

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **038277**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.08.04**

**(51)** Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)

**(21)** Номер заявки  
**201890940**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.10.14**

---

**(54) Р-ЭТОКСИ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ ДЛЯ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ  
ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ**

---

**(31)** 62/241,503

**(56)** US-A-6015886

**(32)** 2015.10.14

WO-A2-9707784

**(33)** US

WO-A2-0160998

**(43)** 2018.10.31

YOLANDA GUTIÉRREZ-PUENTE ET AL.:

**(86)** PCT/US2016/057148

"Cellular pharmacology of p-ethoxy antisense oligonucleotides targeted to Bcl-2 in a follicular lymphoma cell line", LEUKEMIA AND LYMPHOMA, vol. 44, no. 11, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 1979-1985, XP055333566, US, ISSN: 1042-8194, DOI: 10.1080/1042819031000099733, the whole document

**(87)** WO 2017/066643 2017.04.20

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**БАЙО-ПАТ ХОЛДИНГЗ, ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Нильсен Питер (US)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

---

**(57)** В данном документе предложены терапевтические олигонуклеотиды, которые содержат по меньшей мере одну р-этоксильную связь остова, но не более 80% р-этоксильных связей остова. В данном документе предложены улучшенные системы доставки для терапевтических олигонуклеотидов, содержащие липосому, которая содержит нейтральные фосфолипиды и р-этоксильный олигонуклеотид, который заключен в липосому.

**B1**

**038277**

**038277**

**B1**

В данном изобретении испрашивается приоритетное преимущество предварительной заявки Соединенных Штатов 62/241503, поданной 14 октября 2015 года, полное содержание которой включено в данном документе путем ссылки.

### Уровень техники

#### 1. Область техники.

Данное изобретение в целом относится к области медицины. Более конкретно, речь идет о липосомальных лекарственных формах р-этокси олигонуклеотидов, способах получения и применения таких составов в медицине.

#### 2. Описание предшествующего уровня техники.

Для ингибирования экспрессии эндогенных генов использовали антисмысловые олигонуклеотиды, комплементарные к специфическим областям целевой мРНК. Когда антисмысловые олигонуклеотиды связываются с целевой мРНК, образуется гибрид ДНК-РНК. Это гибридное образование ингибирует трансляцию мРНК и, таким образом, экспрессию кодируемого белка. Если белок является необходимым для выживания клетки, ингибирование его экспрессии может привести к гибели клеток. Ввиду этого антисмысловые олигонуклеотиды могут быть полезными инструментами в противоопухолевых и противовирусных терапиях.

Основными препятствиями при использовании антисмысловых олигонуклеотидов для ингибирования экспрессии генов являются нестабильность клеток, низкий клеточный захват и слабая межклеточная доставка. Природные фосфодиэфиры неустойчивы к нуклеазному гидролизу; поэтому необходимы высокие концентрации антисмысловых олигонуклеотидов перед тем, как будет наблюдаться какой-либо ингибирующий эффект. Модифицированные аналоги фосфодиэфиров, такие как р-этокси, были сделаны для преодоления этой проблемы нуклеазного гидролиза, но они не обеспечили удовлетворительного решения данной проблемы.

Клеточный захват антисмысловых олигонуклеотидов является низким. Для решения этой проблемы, для увеличения клеточного захвата олигонуклеотидов использовались физические методы, такие как осаждение фосфатом кальция, участие ДЭАЭ-декстрана или электропорация. Эти методы трудно воспроизвести, и они неприменимы *in vivo*. Катионные липиды, такие как Липофектин, также были использованы для доставки олигонуклеотидов. Электростатическое взаимодействие образуется между катионными липидами и отрицательно заряженными олигонуклеотидами, что приводит к образованию комплекса, который затем поглощается целевыми клетками. Так как эти катионные липиды не защищают олигонуклеотиды от нуклеазного расщепления, являются вредными для клеточной мембраны, они являются пригодными только для доставки устойчивых к нуклеазе тиофосфатов, но не расщепляемых нуклеазой фосфодиэфиров.

Другой полученный модифицированный аналог фосфодиэфира (PD-phosphodiester), представляет собой р-этокси (рЭ) (pE-p-ethoxy) олигонуклеотиды. Модификации рЭ олигонуклеотидов создают на фосфатном остове таким образом, что модификация не будет мешать связыванию этих олигонуклеотидов с целевой мРНК. рЭ олигонуклеотиды получают с помощью добавления этильной группы к немостиковому атому кислорода фосфатного остова, что делает эти олигонуклеотиды незаряженными соединениями. Несмотря на свою устойчивость к нуклеазам, клеточный захват и внутриклеточная доставка рЭ олигонуклеотидов являются слабыми, поскольку после интернализации эти олигонуклеотиды остаются изолированными внутри эндосомальных/лизосомальных вакуолей, что препятствует их доступу к целевой мРНК.

Существует необходимость в улучшенных антисмысловых композициях для использования при лечении заболеваний, а также необходимость в способах получения таких улучшенных композиций.

### Сущность изобретения

В одном варианте реализации изобретения представлены композиции, содержащие популяцию олигонуклеотидов. В некоторых аспектах олигонуклеотиды популяции состоят из нуклеозидных молекул, соединенных между собой посредством фосфатных связей остова, причем по меньшей мере одна из фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде представляет собой р-этокси связь остова и причем не более 80% фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде являются р-этокси связями остова. В некоторых аспектах по меньшей мере одна из фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде представляет собой фосфодиэфирную связь остова. В некоторых аспектах от 10 до 80% фосфатных связей остова представляют собой р-этокси связи остова; от 20 до 80% фосфатных связей остова представляют собой р-этокси связи остова; от 30 до 80% фосфатных связей остова представляют собой р-этокси связи остова; от 40 до 80% фосфатных связей остова представляют собой р-этокси связи остова; от 50 до 80% фосфатных связей остова представляют собой р-этокси связи остова; или от 60 до 70% фосфатных связей остова представляют собой р-этокси связи остова или любой диапазон в пределах указанного. В некоторых аспектах от 20 до 90% фосфатных связей остова представляют собой фосфодиэфирные связи остова; от 20 до 80% фосфатных связей остова представляют собой фосфодиэфирные связи остова; от 20 до 70% фосфатных связей остова представляют собой фосфодиэфирные связи остова; от 20 до 60% фосфатных связей остова представляют собой фосфодиэфирные связи остова; от 20 до 50% фосфатных связей остова представляют собой фосфодиэфирные связи остова; или от 30 до 40% фосфатных связей остова пред-

ставляют собой фосфодиэфирные связи остова или любой диапазон в пределах указанного. В различных аспектах по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95%, или любое значение в этих пределах фосфатных связей остова представляют собой р-этокси связи остова. В различных аспектах не более 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% или любого значения в этих пределах фосфатных связей остова представляют собой фосфодиэфирные связи остова. В некоторых аспектах композиция является лиофилизированной.

В некоторых аспектах олигонуклеотиды популяции имеют размер в диапазоне от 7 до 30 нуклеотидов. В определенных аспектах олигонуклеотиды популяции имеют размер в диапазоне от 12 до 25 нуклеотидов. В различных аспектах олигонуклеотиды популяции имеют размер по меньшей мере из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов. Диапазон размеров может быть средним размером олигонуклеотидов в популяции.

В некоторых аспектах олигонуклеотиды популяции имеют средний размер из 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов, причем не более 5, 6, 7, 8, 8, 9, 10, 11, 11, 12, 13, 14, 15, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20, 21, 22, 23 или 24 соответственно фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде представляют собой р-этокси связь остова. В некоторых аспектах олигонуклеотиды популяции имеют средний размер из 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов и по меньшей мере 2, 2, 2, 3, 3, 3, 3, 4, 4, 4, 4, 5, 5, 5, 5, 5, 6, 6, 6 или 6 соответственно фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде представляют собой фосфодиэфирную связь остова.

В некоторых аспектах популяция олигонуклеотидов включает один вид олигонуклеотидов. В других аспектах популяция олигонуклеотидов включает по меньшей мере два вида олигонуклеотидов. Один вид олигонуклеотида может иметь одинаковую нуклеотидную последовательность, но либо иметь, либо не иметь р-этокси связи в различных местах внутри молекулы. В некоторых аспектах популяция олигонуклеотидов включает антисмысловые олигонуклеотиды, короткие интерферирующие РНК (siRNA), микроРНК (miRNA) или piwiРНК (пиРНК).

В определенных аспектах олигонуклеотиды популяции ингибируют экспрессию по меньшей мере одного онкогенного белка, белка инфекционного агента или собственного антигена. В некоторых аспектах олигонуклеотиды популяции гибридизуются по меньшей мере с одним онкогенным олигонуклеотидом, олигонуклеотидом инфекционного агента или олигонуклеотидом собственного антигена.

В различных аспектах композиция дополнительно содержит фосфолипиды. В некоторых аспектах фосфолипиды являются незаряженными или имеют нейтральный заряд при физиологическом рН. В некоторых аспектах фосфолипиды являются нейтральными фосфолипидами. В определенных аспектах нейтральные фосфолипиды представляют собой фосфатидилхолины. В определенных аспектах нейтральные фосфолипиды представляют собой диолеилфосфатидилхолин. В некоторых аспектах фосфолипиды практически не содержат холестерин.

В некоторых аспектах фосфолипиды и олигонуклеотиды присутствуют при молярном соотношении от около 5:1 до около 100:1 или любым соотношении в пределах указанного. В различных аспектах фосфолипиды и олигонуклеотиды присутствуют при молярном соотношении около 5:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90:1 95:1 или 100:1. В некоторых аспектах олигонуклеотиды и фосфолипиды образуют олигонуклеотид-липидный комплекс, такой как, например, липосомный комплекс. В некоторых аспектах по меньшей мере 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% липосом имеют диаметр менее 5 мкм. В различных аспектах композиция дополнительно содержит по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество, такое как, например, полисорбат 20. В некоторых аспектах по меньшей мере около 5% общего липосомального р-этокси антисмыслового лекарственного препарата состоит из поверхностно-активного вещества и по меньшей мере около 90% липосом имеют диаметр менее 5 мкм. В некоторых аспектах по меньшей мере около 15% общего липосомального р-этокси антисмыслового лекарственного препарата состоит из поверхностно-активного вещества и по меньшей мере около 90% липосом имеют диаметр менее 3 мкм. В некоторых аспектах популяция олигонуклеотидов инкорпорирована в популяцию липосом.

