10	0,200	C12-200 + 0,5% GalNAc3-ПЭГ-Липид
11	3	FVII	1661	0,006	10	0,060	
12	3	FVII	1661	0,002	10	0,020	
13	3	FVII	1661	0,0006	10	0,006	

Пример 11. Испытания AF12 на мышцах WT (дикого типа) и ApoE-мышцах и WT и LDLR нокаут-мышцах

Для исследования ApoE-зависимости различных AF12 липосомальных композиций оценивали эффективность таких липосомальных композиций у LDLR (рецептор липопротеинов низкой плотности (LDL))-дефицитных мышей. Пониженная эффективность липосомальных композиций у LDLR-дефицитных мышей позволит предположить существование ApoE-зависимости. Мышам дикого типа и LDLR KO (нокаут)-мышам вводили липосомальные композиции AF12, содержащие композицию siPHK AD-1661, в различных концентрациях, как указано ниже. Первая группа получала PBS в качестве негативного контроля.

Группа	Мыши	Мишень	siPHK	Конц. (мг/мл)	Объем инъекции (мкл)	Доза (мг/кг)	Носитель
1	C57Bl/6	Luc			10		PBS
2	C57Bl/6	FVII	1661	0,03	10	0,300	AF12
3	C57Bl/6	FVII	1661	0,03	10	0,300	AF12
4	C57Bl/6	FVII	1661	0,01	10	0,100	AF12
5	C57Bl/6	FVII		0,003	10	0,030	AF12
6	C57Bl/6	FVII	1661	0,001	10	0,010	AF12
7	C57Bl/6	FVII	1661	0,0003	10	0,003	AF12
8	LDLR KO				10		PBS
9	LDLR KO	Luc	1955	0,03	10	0,300	AF12
10	LDLR KO	FVII	1661	0,03	10	0,300	AF12
11	LDLR KO	FVII	1661	0,01	10	0,100	AF12
12	LDLR KO	FVII	1661	0,003	10	0,030	AF12
13	LDLR KO	FVII	1661	0,001	10	0,010	AF12
14	LDLR KO	FVII	1661	0,0003	10	0,003	AF12

Результаты представлены на фиг. 8, который выглядит аналогично повышенной эффективности у LDLR (рецептор липопротеинов низкой плотности)-дефицитных мышей, что позволяет предположить отсутствие ApoE-зависимости таких липосомальных композиций.

Пример 12. Эффект ApoE- или GalNAc-липидов на эффективность AF12 у ApoE-дефицитных мышей

Для исследования эффекта композиций AF12 на ApoE-дефицитных мышей вводили различные концентрации AF12 в присутствии ApoE или нацеливающего липида GalNAc, как детально описано ниже.

План эксперимента	
Животные	ApoE нокаут (KO)-мыши
Всего	45

Группа	Размер группы	Мишень	siPHK	Конц. (мг/мл)	Объем инъекции (мкл/г)	Доза (мг/кг)	Носитель
1	3				10		PBS
2	3	FVII	1661	0,02	10	0,200	AF12
3	3	FVII	1661	0,006	10	0,060	
4	3	FVII	1661	0,002	10	0,020	
5	3	FVII	1661	0,0006	10	0,006	
6	3	FVII	1661	0,020	10	0,200	AF12+ApoE
7	3	FVII	1661	0,006	10	0,060	
8	3	FVII	1661	0,002	10	0,020	
9	3	FVII	1661	0,0006	10	0,006	
10	3	FVII	1661	0,020	10	0,200	AF12+0,5% GalNAc
11	3	FVII	1661	0,006	10	0,060	
12	3	FVII	1661	0,002	10	0,020	
13	3	FVII	1661	0,0006	10	0,006	
14	3	FVII	1661	0,0300	10	0,300	5% PEDDSG + 0,5% GalNAc
15	3	FVII	1661	0,0100	10	0,100	5% PEDDSG + 0,5% GalNAc

Как показано на фиг. 9a и 9b, наблюдаемые различия в эффективности липосомальных композиций у ApoE-нокаут мышей и мышей дикого типа имеют величину от незначительной до отсутствующей. Такое поведение наблюдается для ApoE-содержащих липосомальных композиций, а также для GalNAc3-содержащих композиций. Фиг. 9a изображает реакцию на дозу у ApoE-нокаут мышей, а фиг. 9b показывает реакцию на дозу у мышей дикого типа.