В одном аспекте каждый олигонуклеотид популяции содержит около 21 нуклеотида в длину и имеет около 30% фосфодиэфирных связей остова. В одном аспекте популяция олигонуклеотидов может быть дополнительно инкорпорирована в липосомальную композицию, содержащую по меньшей мере около 5% поверхностно-активного вещества, причем по меньшей мере около 90% указанных липосом имеют диаметр менее чем около 5 мкм.

В одном варианте реализации изобретения представлены фармацевтические композиции, содержащие композицию олигонуклеотидов и фосфолипидов по данному варианту реализации изобретения и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых аспектах композиция дополнительно содержит химиотерапевтический агент.

В одном варианте реализации изобретения представлены способы доставки терапевтически эффективного количества олигонуклеотида в клетку, включающие контактирование клетки с фармацевтической композицией по данному варианту реализации изобретения. В некоторых аспектах этот способ представляет собой способ лечения гиперплазии, рака, аутоиммунного заболевания

или инфекционного заболевания.

В одном варианте реализации изобретения представлены способы лечения субъекта, страдающего раковым заболеванием, аутоиммунным заболеванием или инфекционным заболеванием, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по данному варианту реализации изобретения. В некоторых аспектах субъектом является человек. В некоторых аспектах рак является раком мочевого пузыря, крови, поджелудочной железы, кости, костного мозга, мозга, молочных желез, толстой кишки, пищевода, желудка, головы и шеи, почки, печени, легких, простаты, кожи, яичка, языка, яичника или матки. В некоторых аспектах аутоиммунное заболевание представляет собой системную красную волчанку, синдром Шегрена, болезнь Крона, сахарный диабет, рассеянный склероз или ревматоидный артрит. В некоторых аспектах инфекционное заболевание представляет собой бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию, вирусную инфекцию или паразитарную инфекцию. В некоторых аспектах композицию вводят подкожно, внутривенно или внутривнутрибрюшинно. В некоторых аспектах способ дополнительно включает в себя применение к субъекту, по меньшей мере, второй противоопухолевой терапии. В некоторых аспектах вторая противоопухолевая терапия представляет собой хирургическую терапию, химиотерапию, лучевую терапию, криотерапию, гормональную терапию, иммунотерапию или цитокиновую терапию.

Олигонуклеотид включает молекулу антисмысловой нуклеиновой кислоты, которая специфично гибридизуется с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей целевой белок или регулирующей экспрессию целевого белка. "Специфическая гибридизация" означает, что молекула антисмысловой нуклеиновой кислоты гибридизуется с молекулой целевой нуклеиновой кислоты и регулирует ее экспрессию. Преимущественно "специфическая гибридизация" также означает, что никакие другие гены или транскрипты не являются задействованными. Олигонуклеотид может представлять собой одноцепочечную нуклеиновую кислоту и может содержать 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более нуклеиновых оснований. В отдельных аспектах олигонуклеотид может содержать от 15 до 30, от 19 до 25, от 20 до 23 или 21 непрерывных нуклеиновых оснований. В определенных вариантах реализации изобретения олигонуклеотид ингибирует трансляцию гена, который способствует росту раковой, или предраковой, или гиперпластической клетки млекопитающих (например, человеческой клетки). Олигонуклеотид может индуцировать в клетке апоптоз и/или ингибировать трансляцию онкогена или другого целевого гена. В определенных вариантах реализации изобретения олигонуклеотидный компонент включает один вид олигонуклеотида. В других вариантах реализации изобретения олигонуклеотидный компонент содержит 2, 3, 4 или более видов олигонуклеотида, которые нацелены на 1, 2, 3, 4 или более генов. Композиция может дополнительно содержать химиотерапевтический агент или другое противоопухолевое средство, которое может быть инкорпорировано или не инкорпорировано в липидный компонент или липосому по данному изобретению. В дополнительных вариантах реализации изобретения олигонуклеотидный компонент инкорпорирован в липосому или липидный компонент.

"Задерживать", "инкапсулировать" и "включать" относятся к липиду или липосоме, образующим препятствие для свободной диффузии в растворе путем ассоциации с интересующим агентом или вокруг него, например, липосома может инкапсулировать агент в липидный слой или внутри водного компартамента внутри, или между липидными слоями. В определенных вариантах реализации изобретения композиция содержится в фармацевтически приемлемом носителе. Фармацевтически приемлемый носитель может быть составлен для введения человеку или пациенту.

В определенных вариантах реализации изобретения липидный компонент имеет практически нейтральный заряд, потому что он содержит нейтральный фосфолипид, или суммарный нейтральный заряд. В определенных аспектах нейтральным фосфолипидом может быть фосфатидилхолин, такой как ДОФХ, яичный фосфатидилхолин ("ЯФХ"), дилаурилоилфосфатидилхолин ("ДЛФХ"), димиристоилфосфатидилхолин ("ДМФХ"), дипальмитоилфосфатидилхолин ("ДПФХ"), дистеароилфосфатидилхолин ("ДСФХ"), 1-миристоил-2-пальмитоилфосфатидилхолин ("МПФХ"), 1-пальмитоил-2-миристоилфосфатидилхолин ("ПМФХ"), 1-пальмитоил-2-стеароилфосфатидилхолин ("ПСФХ"), 1-стеароил-2-пальмитоилфосфатидилхолин ("СПФХ"), димиристилфосфатидилхолин ("ДМФХ"), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин ("DAPC"), 1,2-диарахидоил-sn-глицеро-3-фосфохолин ("DVPC"), 1,2-диэйкозеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин ("DEPC), пальмитоилолеоилфосфатидилхолин ("ПОФХ"), лизофосфатидилхолин или дилинолоилфосфатидилхолин. В других аспектах нейтральным фосфолипидом может быть фосфатидилэтаноламин, такой как диолеоилфосфатидилэтаноламин ("ДОФЭ"), дистеароилфосфатидилэтаноламин ("ДСФЭ"), димиристоилфосфатидилэтаноламин ("ДМФЭ"), дипальмитоилфосфатидилэтаноламин ("ДПФЭ"), пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламин ("ПОФЭ") или лизофосфатидилэтаноламин. В определенных вариантах реализации изобретения фосфолипидный компонент может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более видов или типов нейтрального фосфолипида. В других вариантах реализации изобретения фосфолипидный компонент может содержать 2, 3, 4, 5, 6 или более видов или типов нейтральных фосфолипидов.

В определенных вариантах реализации изобретения липидный компонент может иметь практически нейтральный заряд, поскольку он содержит положительно заряженный липид и отрицательно заряженный липид. Липидный компонент может дополнительно содержать нейтрально заряженный(е) липид(ы)

или фосфолипид(ы). Позитивно заряженный липид может представлять собой положительно заряженный фосфолипид. Отрицательно заряженный липид может представлять собой отрицательно заряженный фосфолипид. Отрицательно заряженный фосфолипид может представлять собой фосфатидилсерин, такой как димиристоилфосфатидилсерин ("ДМФС"), дипальмитоилфосфатидилсерин ("ДПФС") или фосфатидилсерин из мозга ("ФСМ"). Отрицательно заряженный фосфолипид может представлять собой фосфатидилглицерин, такой как дилаурилоилфосфатидилглицерин ("ДЛФГ"), димиристоилфосфатидилглицерин ("ДМФГ"), дипальмитоилфосфатидилглицерин ("ДПФГ"), дистеароилфосфатидилглицерин ("ДСФГ") или диолеоилфосфатидилглицерин ("ДОФГ"). В определенных вариантах реализации изобретения композиция дополнительно содержит холестерин или полиэтиленгликоль (ПЭГ). В других вариантах реализации изобретения композиция практически не содержит холестерин. В определенных вариантах реализации изобретения фосфолипид представляет собой фосфолипид, встречающийся в природе. В других вариантах реализации изобретения фосфолипид представляет собой синтетический фосфолипид.

Липосомы могут быть изготовлены из одного или более фосфолипидов, при условии, что липидный материал является практически незаряженным. Важно, чтобы композиция была практически свободной от анионных и катионных фосфолипидов и холестерина. Подходящие фосфолипиды включают фосфатидилхолины и другие, которые хорошо известны специалистам в данной области техники.

Другой аспект данного изобретения включает способы доставки олигонуклеотида в клетку, включая контактирование клетки с нейтральной липидной композицией по данному изобретению. Способы предоставляют композицию изобретения в эффективном количестве. Эффективное количество представляет собой количество терапевтического компонента, который ослабляет, замедляет, уменьшает или устраняет клетки, патологическое состояние или болезненное состояние у субъекта. Клетка может содержаться у субъекта или пациента, такого как человек. Способ может дополнительно содержать способ лечения рака или другого гиперпластического состояния. Рак может возникнуть в мочевом пузыре, крови, кости, костном мозге, мозге, молочных железах, толстой кишке, пищеводе, желудочно-кишечном тракте, десне, голове, почках, печени, легких, носоглотке, шее, предстательной железе, коже, желудке, яичке, языке или матке. В определенных вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает способ лечения доброкачественного заболевания или гиперпластического состояния. Клетка может быть предраковой или раковой клеткой. В определенных вариантах реализации изобретения композиции и способы ингибируют рост клетки, индуцируют апоптоз клетки и/или ингибируют трансляцию онкогена. Олигонуклеотид может ингибировать трансляцию гена, который сверхэкспрессируется в раковой клетке.

В определенных вариантах реализации изобретения способы по данному изобретению дополнительно включают применение дополнительной терапии субъекту. Дополнительная терапия может включать введение химиотерапевтического агента (например, паклитаксела или доцетаксела), операцию, лучевую терапию и/или генную терапию. В определенных аспектах химиотерапия представляет собой доцетаксел, паклитаксел, цисплатин (CDDP), карбоплатин, прокарбазин, мехлорэтамин, циклофосфамид, камптотecin, ифосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфид, нитрозомочевину, дактиномицин, даунорубин, доксорубин, блеомицин, пликомицин, митомицин, этопозид (VP16), тамоксифен, ралоксифен, агенты, связывающие рецепторы эстрогена, таксол, гемцитабин, навельбин, ингибиторы фарнезилтрансферазы, трансплатин, 5-фторурацил, винкристин, винбластин, метотрексат или их комбинации. В определенных вариантах реализации изобретения химиотерапией является таксан, такой как доцетаксал или паклитаксел. Химиотерапия может доставляться до, во время, после или в их сочетании относительно нейтральной липидной композиции по данному изобретению. Химиотерапия может быть предоставлена в пределах 0, 1, 5, 10, 12, 20, 24, 30, 48 или 72 ч или более продолжительного времени относительно нейтральной липидной композиции. Нейтральная липидная композиция, вторая противоопухолевая терапия или как нейтральная липидная композиция, так и противоопухолевая терапия могут вводиться внутрь опухоли, внутривенно, внутривентриально, подкожно, перорально или различными комбинациями данных введений.

Предполагается, что любой вариант реализации изобретения, описанный в этом описании, может быть реализован применительно к любому способу или композиции по данному изобретению и наоборот. Кроме того, композиции по данному изобретению могут быть использованы для осуществления способов изобретения.

Как используется в данном документе, "практически не содержит" в терминах определенного компонента используется в данном документе для обозначения того, что ни один из указанных компонентов не был целенаправленно составлен в композиции и/или присутствует только в качестве загрязнителя или в следовых количествах. Таким образом, общее количество указанного компонента, возникающее в результате какого-либо непреднамеренного загрязнения композиции, составляет значительно меньше 0,05%, предпочтительно меньше 0,01%. Наиболее предпочтительной является композиция, в которой никакое количество указанного компонента не может быть обнаружено стандартными аналитическими способами.

Используемые в данном документе слова в единственном числе могут означать одно или более одного. Как используется в данном документе в формуле изобретения, слова в единственном числе при применении в сочетании с термином "содержащий" могут означать один или более одного.

Применение термина "или" в формуле изобретения используется для обозначения "и/или", если явно не указано обозначение только альтернативы или альтернативы не являются взаимоисключающими, хотя описание поддерживает определение, которое относится только к альтернативам и "и/или". Используемый в данном документе термин "другой" может обозначать, по меньшей мере, второй или более.

В данном изобретении термин "около" используется для обозначения того, что значение включает в себя неизбежное отклонение ошибки устройства, способа, используемого для определения значения, или вариацию, существующую среди субъектов исследования.

Другие объекты, особенности и преимущества данного изобретения станут очевидными из следующего подробного описания. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, раскрывающие предпочтительные варианты реализации данного изобретения, приведены только в иллюстративных целях, поскольку различные изменения и модификации сущности и объема изобретения станут очевидными специалистам в данной области техники из этого подробного описания.

#### **Описание иллюстративных вариантов реализации изобретения**

Данное изобретение представляет композиции и способы доставки олигонуклеотида (например, ингибитора экспрессии гена) в клетку посредством липидной композиции, в определенных аспектах липидная композиция имеет суммарный заряд около нуля, то есть нейтральной липидной композиции. В определенных вариантах реализации изобретения липидная композиция представляет собой незаряженную липосому. Эти способы могут быть эффективно использованы для лечения рака.

##### **I. Липиды и липосомы.**

"Липосомы" используются в данном документе для обозначения липидсодержащих везикул, имеющих липидный бислой, а также других частиц липидного носителя, которые могут захватывать или инкорпорировать антисмысловые олигонуклеотиды. Таким образом, липосома является общим термином, охватывающим различные однослойные, многослойные и мультивезикулярные липидные наполнители, сформированные путем образования закрытых липидных бислоев или агрегатов. Кроме того, липосомы могут иметь неопределенную ламеллярную структуру. Липосомы могут быть охарактеризованы как имеющие везикулярные структуры с мембраной из фосфолипидного бислоя и внутренней водной средой.

Многослойные липосомы имеют несколько липидных слоев, разделенных водной средой. Они образуются спонтанно, когда фосфолипиды суспендируются в избытке водного раствора. Липидные компоненты проходят самоперестраивание перед образованием закрытых структур и захватывают воду и растворенные вещества между липидными бислоями (Ghosh и Vachhawat, 1991 год). Однако данное изобретение также охватывает композиции, которые имеют структуры в растворе, отличающиеся от нормальной везикулярной структуры. Например, липиды могут принимать мицеллярную структуру или просто существовать как неоднородные агрегаты молекул липидов.

Липосомы представляют собой вариант наночастиц, которые являются носителями для доставки различных лекарств в пораженную болезнью ткань. Оптимальный размер липосомы зависит от целевой ткани. В опухолевой ткани сосудистая сеть имеет разрывы, и размеры пор варьируются от 100 до 780 нм (Siwak и соавт., 2002 год). Для сравнения, размер пор в нормальном сосудистом эндотелии составляет <2 нм в большинстве тканей и 6 нм в посткапиллярных венулах. Считается, что отрицательно заряженные липосомы быстрее удаляются из кровообращения, чем нейтральные или положительно заряженные липосомы; однако недавние исследования показали, что тип отрицательно заряженного липида влияет на скорость поглощения липосом ретикуло-эндотелиальной системой (РЭС). Например, липосомы, содержащие отрицательно заряженные липиды, которые не являются стерически защищенными (фосфатидилсерин, фосфатидная кислота и фосфатидилглицерин), очищаются быстрее, чем нейтральные липосомы. Интересно, что катионные липосомы (1,2-диолеил-3-триметиламмоний-пропан [ДОТАП]) и комплексы катионная липосома-ДНК более охотно связываются и поглощаются эндотелиальными клетками ангиогенных кровеносных сосудов через эндоцитоз, чем анионные, нейтральные или стерически стабилизированные нейтральные липосомы (Thurston и соавт., 1998 год; Krasnici и соавт., 2003 год). Катионные липосомы не могут быть идеальными средствами доставки для опухолевых клеток из-за того, что поверхностные взаимодействия с опухолевыми клетками создают электростатически обусловленный барьерный эффект сайта связывания, ингибируя дальнейшее объединение систем доставки с опухолевыми сфероидными (Kostarelou и соавт., 2004 год). Тем не менее, нейтральные липосомы, как оказалось, обладают лучшим проникновением внутрь опухоли. Также вызывала беспокойство токсичность, связанная со специфическими липосомальными препаратами. Катионные липосомы вызывают дозозависимую токсичность и воспаление легких, способствуя высвобождению активных производных кислорода, и этот эффект является более выраженным при использовании поливалентных катионных липосом, чем одновалентных катионных липосом, таких как ДОТАП (Dokka и соавт., 2000 год). Нейтральные и отрицательно заряженные липосомы, как оказалось, не показали легочной токсичности (Guitierrez-Puente и соавт., 1999 год). Катионные липосомы при эффективном поглощении нуклеиновых кислот имели ограниченный успех при супрессии гена *in vivo*, возможно, в связи с их стабильной внутриклеточной природой и проистекающей из этого неспособностью высвободить содержимую нуклеиновую кислоту. Липиды с нейтральным зарядом или липидные композиции с нейтрализованным зарядом, например, 1,2-диолеил-

sn-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ), используются в данном документе из-за нейтральных свойств и положительных результатов при доставке антисмысловых олигонуклеотидов *in vivo*.

Данное изобретение представляет способы и композиции для связывания олигонуклеотида, такого как антисмысловый олигонуклеотид, с липидом и/или липосомой. Олигонуклеотид может быть инкорпорирован в водную внутреннюю часть липосомы, вкрапленным внутри липидного бислоя липосомы, прикрепленным к липосоме через связующую молекулу, которая связана как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, захваченным в липосому, образовывать комплекс с липосомой, диспергированный в растворе, содержащем липид, смешанный с липидом, объединенный с липидом, содержащийся в виде суспензии в липиде, содержащийся или образующий комплекс с мицеллой или иным образом связанный с липидом. Липосомальные или липосома/олигонуклеотид-связанные композиции, представленные в данном документе, не ограничиваются какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, они могут находиться в виде двухслойной структуры, в виде мицелл или с "разрушенной" структурой. Они также могут быть просто вкраплены в раствор, возможно, образуя агрегаты, которые являются не однородными по размеру или форме.

#### А. Липиды.

Липиды представляют собой жирные вещества, которые могут быть синтетическими или встречающимися в природе. Например, липиды включают жирные капли, которые встречаются в природе в цитоплазме, а также класс соединений, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, которые содержат алифатические углеводороды с длинной цепью и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминокислоты и альдегиды. Примером может служить липид 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ).

Липидные композиции по данному изобретению могут содержать фосфолипиды. В определенных вариантах реализации изобретения один вид или тип фосфолипидов может быть использован при создании липидных композиций, таких как липосомы. В других вариантах реализации изобретения может использоваться более одного вида или типа фосфолипидов.

Фосфолипиды включают глицерофосфолипиды и определенные сфинголипиды. Фосфолипиды включают, но не ограничиваются ими, диолеилфосфатидилхолин ("ДОФХ"), яичный фосфатидилхолин ("ЯФХ"), дилаурилоилфосфатидилхолин ("ДЛФХ"), димиристоилфосфатидилхолин ("ДМФХ"), дипальмитоилфосфатидилхолин ("ДПФХ"), дистеароилфосфатидилхолин ("ДСФХ"), 1-миристоил-2-пальмитоилфосфатидилхолин ("МПФХ"), 1-пальмитоил-2-миристоилфосфатидилхолин ("ПМФХ"), 1-пальмитоил-2-стеароилфосфатидилхолин ("ПСФХ"), 1-стеароил-2-пальмитоилфосфатидилхолин ("СПФХ"), дилаурилоилфосфатидилглицерин ("ДЛФГ"), димиристоилфосфатидилглицерин ("ДМФГ"), дипальмитоилфосфатидилглицерин ("ДПФГ"), дистеароилфосфатидилглицерин ("ДСФГ"), дистеароил сфингомиелин ("DSSP - distearoyl sphingomyelin"), дистеароилфосфатидилэтаноламин ("ДСФЭ"), диолеилфосфатидилглицерин ("ДОФГ"), димиристоилфосфатидная кислота ("ДМФК"), дипальмитоилфосфатидная кислота ("ДПФК"), димиристоилфосфатидилэтаноламин ("ДМФЭ"), дипальмитоилфосфатидилэтаноламин ("ДПФЭ"), димиристоилфосфатидилсерин ("ДМФС"), дипальмитоилфосфатидилсерин ("ДПФС"), фосфатидилсерин из мозга ("ФСМ"), сфингомиелин из мозга ("BSP - brain sphingomyelin"), дипальмитоил сфингомиелин ("DPSP - dipalmitoyl sphingomyelin"), димиристилфосфатидилхолин ("ДМФХ"), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин ("DAPC"), 1,2-диарахидоил-sn-глицеро-3-фосфохолин ("DBPC"), 1,2-диэйкозеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин ("DEPC"), диолеилфосфатидилэтаноламин ("ДОФЭ"), пальмитоилолеилфосфатидилхолин ("ПОФХ"), пальмитоилолеилфосфатидилэтаноламин ("ПОФЭ"), лизофосфатидилхолин, лизофосфатидилэтаноламин и дилинолеилфосфатидилхолин.