Пример 13. Подавление активности (silencing) Tie2 с помощью композиции, содержащей Липид Т

Для испытаний доставки нуклеиновых кислот с использованием описанных тут композиций был выбран эндотелий-специфический маркер, ТЕК тирозинкиназа. Были приготовлены композиции дуплекса siPHK AD-27430, нацеленного на Tie2, или люциферазы ("Luc"), имеющей следующую последова-

тельность, с AF-012 или AF-011:

обозначение дуплекса	мышь	цепь	обозначение олигонуклеотида	последовательность олигонуклеотида
AD-27430.1	ТЕК	смыслов.	A-62836.1	GAAGAuGcAGuGAuuuAcAdTsdT
	ТЕК	антисм.	A-62837.1	UGuAAAUCACUGcAUCUUCdTsdt

Сокращенные обозначения нуклеотидных мономеров, используемых для представления последовательностей нуклеиновых кислот. Следует понимать, что такие мономеры, в случае их присутствия в олигонуклеотиде, соединены друг с другом с помощью 5'-3'-фосфодиэфирных связей.

Сокращенное обозначение	Нуклеотид(ы)
A	Аденозин
C	Цитидин
G	Гуанозин
T	Тимидин
U	Уридин
N	любой нуклеотид (G, A, C, T или U)
a	2'-О-метиладенозин
c	2'-О-метилцитидин
g	2'-О-метилгуанозин
U	2'-О-метилуридин
dT	2'-дезокситимидин
S	фосфоротиоатная связь

Мышам вводили композиции в соответствии с протоколами "высокой дозы" или "низкой дозы", описанными ниже.

В протоколе высокой дозы, мышам вводят две дозы PBS, липидной композиции siPHK, нацеленной на Tie2, или липидной композиции siPHK, нацеленной на люциферазу (n=5 на группу) как указано в таблице.

#### Подготовительная/высокая доза (две инъекции)

Липидная композиция	День 1	День 2	День 4
AF-012: Липид T/DSPC/Chol/ПЭГ-DMG 50/10/38,5/1,5	0,6 мг/кг	2,0 мг/кг	умерщвлены
AF-011: Липид M/DSPC/Chol/ПЭГ-DMG 50/10/38,5/1,5	1,0 мг/кг	2,0 мг/кг	умерщвлены

В эксперименте с "низкой дозой", мышам вводят разовую дозу липидной композиции siPHK, нацеленной на Tie2 (N=4), или липидной композиции siPHK, нацеленной на люциферазу (n=1, только для AF-012) как указано в таблице ниже.

#### Низкая доза (одна инъекция)

Липидная композиция	День 1	День 2	День 4
AF-012: Липид T/DSPC/Chol/ПЭГ-DMG 50/10/38,5/1,5		0.6 мг/кг	Умерщвлены
AF-011: Липид M/DSPC/Chol/ПЭГ-DMG 50/10/38,5/1,5	0.6 мг/кг		Умерщвлены

Как показано в приведенных ниже таблицах, композиции siPHK, содержащие AF-012, вызывали эффективное подавление активности в эндотелии разных частей сосудистого ложа, включая печень, легкое, сердце и почку. Не наблюдалось подавления активности композициями AF-011, не содержащими Липид Т.

### Результаты экспериментов с высокой дозой

Уровень мРНК Tie2, нормированный по GAPDH, VE-кадгерину или VEGFR-2

ВЫСОКАЯ ДОЗА (0,6 + 2,0 мг/кг)	Tie2/GAPDH	Tie2/VE-кадгерин	Tie2/VEGFR-2	Среднее
Печень	71% (78%)	78% (85%)	88% (82%)	78%
Легкое	ND	50%	42%	46%
Скелетная мышца*	(58%)	ND	ND	(58%)
Сердце	76%	69%	74%	73%
Почка	40%	(65%)	ND	52%
Гипоталамус	0%			

ND - нет данных

### Результаты экспериментов с низкой дозой

НИЗКАЯ ДОЗА (0,6 мг/кг)	Tie2/GAPDH	Tie2/VE-кадгерин	Tie2/VEGFR-2	Среднее
Печень	64% (78%)	59% (65%)	82% (84%)	68%
Легкое	ND	0%	0%	0%

Результаты представлены на фиг. 10А-15. Фиг. 10А-10В показывают резкое снижение (KD) экспрессии Tie2 в сердце, по сравнению с экспрессией GAPDH (фиг. 10А), рецептора 2 VEGF (VEGFR2) (фиг. 10Б) и Ve-кадгерина (фиг. 10В). siРНК Tie2 подавляла активность Tie2 только в тех случаях, когда siРНК входила в состав композиции AF-012, но не когда siРНК входила в состав композиции AF-011.

Фиг. 11А, 11Б и 12А показывают резкое снижение (KD) экспрессии Tie2 в печени под действием siРНК в композиции AF-012 (фиг. 11А и 12А), но не для AF-011 (фиг. 11Б). Высокие дозы представлены как 2.0 (в этом режиме вводилось 0,6 и 2,0 мг/кг); низкие дозы представлены как 0.6 (вводилось 0,6 мг/кг).

Также наблюдалось увеличение экспрессии VEGFR2 в печени в ответ на введение siРНК Tie2 (фиг. 12Б).

Фиг. 13А и 13Б показывают подавление (KD) экспрессии Tie2 в легком под действием siРНК в составе композиции AF-012. Экспрессию Tie2 сравнивают с экспрессией VE-кадгерина (фиг. 13А) и VEGFR-2 (фиг. 13Б). Фиг. 14А и 14Б показывают подавление экспрессии Tie2 в почке и скелетной мышце соответственно, под действием siРНК в составе композиции AF-012, но не в составе композиции AF-011.

Фиг. 15 представляет собой график, показывающий, что siРНК Tie2 не подавляет (KD) генную экспрессию в гипоталамусе, когда siРНК входит в состав AF-012 или AF-011.

Эти результаты показывают, что липосомы, содержащие липид Т, особенно пригодны для siРНК, которые должны быть нацелены на подавление активности гена в эндотелиальных тканях.

Был проведен отдельный (separate) эксперимент по определению реакции на дозу. Вкратце, 7 группам самок C57B16 (по 5 мышей в группе) вводят 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 и 0,6 мг/кг (в День -1) + 2,0 мг/кг (в День 0). Ткани и органы собирают через 72 ч и измеряют уровни Tie2 в этих тканях. Фиг. 16А-Б демонстрируют дозозависимое резкое снижение экспрессии Tie2 в печени и скелетной мышце соответственно. Фиг. 17А-Б показывают резкое снижение Tie2 в селезенке и сердце соответственно. Фиг. 18А-Б показывают резкое снижение Tie2 в почке и жировой ткани при разных дозах соответственно.

Пример 14. Липидная композиция, содержащая множество разных siРНК

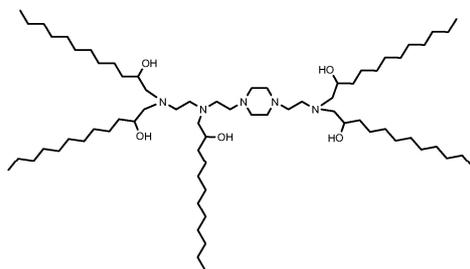
В результате относительно широкого терапевтического окна, создаваемого описанными тут композициями, была проверена возможность подавления активности множественных генов в печени путем разового внутривенного (i.v.) введения. Можно предположить, что способность регулировать множественные гены может обеспечить действенный терапевтический подход к болезням, для которых были идентифицированы множественные гены-мишени. Для исследования осуществимости такого подхода, последовательности siРНК против мишеней в печени, представляющих возможный терапевтический интерес -Фактора VII, ApoB, PCSK9, Xbp1, SORT1, TTR1, TTC39B, ITGb1, ApoC3 и Rab5c -были объединены и введены в частицы, содержащие липид TechG1.