Фосфолипиды включают, например, фосфатидилхолины, фосфатидилглицерины и фосфатидилэтанолламины; в связи с тем, что фосфатидилэтанолламины и фосфатидилхолины в физиологических условиях являются незаряженными (то есть, при pH около 7), эти соединения могут быть особенно полезны для создания нейтральных липосом. В определенных вариантах реализации изобретения фосфолипид ДОФХ используют для создания незаряженных липосом или липидных композиций. В определенных вариантах реализации изобретения также может быть использован липид, который не является фосфолипидом (например, холестерин).

Фосфолипиды могут происходить из природных или синтетических источников. Однако фосфолипиды из природных источников, такие как яичный или соевый фосфатидилхолин, фосфатидная кислота мозга, фосфатидилинозитол мозга или растений, сердечный кардиолипид и растительный или бактериальный фосфатидилэтаноламин, не используются в определенных вариантах реализации изобретения в качестве первичного фосфатида (то есть составляющего 50% или более от общей фосфатидной композиции), поскольку это может привести к нестабильности и проницаемости полученных липосом.

#### В. Нейтральные липосомы.

"Нейтральные липосомы или липидная композиция" или "незаряженные липосомы или липидная композиция", как используется в данном документе, определяются как липосомы или липидные композиции, содержащие один или более липидов, которые дают практически нейтральный суммарный заряд (по существу незаряженные). В определенных вариантах реализации изобретения нейтральные липосомы или липидные композиции могут включать в основном липиды и/или фосфолипиды, которые сами по

себе являются нейтральными. В определенных вариантах реализации изобретения амфипатические липиды могут быть включены или использованы для создания нейтральных липосом или липидных композиций. Например, нейтральная липосома может быть создана путем комбинирования положительно и отрицательно заряженных липидов, так что эти заряды практически компенсируют друг друга, тем самым давая практически нейтральный суммарный заряд. Под "практически нейтральный" или "практически незаряженный" подразумевается, что немногие, если таковые имеются, липиды в данной популяции (например, популяции липосом) включают заряд, который не компенсируется противоположным зарядом другого компонента (например, менее 10% компонентов включают не компенсированный заряд, более предпочтительно менее 5% и наиболее предпочтительно менее 1%). В определенных вариантах реализации данного изобретения может быть приготовлена композиция, в которой липидный компонент композиции является практически нейтральным, но не находится в форме липосом.

Размер липосом варьирует в зависимости от способа синтеза. Липосома, суспендированная в водном растворе, обычно имеет форму сферической везикулы и может иметь один или более концентрических слоев молекул липидного бислоя. Каждый слой состоит из параллельного расположения молекул, представленных формулой XY, причем X представляет собой гидрофильный фрагмент, а Y представляет собой гидрофобный фрагмент. В водной суспензии концентрические слои расположены таким образом, что гидрофильные фрагменты имеют тенденцию оставаться в контакте с водной фазой, а гидрофобные области склонны к самоассоциации. Например, когда водные фазы присутствуют как внутри липосомы, так и вне нее, молекулы липидов могут образовывать бислой, известный как ламелла, с расположением XY-YX. Агрегаты липидов могут образовываться, когда гидрофильные и гидрофобные части более чем одной липидной молекулы становятся ассоциированными друг с другом. Размер и форма этих агрегатов будут зависеть от множества различных переменных, таких как природа растворителя и присутствие других соединений в растворе.

Липосомы в рамках данного изобретения могут быть получены в соответствии с известными лабораторными методами, такими как, например, способ Bangham и соавт. (1965 год), содержание которого включено в данный документ путем ссылки; способ Gregoriadis (1979 год), содержание которого включено в данный документ путем ссылки; способ Deamer и Uster (1983 год), содержание которого включено в данный документ путем ссылки; и способ обращенно-фазового выпаривания, как описано Szoka и Parahadjopoulos (1978 год). Вышеупомянутые способы различаются по их соответствующим способностям захватывать водный материал и их соответствующими соотношениями "водное пространство-липид".

В определенных вариантах реализации изобретения нейтральная липосома может быть использована для доставки олигонуклеотида, такого как антисмысловой олигонуклеотид. Нейтральная липосома может содержать один вид олигонуклеотида, направленный на подавление трансляции одного гена, или нейтральная липосома может содержать несколько видов олигонуклеотидов, которые направлены на подавление трансляции нескольких генов. Кроме того, нейтральная липосома может также содержать химиотерапевтическое соединение в дополнение к олигонуклеотиду; таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения химиотерапевтическое соединение и олигонуклеотид могут быть доставлены в клетку (например, опухолевую клетку человека) в одной и той же или отдельных композициях.

Высушенные липиды или лиофилизированные липосомы могут быть дегидратированы и повторно растворены в соответствующей концентрации с подходящим растворителем (например, ДФСБ (фосфатно-солевой буфер Дюльбекко) или буфер Hepes). Затем смесь можно энергично встряхивать в вортекс-миксере. Липосомы могут быть ресуспендированы при соответствующей общей концентрации фосфолипидов (например, около 10-200 мМ). Неинкапсулированный олигонуклеотид может быть удален центрифугированием при 29000 g и промыванием липосомального осадка. Альтернативно неинкапсулированные олигонуклеотиды могут быть удалены путем диализа на фоне избытка растворителя. Количество инкапсулированного олигонуклеотида может быть определено в соответствии со стандартными способами.

## II. Ингибирование экспрессии гена.

Ингибирующий олигонуклеотид может ингибировать транскрипцию или трансляцию гена в клетке. Олигонуклеотид может иметь от 5 до 50 или более нуклеотидов в длину, а в некоторых вариантах реализации изобретения от 7 до 30 нуклеотидов в длину. В определенных вариантах реализации изобретения олигонуклеотид может быть 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов длиной. Олигонуклеотид может содержать нуклеиновую кислоту и/или аналог нуклеиновой кислоты. Как правило, ингибирующий олигонуклеотид будет ингибировать трансляцию одного гена внутри клетки; однако в некоторых вариантах реализации изобретения ингибирующий олигонуклеотид может ингибировать трансляцию более одного гена внутри клетки.

В пределах олигонуклеотида компоненты олигонуклеотида необязательно должны быть одного и того же типа или гомогенными (например, олигонуклеотид может содержать нуклеотид и нуклеиновую кислоту, или аналог нуклеотида). В определенных вариантах реализации данного изобретения олигонуклеотид может содержать только одну нуклеиновую кислоту или аналог нуклеиновой кислоты. Ингибирующий олигонуклеотид может содержать 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 или более непрерывных нуклеиновых оснований, включая все диапазоны между ними, которые гибридизуются с комплементарной нуклеиновой кислотой с образованием двухцепочечной структуры.

### III. Нуклеиновые кислоты.

В данном изобретении предложены способы и композиции для доставки олигонуклеотида через нейтральные липосомы. Поскольку олигонуклеотид состоит из нуклеиновой кислоты, способы, относящиеся к нуклеиновым кислотам (например, продуцирование нуклеиновой кислоты, модификация нуклеиновой кислоты и тому подобное), также могут быть использованы в отношении олигонуклеотида.

Термин "нуклеиновая кислота" хорошо известен в данной области техники. В данном контексте "нуклеиновая кислота" обычно относится к молекуле (то есть, цепи) ДНК, РНК или их производному или аналогу, содержащему нуклеиновое основание. Эти определения относятся к одноцепочечной или двухцепочечной нуклеиновой кислоте. Двухцепочечные нуклеиновые кислоты могут быть образованы путем полного комплементарного связывания; однако в некоторых вариантах реализации изобретения двухцепочечная нуклеиновая кислота может быть образована путем частичного или существенного комплементарного связывания. В данном документе одноцепочечная нуклеиновая кислота может быть обозначена префиксом "оц" и двухцепочечной нуклеиновой кислотой префиксом "дц".

#### A. Нуклеиновые основания.

В данном контексте термин "нуклеотидная основа" относится к гетероциклическому основанию, такому как, например, нуклеиновое основание естественного происхождения (то есть, А, Т, G, С или U), найденное по меньшей мере в одной нуклеиновой кислоте естественного происхождения (то есть, ДНК и РНК), и производному (производным) естественного или неестественного происхождения и аналогам такого нуклеинового основания. Нуклеиновое основание обычно может образовывать одну или более водородных связей (то есть "соединяться комплементарно" или "гибридизоваться") по меньшей мере с одним нуклеиновым основанием естественного происхождения таким способом, который может замечать спаривание нуклеотидов, встречающееся в природе (например, образование водородной связи между А и Т, G и С, и А и U). Нуклеиновое основание может быть инкорпорировано в нуклеозид или нуклеотид с применением любого способа химического или природного синтеза, описанного в данном документе или известного специалисту в данной области техники.