В исследованиях подавления активности множественных генов оценивали уровни мРНК Фактора VII, ApoB, PCSK9, Xbp1, SORT1, TTR1, TTC39B, ITGb1, ApoC3 и Rab5c в печени, взятой у мышей, которым были введены дозы композиций, содержащих пул 10 siРНК или контрольных неродственных siРНК, нацеленных на люциферазу, в композиции, содержащей липид TechG1. Липидная частица (AF12) содержит следующие компоненты (в мол.%): TechG1:DSPC:Chol:ПЭГ-DMG (50 мол.:%:10 мол.:%:38,5 мол.:%:1,5 мол.:%): при соотношении липид:siРНК, равном приблизительно 11. Через 48 ч после разовой инъекции в хвостовую вену мыши в дозе 0,1 мг/кг для каждой siРНК анализируют экспрессию этих генов-мишеней на уровне мРНК. Вкратце, замороженную ткань печени измельчают и готовят лизаты тка-



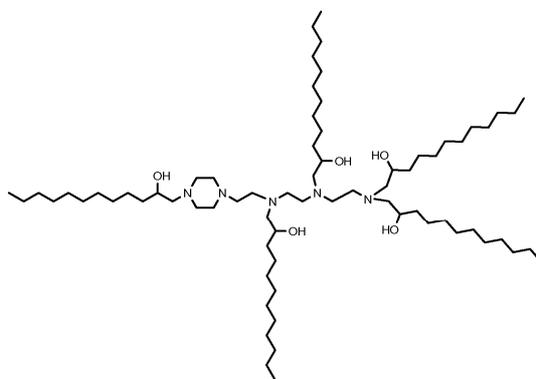


3. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что R<sup>2</sup> представляет собой C<sub>8-12</sub>алкил.  
 4. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что соединение формулы (IV) представляет собой соединение формулы (V)



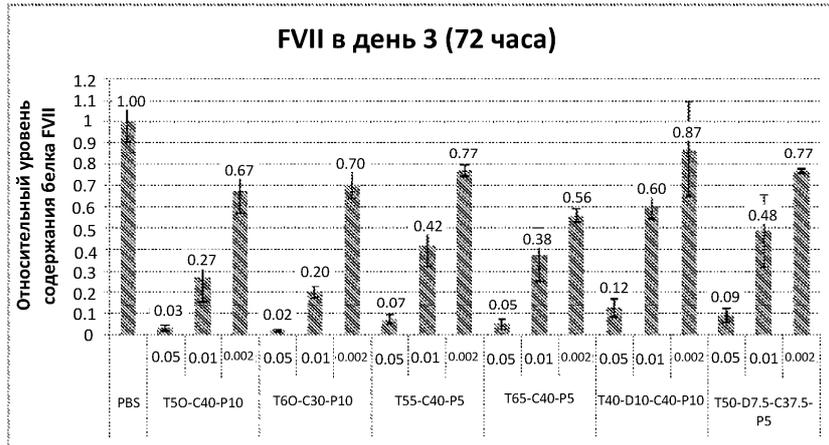
формула (V).

5. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что соединение формулы (III) представляет собой соединение формулы (VI)

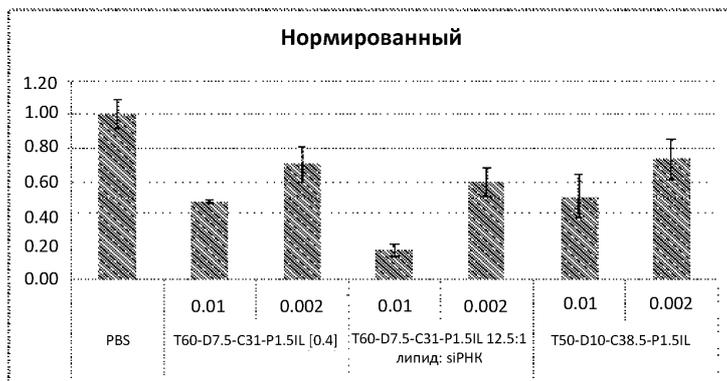


формула (VI).

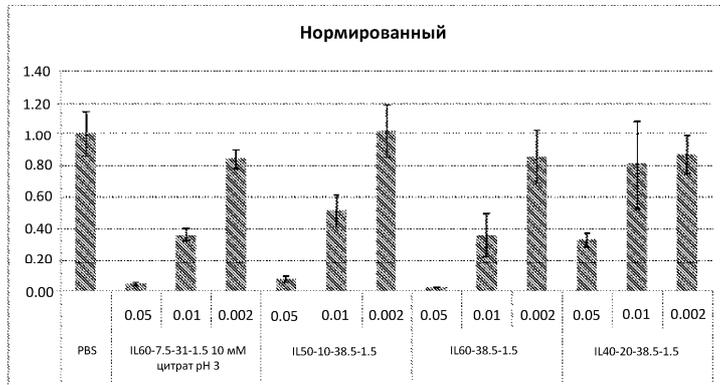
6. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что стерол представляет собой холестерин.  
 7. Композиция по п.1, содержащая примерно 50% соединения формулы (III) или (IV), или их смеси, примерно 38,5% стерола и примерно 1,5% ПЭГ или модифицированного ПЭГ липида, и примерно 10% нейтрального липида.  
 8. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что дополнительно содержит нацеливающий липид, включающий N-ацетилгалактозамин в качестве нацеливающего фрагмента.  
 9. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что представляет собой ассоциированный комплекс.  
 10. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что представляет собой липосому.  
 11. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что дополнительно содержит агент на основе нуклеиновой кислоты, выбранный из группы, включающей одноцепочечные ДНК или РНК, двухцепочечные ДНК или РНК, и гибрид ДНК-РНК.  
 12. Композиция по п.11, отличающаяся тем, что агент на основе нуклеиновой кислоты представляет собой siРНК.  
 13. Композиция по п.11, отличающаяся тем, что агент на основе нуклеиновой кислоты представляет собой mРНК.  
 14. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что дополнительно содержит по меньшей мере один аполипопротеин.