"Пуриновое" и/или "пиримидиновое" нуклеиновое основание (основания) охватывает пуриновые и/или пиримидиновые нуклеиновые основания естественного происхождения, а также их производное(ые) и аналог(и), включая, но без ограничений, пурин или пиримидин, замещенный одним или более фрагментом алкила, карбоксиалкила, amino, гидроксила, галогена (то есть фтора, хлора, брома или йода), тиола или алкилтиола. Предпочтительные фрагменты алкила (например, алкил, карбоксиалкил и тому подобное) включают от около 1, около 2, около 3, около 4, около 5 до около 6 атомов углерода. Другие неограничивающие примеры пурина или пиримидина включают дезапурин, 2,6-диаминопурин, 5-фторурацил, ксантин, гипоксантин, 8-бромгуанин, 8-хлорогуанин, бромтилин, 8-аминогуанин, 8-гидроксигуанин, 8-метилгуанин, 8-тиогуанин, азагуанин, 2-аминопурин, 5-этилцитозин, 5-метилцитозин, 5-бромурацил, 5-этилурацил, 5-йодурацил, 5-хлораурацил, 5-пропилаурацил, тиоурацил, 2-метиладенин, метилтиоаденин, N,N-диэтиладенин, азаденины, 8-бромoadенин, 8-гидроксиаденин, 6-гидроксиаминопурин, 6-тиопурин, 4-(6-аминогексил/цитозин) и тому подобное. Производные или аналоги пурина и пиримидина включают, но без ограничений (аббревиатура/описание модифицированного основания) ас4с/4-ацетилцитидин, Мам5s2u/5-метоксиминометил-2-тиоурин, Сhm5u/5-(карбоксигидроксиметил) уридин, Man q/Бета, D-маннозилгуозин, Cm/2'-O-метилцитидин, Мсm5s2u/5-метоксикарбонилметил-2-тиоурин, Сmm5s2u/5-карбоксиметиламино-метил-2-тиоурин, Мсm5u/5-метоксикарбонилметилуридин, Сmm5u/5-карбоксиметиламинометилуридин, Мо5u/5-метоксиуридин, D/Дигидроуридин, Ms2i6a, 2-метилтио-N6-изопентениладенозин, Fm/2'-O-метилпсевдоуридин, Ms2t6a/N-((9-бета-D-рибофуранозил-2-метилтиопурин-6-ил)карбамоил)треонин, Gal q/Бета, D-галактозилквеозин, Mt6a/N-((9-бета-D-рибофуранозилпурин-6-ил)N-метилкарбамоил)треонин, Gm/2'-O-метилгуанозин, Mv/Уридин-5-метилэфир оксиуксусной кислоты, I/Инозин, о5u/Уридин-5-оксиуксусная кислота (v), I6a/N6-изопентениладенозин, Osyw/Вибутоксозин, m1a/1-метиладенозин, P/Псевдоуридин, m1f/1-метилпсевдоуридин, Q/Квеозин, m1g/1-метилгуанозин, s2c/2-тиоцитидин, m1l/1-метилюридин, s2t/5-метил-2-тиоурин, m22g/2,2-диметилгуанозин, s2u/2-тиоурин, m2a/2-метиладенозин, s4u/4-тиоурин, m2g/2-метилгуанозин, T/5-метилуридин, m3c/3-метилцитидин, t6a/N-((Э-бета-D-рибофуранозилпурин-6-ил)карбамоил)треонин, m5c/5-метилцитидин, Tm/2'-O-метил-5-метилуридин, m6a/N6-метиладенозин, Um/2'-O-метилуридин, m7g/7-метилгуанозин, Yw/Вибутоксозин, Mam5u/5-метиламинометилуридин или X/3-(3-амино-3-карбоксыпропил)уридин, (аср3)u.

#### B. Нуклеозиды.

В данном контексте термин "нуклеозид" относится к отдельной химической единице, содержащей нуклеиновое основание, ковалентно связанное с линкерным фрагментом нуклеинового основания. Неограничивающим примером "линкерного фрагмента нуклеинового основания" является сахар, содержащий 5 атомов углерода (то есть, "5-углеродный сахар"), включая, но без ограничений, дезоксирибозу, рибозу, арабинозу или производное или аналог 5-углеродного сахара. Неограничивающие примеры производного или аналога 5-углеродного сахара включают 2'-фтор-2'-деоксирибозу или карбоциклический сахар, где углерод замещен атомом кислорода в сахарном кольце. Используемый в данном контексте термин "фрагмент" обычно относится к меньшему химическому или молекулярному компоненту большей хими-

ческой или молекулярной структуры.

В данной области техники известны различные типы ковалентного присоединения(ий) нуклеинового основания с линкерным фрагментом нуклеинового основания. В качестве неограничивающего примера, нуклеозид, содержащий пурин (то есть, А или G) или 7-дезапуриновое нуклеиновое основание, обычно содержит ковалентное присоединение 9-го положения пурина или 7-дезапурина к 1'-положению 5-углеродного сахара. В другом неограничивающем примере нуклеозид, содержащий пиримидиновое нуклеиновое основание (то есть С, Т, или U), обычно содержит ковалентное присоединение 1-го положения пиримидина к 1'-положению 5-углеродного сахара (Kornberg и Baker, 1992 год).

#### С. Нуклеотиды.

В данном контексте термин "нуклеотид" относится к нуклеозиду, дополнительно содержащему "связь остова". Связь остова обычно ковалентно присоединяет нуклеотид к другой молекуле, содержащей нуклеотид, или к другому нуклеотиду с образованием нуклеиновой кислоты. "Связь остова" в нуклеотидах естественного происхождения обычно содержит фосфатный фрагмент (например, фосфодиэфирную связь остова), который ковалентно присоединен к 5-углеродному сахару. Присоединение фрагмента остова обычно происходит в 3'- или 5'-положении 5-углеродного сахара. Однако в данной области техники известны другие типы соединений, в частности, когда нуклеотид содержит производные или аналоги 5-углеродного сахара или фосфатного фрагмента естественного происхождения.

#### Д. Аналоги нуклеиновых кислот.

Нуклеиновая кислота может содержать или полностью состоять из производного или аналога нуклеинового основания, линкерного фрагмента нуклеинового основания и/или связи остова, которая может присутствовать в нуклеиновой кислоте естественного происхождения. Используемый в данном контексте термин "производное" относится к химически модифицированной или измененной форме молекулы естественного происхождения, тогда как термины "миметик" или "аналог" относятся к молекуле, которая может структурно напоминать или может структурно не напоминать молекулу естественного происхождения или фрагмент, но обладает подобными функциями. Нуклеиновое основание, нуклеозид и нуклеотидные аналоги или производные хорошо известны в данной области техники.

Неограничивающие примеры нуклеозидов, нуклеотидов или нуклеиновых кислот, содержащих 5-углеродный сахар и/или производные или аналоги связи остова, включают те, которые приведены в патенте США № 5681947, который описывает олигонуклеотиды, содержащие производные пурина, которые образуют тройные спирали и/или предотвращают экспрессию дцДНК; патентах США № 5652099 и 5763167, которые описывают нуклеиновые кислоты, содержащие флуоресцентные аналоги нуклеозидов, обнаруженные в ДНК или РНК, в частности для применения в качестве флуоресцентных зондов нуклеиновых кислот; патенте США № 5614617, который описывает олигонуклеотидные аналоги с заменами на пиримидиновых кольцах, которые обладают повышенной устойчивостью к нуклеазам; патентах США № 5670663, 5872232 и 5859221, которые описывают олигонуклеотидные аналоги с модифицированными 5-углеродными сахарами (то есть модифицированными 2'-дезоксифуранозильными фрагментами), применяемыми для выявления нуклеиновых кислот; патенте США № 5446137, который описывает олигонуклеотиды, содержащие по меньшей мере один 5-углеродный фрагмент сахара, замещенный в положении 4' заместителем, отличным от водорода, который может быть применен в анализах гибридизации; патенте США № 5886165, который описывает олигонуклеотиды как с дезоксирибонуклеотидами с 3'-5' связями остова так и с рибонуклеотидами с 2'-5' связями остова; патенте США № 5714606, который описывает модифицированную связь остова, в которой кислород 3'-положения связи остова заменен на углерод с целью повышения устойчивости нуклеиновых кислот к нуклеазе; патенте США № 5612691, который описывает олигонуклеотиды, содержащие одну или более 5' метиленфосфонатных связей остова, которые усиливают устойчивость к нуклеазам; патентах США № 5466786 и 5792847, которые описывают связь замещающего фрагмента, который может содержать лекарственное средство или метку к 2' углероду олигонуклеотида для обеспечения улучшенной устойчивости к нуклеазе и способности доставлять лекарственные средства или фрагменты выявления; патенте США № 5223618, который описывает олигонуклеотидные аналоги с 2 или 3 углеродными связями остова, прикрепляющимися к положению 4' и положению 3' соседнего 5-углеродного сахарного фрагмента для усиления клеточного захвата, устойчивости к нуклеазам и гибридизации с целевой РНК; патенте США № 5470967, который описывает олигонуклеотиды, содержащие по меньшей мере одну сульфаматную или сульфамидную связь остова, которые полезны в качестве зондов для гибридизации нуклеиновых кислот; патентах США № 5378825, 5777092, 5623070, 5610289 и 5602240, которые описывают олигонуклеотиды со связью фрагмента остова с тремя или четырьмя атомами, замещающей фосфодиэфирную связь остова, используемую для улучшения устойчивости к нуклеазе, клеточного захвата и регуляции экспрессии РНК; патенте США № 5858988, который описывает гидрофобное транспортное вещество, присоединенное к положению 2'-О олигонуклеотидов, для повышения их мембранной проницаемости и стабильности; патенте США № 5214136, который описывает олигонуклеотиды, конъюгированные с антрахиноном на 5'-конце, которые обладают повышенной гибридизацией с ДНК или РНК; повышенной устойчивостью к нуклеазам; патенте США № 5700922, который описывает химеры ПНК-ДНК-ПНК (ПНК - пептидная нуклеиновая кислота), в которых ДНК содержит 2'-дезоксизитропентафаранозинные нуклеотиды для повышения устой-

чивости к нуклеазе, аффинности связывания и способности активировать РНКазу H; патенте США № 5708154, который описывает РНК, связанную с ДНК, с образованием гибрида ДНК-РНК; патенте США № 5908845, который описывает полиэфирные нуклеиновые кислоты, в которых одно или более нуклеиновые основания связаны с хиральными атомами углерода в полиэфирном остове; патентах США № 5786461, 5891625, 5786461, 5773571, 5766855, 5736336, 5719262, 5714331, 5539082 и WO 92/20702, которые описывают пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК или аналог нуклеиновой кислоты на основе пептидов; или PENAM), которые обычно содержат один или более нуклеотидов или нуклеозидов, содержащих фрагмент нуклеинового основания, фрагмент линкера нуклеинового основания, который не является 5-углеродным сахаром (например, атомами азота, амидо и/или уреидо тетраами), и/или связь остова, которая не является фосфатной связью остова (например, аминоксильглициновая, полиамидная, полиэтиловая, полииоамидная, полисульфинамидная или полисульфонамидная связь остова); и патенте США № 5855911, который описывает гидрофобную, устойчивую к нуклеазе р-этоксидная связь остова.

Другие модификации и применения аналогов нуклеиновых кислот известны в данной области техники, и предполагается, что эти технологии и типы аналогов нуклеиновой кислоты могут применяться с данным изобретением.