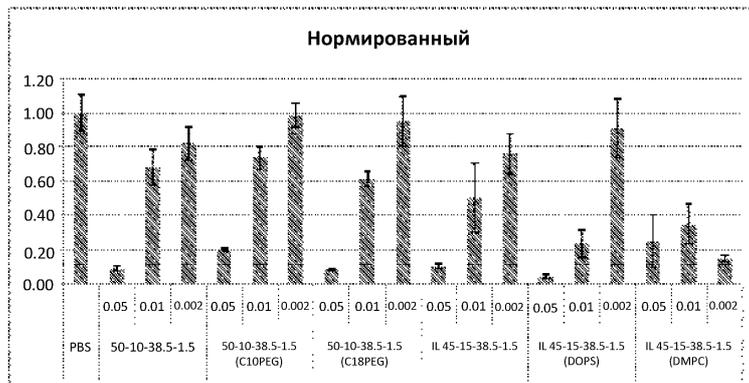
Фиг. 1



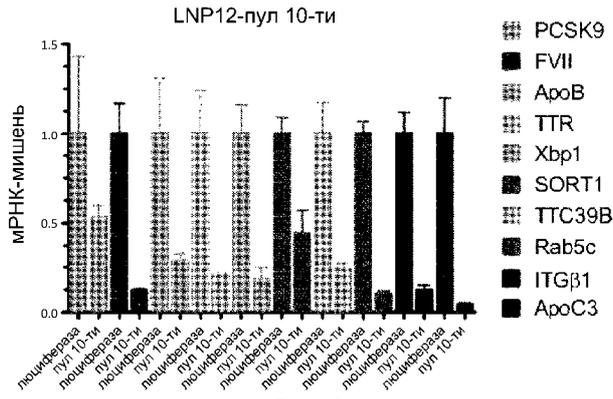
Фиг. 2



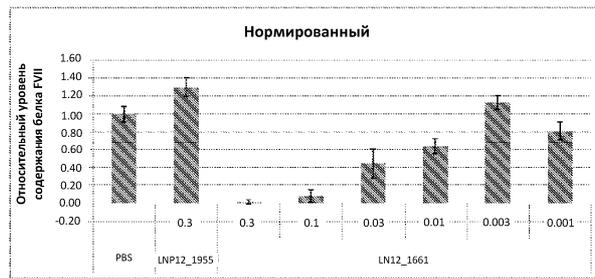
Фиг. 3



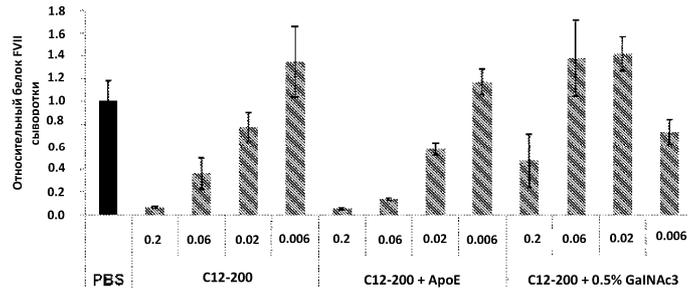
Фиг. 4



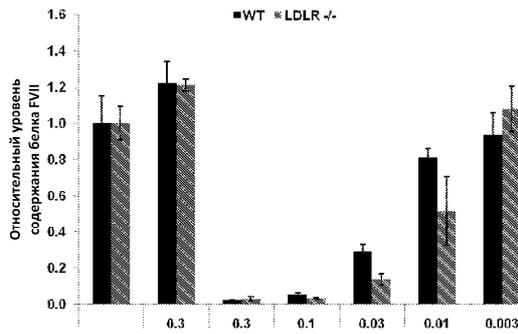
Фиг. 5



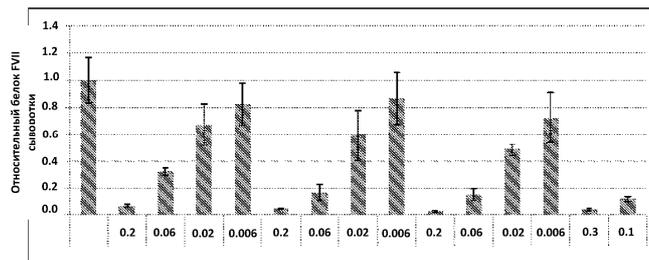
Фиг. 6



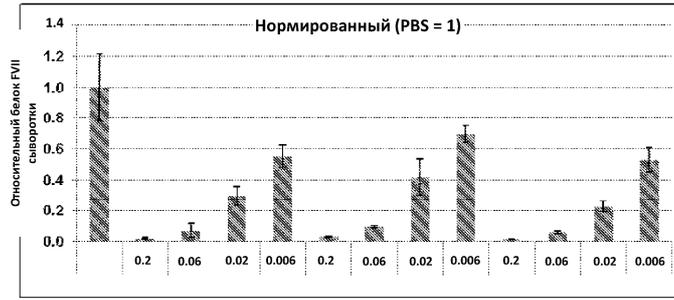
Фиг. 7



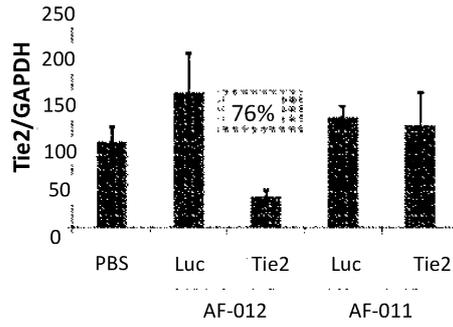
Фиг. 8



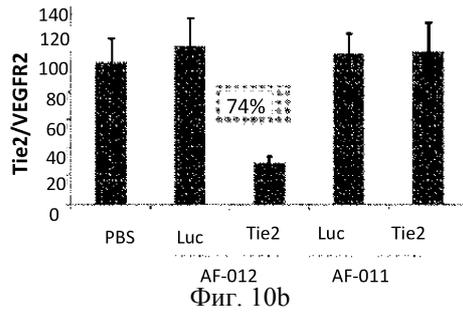
Фиг. 9а



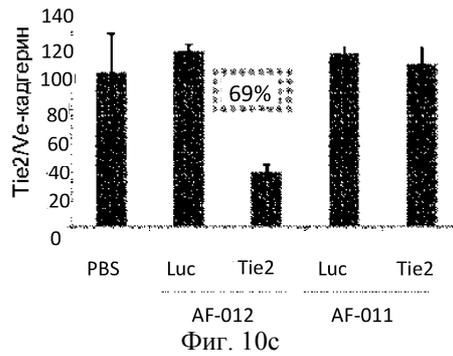
Фиг. 9b



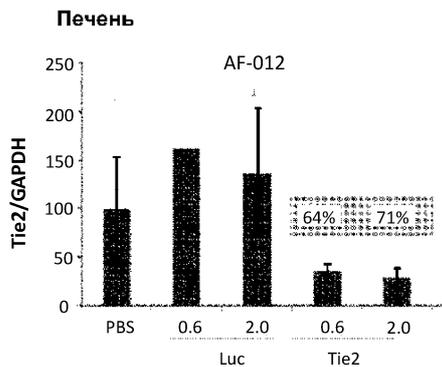
Фиг. 10a - Сердце



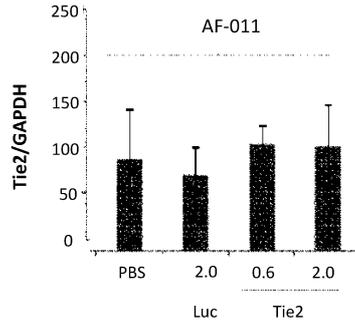
Фиг. 10b



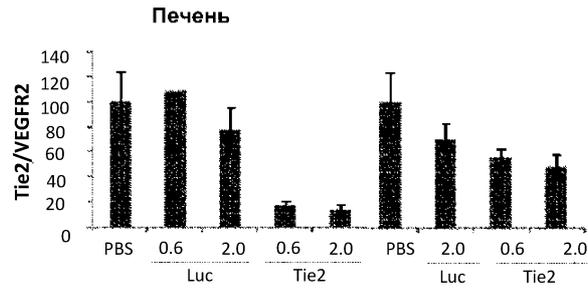
Фиг. 10c



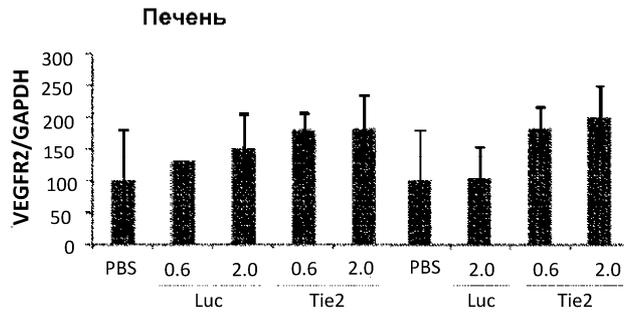
Фиг. 11a



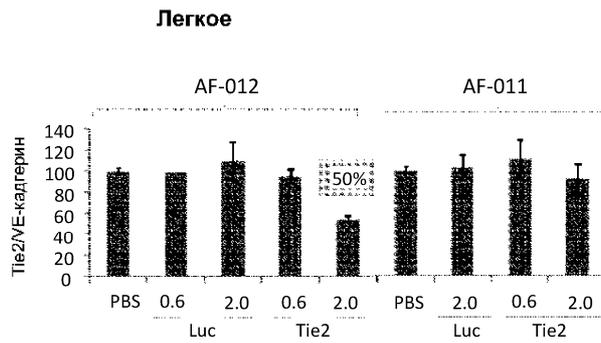
Фиг. 11b



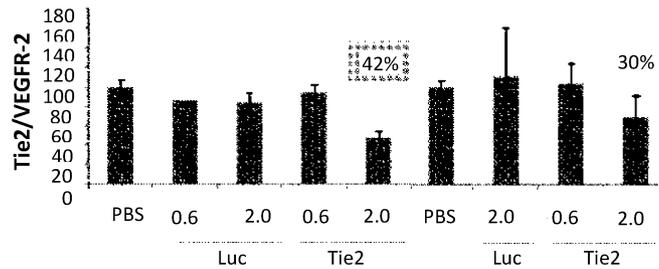
Фиг. 12a



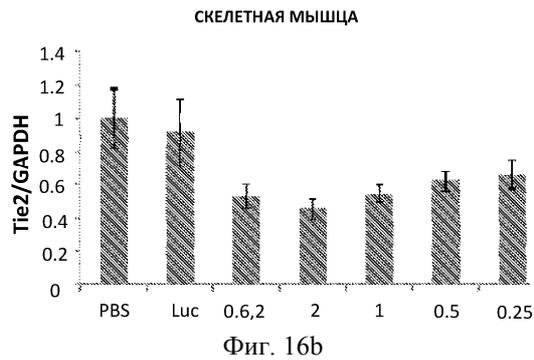