#### Е. Получение нуклеиновых кислот.

Нуклеиновую кислоту можно получить любым способом, известным специалисту в данной области техники, таким как химический синтез, ферментативное производство или биологическое производство. Неограничивающие примеры синтетической нуклеиновой кислоты (например, синтетического олигонуклеотида) включают нуклеиновую кислоту, полученную химическим синтезом *in vitro* с использованием химии фосфотриэфира, фосфита или фосфорамидита и твердофазных методов, таких как описанные в EP 266032, включенном в данный документ в качестве ссылки, или с помощью промежуточных продуктов дезоксирибонуклеотида Н-фосфоната, как описано Froehler и соавт. (1986 год) и в патенте США № 5705629, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки. В способах по данному изобретению можно использовать один или более видов олигонуклеотидов. Различные механизмы синтеза олигонуклеотидов были описаны, например, в патентах США № 4659774, 4816571, 5141813, 5264566, 4959463, 5428148, 5554744, 5574146, 5602244, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

#### Ф. Очистка нуклеиновых кислот.

Нуклеиновая кислота может быть очищена на полиакриламидных гелях, центрифугированием в градиенте плотности хлорида цезия или любыми другими способами, известными специалисту в данной области техники (см., например, Sambrook и соавт. (2001 год), включено в данный документ посредством ссылки).

В некоторых вариантах реализации данное изобретение относится к нуклеиновой кислоте, которая является выделенной нуклеиновой кислотой. В данном контексте термин "выделенная нуклеиновая кислота" относится к молекуле нуклеиновой кислоты (например, молекуле РНК или ДНК), которая была выделена или свободна от основной массы полных геномных и транскрибируемых нуклеиновых кислот одной или более клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения "выделенная нуклеиновая кислота" относится к нуклеиновой кислоте, которая была выделена или свободна от основной массы клеточных компонентов или компонентов реакции *in vitro*, таких как, например, макромолекулы, такие как липиды или белки, малые биологические молекулы и тому подобное.

#### Г. Гибридизация.

Используемый в данном документе термин "гибридизация", "гибридизирует(ют)ся" или "способный гибридизоваться" понимается как образование двухцепочечной или трехцепочечной молекулы или молекулы с частичной двойной или трехцепочечной природой. Термин "отжиг" в данном контексте является синонимом "гибридизации".

Используемые в данном документе термин "жесткие условия" или "высокая жесткость" описывает собой те условия, которые допускают гибридизацию между или внутри одной, или более цепи(ей) нуклеиновой кислоты, содержащей комплементарную последовательность(и), но исключают гибридизацию случайных последовательностей. Жесткие условия допускают незначительное, если вообще таковое имеется, несоответствие между нуклеиновой кислотой и целевой цепью. Такие условия хорошо известны специалистам в данной области техники и являются предпочтительными для применений, требующих высокой избирательности.

Жесткие условия могут включать условия с пониженным содержанием соли и/или высокотемпературные условия, например от около 0,02 М до около 0,15 М NaCl при температурах от около 50°C до около 70°C. Понятно, что температура и ионная сила желаемой жесткости частично определяются длиной конкретной нуклеиновой кислоты (кислот), длиной и содержанием нуклеотидов в целевой последовательности(ях), зарядом нуклеиновой кислоты (кислот), а также присутствием или концентрацией формамида, хлорида тетраметиламмония или другого растворителя(ей) в гибридационной смеси.

Также понятно, что эти диапазоны, композиции и условия для гибридизации упоминаются только в неограничивающих примерах и что желательная жесткость для конкретной реакции гибридизации часто определяется эмпирически по сравнению с одним или более положительными или отрицательными контролями. В зависимости от предполагаемого применения предпочтительно использовать различные ус-

ловия гибридизации для достижения различной степени избирательности нуклеиновой кислоты к целевой последовательности. В неограничивающем примере выявление или выделение целевой нуклеиновой кислоты, которая не гибридизуется с нуклеиновой кислотой в жестких условиях гибридизации, может быть достигнуто путем гибридизации при низкой температуре и/или высокой ионной силе. Такие условия называют "низкой жесткостью" или "условиями низкой жесткости", а неограничивающие примеры низкой жесткости включают в себя гибридизацию, проводимую в диапазоне от около 0,15 М до около 0,9 М NaCl, в интервале температур от около 20 до около 50°C. Разумеется, специалисту в данной области техники также необходимо дополнительно модифицировать условия низкой или высокой жесткости для конкретного применения.

IV. Способы производства липосомального р-этоксидантисмыслового лекарственного препарата.

Липосомальный р-этоксидантисмысловый лекарственный препарат состоит из двух продуктов cGMP, оба из которых имеют требуемый FDA сертификат качества с одобренными FDA критериями выпуска. В данном документе описаны исходные материалы, растворители и конечный лекарственный препарат. После изготовления лекарственный препарат представляет собой лиофилизированный кристалл или порошок янтарного или белого цвета, который содержит следующие материалы: олигонуклеотид (например, р-этоксидантисмысловое лекарственное вещество), нейтральные липиды (например, DOPC) и поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20). При подготовке к введению пациенту в флакон добавляют нормальный физиологический раствор, и в это время образуются липосомы с р-этоксидантисмысловой молекулой, инкорпорированной во внутреннюю часть.

Конкретные физические свойства (например, растворимость и гидрофобность, которые затем влияют на растворимость лекарственного препарата в физиологическом растворе, инкорпорирование олигонуклеотида в липосомы и размер частиц липосом) готового продукта могут быть установлены с использованием предварительно определенной смеси исходного материала р-этоксидантисмыслового лекарственного вещества. Увеличение количества молекул р-этоксидантисмыслового вещества в остове олигонуклеотида приводит к тому, что молекула становится более гидрофобной (что приводит к более крупным липосомным частицам), менее полярной и менее растворимой. Так как олигонуклеотид становится менее растворимым из-за большего количества р-этоксидантисмысловых связей остова, восстановленный раствор становится белее до тех пор, пока частицы формируются, поскольку гидрофобность становится слишком высокой.

Влияние поверхностно-активного вещества (полисорбата 20) на размер липосомальных частиц определяли путем титрования количества поверхностно-активного вещества. В отсутствие полисорбата 20 только 2,8% частиц имели диаметр 300 нм или менее. В присутствии 1х полисорбата 20 (около 5% от общего липосомального р-этоксидантисмыслового лекарственного препарата) 12,5% частиц имели диаметр 300 нм или менее. С добавлением 3х-10х полисорбата 20 около 20% частиц имели диаметр 300 нм или менее. Таким образом, увеличение от 1х до 3х поверхностно-активного вещества приводит к уменьшению размера частиц.

V. Способы тестирования липосомального Р-этоксидантисмыслового лекарственного препарата.

Визуальный осмотр произведенного лекарственного препарата.

После производства выбирают и визуально осматривают флакон с образцом, содержащий лекарственный препарат. Отсутствие жидкости является обязательным, кристаллы янтарного цвета в нижней части флакона являются приемлемыми, а появление или увеличение количества белого, выпавшего в осадок порошка является лучшим результатом. Появление белого цвета указывает на лучший процесс сушки с высоким соотношением площади поверхности к массе, что очень способствует растворению для применения.

Визуальный осмотр восстановленного лекарственного препарата, готового для пациента VI.

Нормальный физиологический раствор добавляют во флакон, содержащий произведенный липосомальный р-этоксидантисмысловый лекарственный препарат и встряхивают для восстановления раствора, в котором кристаллическое или порошковое лекарственное средство полностью растворено. Делаются три основных наблюдения: 1) что кристалл или порошок полностью растворены, 2) нет белых скоплений нерастворенного материала и 3) внешний вид молочно-белый или на вид как обезжиренное молоко. Чем ближе к синему цвету выглядит восстановленная жидкость, тем лучше, поскольку это сигнализирует о меньшем размере частиц липосом, которые отражают свет в синем спектре.

Масс-спектрометрия.

Масс-спектрометрия (масс-спек) используется для отображения профиля различных масс в образце. Когда производится р-этоксидантисмысловый материал, этот образец анализируют с помощью масс-спектрометрии. В результате показаны пики материала, присутствующего на сетке, который имеет увеличивающуюся массу на оси "х" вправо и возрастающую относительную распространенность по массам на оси "у" вверх. Анализируется профиль из образца для определения относительного количества р-этоксидантисмысловых остова в р-этоксидантисмысловом образце, распознается, что профиль пиков представляет собой (начиная с самого дальнего справа) полноразмерный материал со всеми остовами, состоящими из р-этоксидантисмысловых связей, следующий пик слева представляет собой полноразмерный материал с одним остовом с делецией р-этоксидантисмысловых связей (и, следовательно, этил удаляется, а в результате получается нормальная фосфодиэфирная связь

остова), и так продолжая. Смещенная вправо сигнатура масс-спектрометрии представляет собой образец р-этокси, имеющий больше р-этокси остовов и, следовательно, обладающий более гидрофобными и менее растворимыми свойствами; и аналогичным образом, смещенная влево имеет противоположные эффекты. Проверка графика масс-спектрометрии образца также может быть использована для определения того, оказывает ли фильтрация во время производства какое-либо неблагоприятное воздействие на композицию олигонуклеотидов, присутствующую в отфильтрованном лекарственном препарате.

#### УФ-тестирование.

Испытание ультрафиолетом применяется для определения массы олигонуклеотида, присутствующего в образце. Олигонуклеотиды поглощают свет в диапазоне 260 нм. В результате УФ-тестирование готового восстановленного лекарственного препарата стало использоваться в качестве метода определения количества олигонуклеотидного лекарственного вещества во флаконе лекарственного препарата. С точки зрения развития производства и инноваций УФ-тестирование используется для определения того, были ли проблемы, возникающие во время фильтрации при изготовлении или плохой растворимости Р-этокси антисмыслового лекарственного вещества, что приводит к меньшему количеству олигонуклеотидов в растворе и, следовательно, к более низкому УФ-показателю. Этот способ будет утвержден и, вероятно, станет частью окончательного тестирования конечного продукта.

#### Размер липосомных частиц.

Флакон готового лекарственного препарата восстанавливают и тестируют на размер липосомных частиц. Результатом часто является примерно нормальное распределение, имеющее центральную точку, хвосты и средние значения или примерно нормальное распределение большинства частиц и меньшие вторичные пики меньших липосомных частиц, возникающие в результате эффектов образования частиц второго порядка. Важно, чтобы липосомные частицы не были слишком большими, так как они могут приводить к неблагоприятным воздействиям у пациентов (например, создавать проблемы кровотока в небольших кровеносных сосудах в легких). В результате критерии выпуска лекарственного препарата включают в себя то, что после измерения размера частиц 90% липосом имеют размер около 5 мкм или менее или около 3 мкм или менее. Кроме того, предпочтительными являются липосомы меньшего размера, поскольку они будут лучше поглощаться клетками, а также липосомы меньшего размера могут проникать в поры сосудов, что позволяет проникать внутрь опухолей, повышая эффективность лечения липосомального р-этокси антисмыслового лекарственного препарата.

#### VI. Способы лечения.

Некоторые аспекты данного изобретения предлагают олигонуклеотид-липидный комплекс (например, олигонуклеотид, инкорпорированный в незаряженную липосому) для лечения заболеваний, таких как рак, аутоиммунное заболевание или инфекционное заболевание. В частности, олигонуклеотид может иметь последовательность, которая допускает спаривание оснований с нуклеотидной последовательностью человека и, таким образом, может ингибировать экспрессию белка, кодируемого нуклеотидной последовательностью человека.

"Лечение" и "лечить" относятся к введению или применению терапевтического средства субъекту, или выполнению процедуры, или способа воздействия субъекту с целью получения лечебного эффекта на заболевание или расстройство здоровья. Например, лечение может включать введение фармацевтически эффективного количества олигонуклеотид-липидного комплекса.

"Субъект" и "пациент" относятся к человеку или животному, отличному от человека, например к приматам, млекопитающим и позвоночным. В конкретных вариантах реализации изобретения субъектом является человек.

Термин "терапевтический эффект" или "терапевтически эффективный", используемый в данном изобретении, относится ко всему, что способствует или повышает, улучшает здоровье и самочувствие субъекта в отношении терапевтического лечения этого состояния. Это включает, но без ограничений, снижение частоты или тяжести признаков или симптомов заболевания. Например, лечение рака может включать, например, уменьшение размера опухоли, снижение инвазивности опухоли, снижение скорости роста рака или предотвращение метастазов. Лечение рака также может относиться к увеличению выживаемости субъекта, страдающего раковым заболеванием. Лечение аутоиммунного заболевания может включать, например, снижение экспрессии собственного антигена, против которого возникает нежелательный иммунный ответ, стимулирование толерантности к собственному антигену, против которого возникает нежелательный иммунный ответ, или ингибирование иммунного ответа в отношении собственного антигена. Лечение инфекционного заболевания может включать, например, устранение инфекционного агента, снижение уровня инфекционного агента или поддержание уровня инфекционного агента на определенном уровне.

Опухоли, для которых пригодны данные способы лечения, включают любой тип опухолевых клеток, например тех, что обнаруживаются в солидной опухоли, гематологической опухоли, метастатическом раке или неметастатическом раке. Типовые солидные опухоли могут включать, но без ограничений, опухоль органа, выбранного из группы, состоящей из поджелудочной железы, толстой кишки, слепой кишки, пищевода, желудочно-кишечного тракта, десны, печени, кожи, желудка, яичка, языка, матки, желудка, мозга, головы, шеи, яичника, почки, гортани, саркомы, кости, легкого, мочевого пузыря, мелано-

мы, предстательной железы и молочной железы. Типовые гематологические опухоли включают опухоли костного мозга, злокачественность Т или В клеток, лейкемии, лимфомы, бластомы, миеломы и тому подобное. Другие примеры раков, которые можно лечить с применением предложенных в данном документе способов, включают, но без ограничений, карциному, лимфому, бластому, саркому, лейкемию, плоскоклеточный рак, рак легкого (включая мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточная карцинома легкого), рак брюшины, гепатоцеллюлярный рак, рак желудочно-кишечного тракта или желудка (включая желудочно-кишечный рак и желудочно-кишечный стромальный рак), рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстой кишки, колоректальный рак, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почки, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, различные типы рака головы и шеи, меланому, поверхностно распространяющуюся меланому, меланому типа злокачественного лентиго, акральные лентигинозные меланомы, узловые меланомы, а также В-клеточную лимфому (включая низкодифференцированную/фолликулярную неходжкинскую лимфому (НХЛ), лимфоцитарную лимфому (SL - small lymphocytic) НХЛ, среднедифференцированную/фолликулярную НХЛ, среднедифференцированную диффузную НХЛ; высокодифференцированную иммунобластную НХЛ; высокодифференцированную лимфобластную НХЛ; высокодифференцированную мелкоклеточную НХЛ с нерассеченными ядрами; генерализованную лимфаденопатию НХЛ; лимфому из клеток зоны мантии; СПИД-ассоциированную лимфому; и макроглобулинемию Вальденстрема), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), лейкоз ворсистых клеток, множественную миелому, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и хронический миелобластный лейкоз.

Рак может конкретно иметь следующий гистологический тип, хотя и не ограничиваться им: новообразование, злокачественное; карциному; карциному, недифференцированную; гигантоклеточную и веретенчатую карциному; мелкоклеточную карциному; папиллярную карциному; плоскоклеточную карциному; лимфоэпителиальную карциному; базальноклеточную карциному; пиломатриксную карциному; переходноклеточную карциному; папиллярную переходноклеточную карциному; аденокарциному; гастриному, злокачественную; холангиокарциному; гепатоцеллюлярную карциному; комбинированную гепатоцеллюлярную карциному и холангиокарциному; трабекулярную аденокарциному; аденокистозную карциному; аденокарциному в аденоматозном полипе; аденокарциному семейного колиполипоза; солидную карциному; карциноидную опухоль, злокачественную; бронхоальвеолярную аденокарциному; папиллярную аденокарциному; хромофобную карциному; ацидофильную карциному; оксифильную аденокарциному; базофильную карциному; светлоклеточную аденокарциному; гранулярноклеточную карциному; фолликулярную аденокарциному; папиллярную и фолликулярную аденокарциному; некапсулирующую склерозирующую карциному; карциному коры надпочечников; эндометрическую карциному; карциному придатка кожи; апокринную аденокарциному; сальную аденокарциному; церуминозную аденокарциному; мукоэпидермоидную карциному; цистаденокарциному; папиллярную цистаденокарциному; папиллярную серозную цистаденокарциному; муцинозную цистаденокарциному; муцинозную аденокарциному; перстневидно-клеточную карциному; инфильтративно-протоковую карциному; медулярную карциному; лобулярную карциному; воспалительная карцинома; болезнь Педжета, молочной железы; ацинозно-клеточную карциному; аденосквамозную карциному; аденокарциному с плоскоклеточной метаплазией; тимому, злокачественную; стромальную опухоль яичника, злокачественную; текому, злокачественную; гранулезоклеточную опухоль, злокачественную; андробластому, злокачественную; карциному из клеток Сертоли; опухоль из клеток Лейдига, злокачественную; опухоль из жировых клеток, злокачественную; параганглиому, злокачественную; экстрамамиллярную параганглиому, злокачественную; феохромоцитому; гломангиосаркому; злокачественную меланому; амеланотическую меланому; поверхностную распространяющуюся меланому; злокачественную меланому в гигантском пигментном невусе; эпителиоидную меланому; меланоформный невус, злокачественный; саркому; фибросаркому; фиброзную гистиоцитому, злокачественную; миксосаркому; липосаркому; леймиосаркому; рабдомиосаркому; эмбриональную рабдомиосаркому; альвеолярную рабдомиосаркому; стромальную саркому; смешанную опухоль, злокачественную; смешанную опухоль Мюллера; нефробластому; гепатобластому; карциносаркому; мезенхимому, злокачественную; опухоль Бреннера, злокачественную; опухоль филоидов, злокачественную; синовиальную саркому; мезотелиому, злокачественную; дисгерминому; эмбриональную карциному; тератому, злокачественную; овариальный зуб, злокачественный; хориокарциному; мезонефрому, злокачественную; гемангиосаркому; гемангиоэндотелиому, злокачественную; саркому капюши; гемангиоперицитому, злокачественную; лимфангиосаркому; остеосаркому; юстакортикальную остеосаркому; хондросаркому; хондробластому, злокачественную; мезенхимальную хондросаркому; гигантоклеточную опухоль кости; саркому Юинга; одонтогенную опухоль, злокачественную; амелобластическую одонтогенную саркому; амелобластому, злокачественную; амелобластическую фибросаркому; пинелалому, злокачественную; хордому; глиому, злокачественную; эпендимому; астроцитому; протоплазматическую астроцитому; фибриллярную астроцитому; астробластому; глиобластому; олигодендроглиому; олигодендробластому; примитивную нейроэктодермальную; мозжечковую саркому; ганглио-нейробластому; нейробластому; ретинобластому; обонятельную нейрогенную опухоль; менингиому,

злокачественную; нефрофибросаркому; нейриллемому, злокачественную; зернисто-клеточную опухоль, злокачественную; злокачественную лимфому; лимфогранулематоз; болезнь Ходжкина; парагранулему; злокачественную лимфому, малую лимфоцитарную; злокачественную лимфому, крупноклеточную, диффузную; злокачественную лимфому, фолликулярную; фунгоидный микоз; другие определенные неходжкинские лимфомы; злокачественный гистиоцитоз; множественную миелому; саркому тучных клеток; иммунопролиферативное заболевание тонкого кишечника; лейкемию; лимфоидный лейкоз; плазматочный лейкоз; эритролейкоз; лимфосаркому клеточного лейкоза; миелоидный лейкоз; базофильный лейкоз; эозинофильный лейкоз; моноцитарный лейкоз; тучноклеточный лейкоз; мегакариобластный лейкоз; миелоидную саркому; и лейкоз ворсистых клеток.

Аутоиммунные заболевания, для которых пригодны данные способы лечения, включают без ограничения спондилоартропатию, анкилозирующий спондилоартрит, псориатический артрит, реактивный артрит, энтеропатический артрит, сахарный диабет, целиакию, аутоиммунную болезнь щитовидной железы, аутоиммунную болезнь печени, болезнь Аддисона, отторжение трансплантата, болезнь трансплантата против хозяина, болезнь хозяина против трансплантата, язвенный колит, болезнь Крона, синдром раздраженного кишечника, воспалительное заболевание кишечника, ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, семейная лихорадка Средиземноморья, боковой амиотрофический склероз, синдром Шегрена, ранний артрит, вирусный артрит, рассеянный склероз или псориаз. Диагноз и лечение этих заболеваний хорошо документированы в литературе.

Инфекционные заболевания, для которых применимы данные методы лечения, включают без ограничения бактериальные инфекции, вирусные инфекции, грибковые инфекции и паразитарные инфекции. Типовые вирусные инфекции включают вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус иммунодефицита человека 1, вирус иммунодефицита человека 2, вирус папилломы человека, вирус простого герпеса 1, вирус простого герпеса 2, опоясывающий герпес, ветряную оспу, вирус Коксаки А16, цитомегаловирус, вирус Эбола, энтеровирус, вирус Эпштейна-Барра, вирус Ханта, вирус Хендра, вирусный менингит, респираторно-синцитиальный вирус, ротавирус, вирус западного нила, аденовирус и инфекции вируса гриппа. Типовые бактериальные инфекции включают *Chlamydia trachomatis*, *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, виды *Mycobacteria* (например, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pyogenes* (Group A Streptococcus), *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococcus), *Streptococcus* (группа вириданс), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (анаэробные виды), *Streptococcus pneumoniae*, патогенный вид *Campylobacter*, вид *Enterococcus*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, вид *Corynebacterium*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, вид *Bacteroides*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertense*, *Leptospira*, *Rickettsia*, *Actinomyces israelii*, виды *Shigella* (например, *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae*) и инфекции видов *Salmonella*. Типовые грибковые инфекции включают *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* и инфекции *Chlamydia trachomatis*.