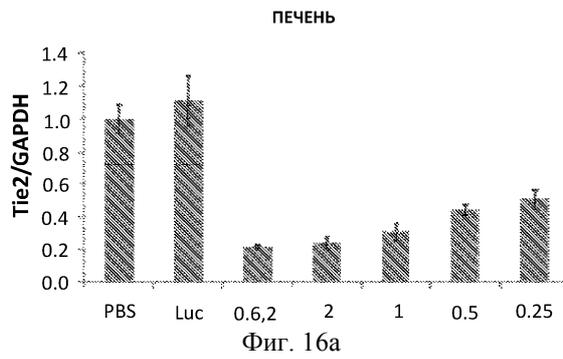
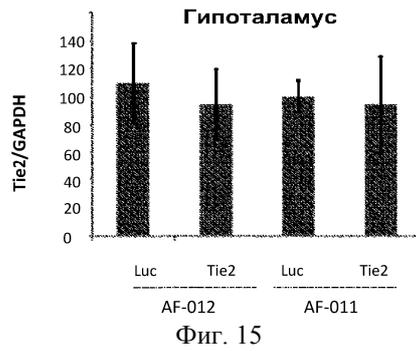
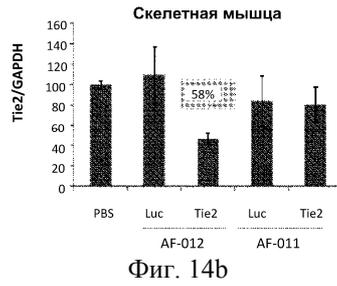
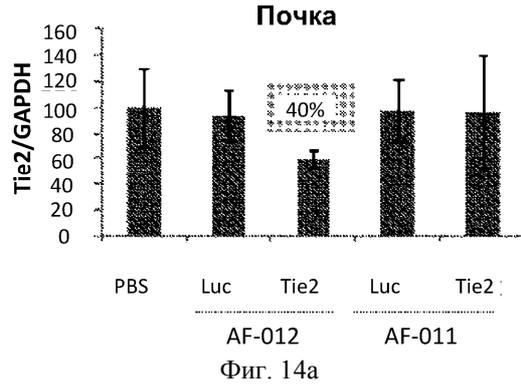
Фиг. 12b



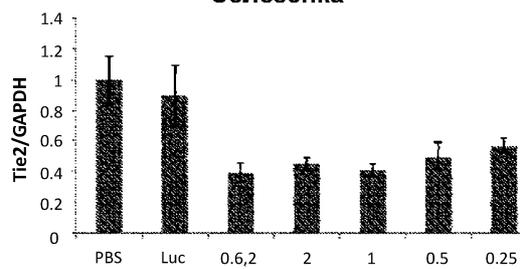
Фиг. 13a



Фиг. 13b

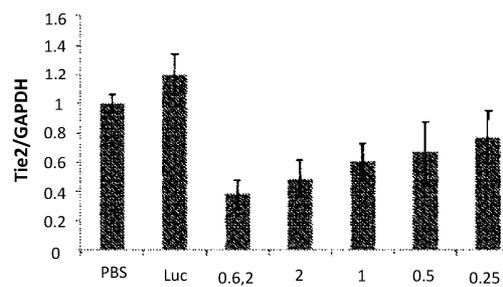


## Селезенка



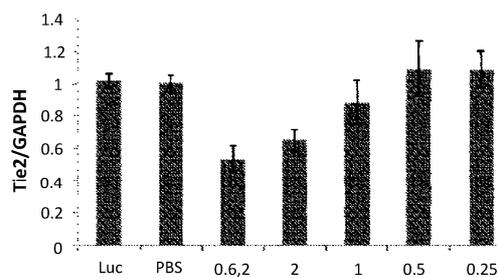
Фиг. 17а

## Сердце



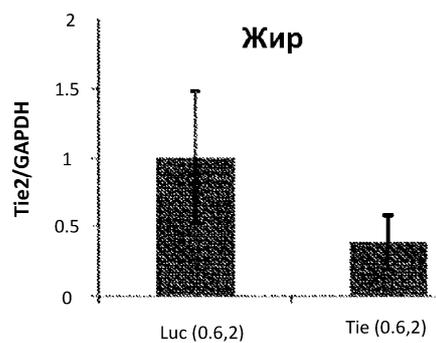
Фиг. 17б

## Почка



Фиг. 18а

## Жир



Фиг. 18б