Олигонуклеотид-липидный комплекс может быть применен в данном документе в качестве противоопухолевого, противовирусного, антибактериального, противогрибкового, противопаразитарного или антиаутоиммунного средства в различных способах воздействия. В конкретном варианте реализации изобретение предполагает способы применения олигонуклеотид-липидного комплекса, включающие контактирование популяции пораженных клеток с терапевтически эффективным количеством олигонуклеотид-липидного комплекса в течение периода времени, достаточного для ингибирования или реверсии заболевания.

В одном варианте реализации изобретения контактирование *in vivo* осуществляют путем введения пациенту внутривенной, внутривнутрибрюшинной, подкожной или внутривнутриопухолевой инъекции терапевтически эффективного количества физиологически переносимой композиции, содержащей олигонуклеотид-липидный комплекс по данному изобретению. Олигонуклеотид-липидный комплекс можно вводить парентерально путем инъекции или путем постепенной инфузии с течением времени.

Терапевтические композиции, содержащие олигонуклеотид-липидный комплекс, обычно вводят внутривенно или подкожно, например путем инъекции стандартной дозы. Термин "стандартная доза" при использовании в отношении терапевтической композиции относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичной дозы для субъекта, причем каждая единица содержит заданное количество активного вещества, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым разбавителем, то есть носителем или наполнителем.

Композиции вводят способом, совместимым с дозированной лекарственной формой, и в терапевтически эффективном количестве. Величина, подлежащая введению, зависит от субъекта, подлежащего лечению, способности системы субъекта использовать активный ингредиент и желаемого терапевтического эффекта. Точные количества активного ингредиента, необходимые для введения, зависят от суждения практикующего врача и индивидуальны для каждого человека. Однако подходящие диапазоны дозировки для системного применения описаны в данном документе и зависят от пути введения. Также

рассматриваются подходящие режимы дозирования для начального и стимулирующего введения и характеризуются путем начального введения с последующими повторными дозами в течение одного или более интервалов времени путем последующей инъекции или другого введения. Типовые множественные введения описаны в данном документе и являются особенно предпочтительными для непрерывного поддержания высокого уровня полипептида в сыворотке крови и ткани. В альтернативном варианте предполагается непрерывная внутривенная инфузия, достаточная для поддержания концентрации в крови в диапазонах, указанных для терапии *in vivo*.

Предполагается, что олигонуклеотид по данному изобретению может вводиться системно или локально для лечения заболевания, например, для ингибирования роста опухолевых клеток или для уничтожения раковых клеток у онкопациентов с местнораспространенными или метастатическими раками. Их можно вводить внутривенно, интратекально, подкожно и/или внутривентально. Их можно вводить отдельно или в комбинации с антипролиферативными лекарственными средствами. В одном варианте реализации изобретения их вводят для снижения раковой нагрузки у пациента до операции или других процедур. В альтернативном варианте их можно вводить после операции для гарантирования, что любые остатки опухоли (например, рак, который не удалось удалить с помощью хирургической операции) не выживут.

Терапевтически эффективное количество олигонуклеотида представляет собой заданное количество, рассчитанное для достижения желаемого эффекта, то есть для ингибирования экспрессии целевого белка. Таким образом, диапазоны дозирования для введения олигонуклеотидов по изобретению являются достаточно большими для достижения желаемого эффекта. Дозировка не должна быть настолько велика, чтобы вызвать неблагоприятные побочные эффекты, такие как синдромы повышенной вязкости крови, отек легких, застойная сердечная недостаточность, неврологические эффекты и тому подобное. Как правило, дозировка будет зависеть от возраста, состояния, пола и степени заболевания у пациента и может быть определена специалистом в данной области техники. В случае осложнений лечащий врач может корректировать дозировку.

Композицию по данному изобретению предпочтительно вводят пациенту парентерально, например с помощью внутривенной, внутриартериальной, внутримышечной, внутривентальной, внутривентальной, подкожной, внутривентальной или интратекальной инъекцией, или могут применять *ex vivo*. Предпочтительные дозировки составляют от 5 до 25 мг/кг. Введение предпочтительно повторяется по расписанию, пока рак не исчезнет или не регрессирует, и может осуществляться в сочетании с другими формами терапии.

#### VII. Лекарственные препараты.

Фармацевтическая композиция, содержащая липосомы, обычно включает стерильный, фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, такой как вода или физиологический раствор.

Когда происходит клиническое применение незаряженного липидного компонента (например, в форме липосомы), содержащего олигонуклеотид, обычно является полезным приготовление липидного комплекса в качестве фармацевтической композиции, подходящей для предполагаемого применения. Это обычно влечет за собой приготовление фармацевтической композиции, которая практически не содержит пирогенов, а также любых других примесей, которые могут быть вредными для человека или животных. Можно также использовать соответствующие буферы для стабильности комплекса и обеспечения поглощения целевыми клетками.

Фразы "фармацевтические или фармакологически приемлемые" относятся к молекулярным объектам и композициям, которые не приводят к нежелательной, аллергической или другой неблагоприятной реакции при введении животному, например человеку, если такое введение является необходимым. Получение фармацевтической композиции, которая содержит по меньшей мере один незаряженный липидный компонент, содержащий олигонуклеотид или дополнительный активный ингредиент, будет известно специалистам в данной области техники в свете данного описания, как продемонстрировано на примерах в публикации Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st, 2005, включенной в данный документ посредством ссылки. Кроме того, при введении животному (например, человеку) следует понимать, что препараты должны соответствовать требованиям стерильности, пирогенности, общим стандартам безопасности и чистоты, как того требует Управление по биологическим стандартам FDA.

В данном контексте термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, консерванты (например, антибактериальные агенты, противогрибковые агенты), изотонические агенты, агенты, замедляющие абсорбцию, соли, консерванты, лекарственные средства, стабилизаторы лекарственного средства, гели, связующие вещества, вспомогательные вещества, разрыхляющие средства, смазывающие вещества, подсластители, ароматизаторы, красители, подобные материалы и их комбинации, которые известны специалисту в данной области техники. Фармацевтически приемлемый носитель предпочтительно приготавливается для введения человеку, хотя в некоторых вариантах реализации изобретения может быть предпочтительным применение фармацевтически приемлемого носителя, который приготавливается для введения животному, отличному от человека, но который является неприемлемым (например, из-за правительственных постановлений) для введения человеку. В терапевтических или фармацев-

тических композициях возможно применение любого обычного носителя, за исключением случаев, когда он несовместим с активным ингредиентом.

Фактическая величина дозы композиции по данному изобретению, вводимая пациенту или субъекту, может быть определена физическими и физиологическими факторами, такими как масса тела, тяжесть состояния, тип заболевания, подлежащего лечению, предшествующие или параллельные терапевтические вмешательства, спонтанно развившаяся болезнь пациента и путь введения. Практикующий врач, ответственный за введение, в любом случае определит концентрацию активного ингредиента(ов) в композиции и соответствующую дозу(ы) для отдельного субъекта.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции могут содержать, например, по меньшей мере около 0,1% активного соединения. В других вариантах реализации изобретения активное соединение может содержать от около 2 до около 75% веса единицы или от около 25 до около 60%, например, и любой диапазон в этих границах. В других неограничивающих примерах доза может также содержать от около 1 мкг/кг/масса тела, около 5 мкг/кг/масса тела, около 10 мкг/кг/масса тела, около 50 мкг/кг/масса тела, около 100 мкг/кг/масса тела, около 200 мкг/кг/масса тела, около 350 мкг/кг/масса тела, около 500 мкг/кг/масса тела, около 1 мг/кг/масса тела, около 5 мг/кг/масса тела, около 10 мг/кг/масса тела, около 50 мг/кг/масса тела, около 100 мг/кг/масса тела, около 200 мг/кг/масса тела, около 350 мг/кг/масса тела, около 500 мг/кг/масса тела, до около 1000 мг/кг/масса тела или более для каждого введения и любой диапазон в этих границах. В неограничивающих примерах диапазона из чисел, приведенных в данном документе может быть введен диапазон от около 5 до около 100 мг/кг/масса тела, от около 5 до около 500 мг/кг/масса тела и тому подобное.

Олигонуклеотид по данному варианту реализации изобретения может быть введен в дозе 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более мкг нуклеиновой кислоты на дозу. Каждая доза может быть в объеме 1, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 или более мкл или мл.

Растворы терапевтических композиций могут быть приготовлены в воде, подходящим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии также могут быть приготовлены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях, их смесях и в маслах. При обычных условиях хранения и применения эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

Терапевтические композиции по данному изобретению преимущественно вводятся в виде инъекционных композиций, либо в виде жидких растворов, либо суспензий; также перед инъекцией могут быть приготовлены твердые формы, пригодные для растворения или суспензии в жидкости. Эти препараты также могут быть эмульгированы. Типичная композиция для этой цели содержит фармацевтически приемлемый носитель. Например, композиция может содержать 10, 25, 50 или до около 100 мг человеческого сывороточного альбумина на миллилитр забуференного фосфатом физиологического раствора. Другие фармацевтически приемлемые носители включают водные растворы, нетоксичные наполнители, включая соли, консерванты, буферы и тому подобное.

Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительное масло и инъецируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, физиологические растворы, парентеральные наполнители, такие как хлорид натрия, декстрозу Рингера и тому подобное. Внутривенные наполнители включают жидкость и питательные добавки. Консерванты включают в себя противомикробные агенты, антиоксиданты, хелатирующие агенты и инертные газы. pH и точная концентрация различных компонентов фармацевтической композиции устанавливаются в соответствии с хорошо известными параметрами.

Терапевтические композиции по данному изобретению могут включать классические лекарственные препараты. Введение терапевтических композиций по данному изобретению будет осуществляться по любому обычному пути введения до тех пор, пока целевая ткань будет доступна по этому пути введения. Сюда относится оральный, назальный, буккальный, ректальный, вагинальный или местный пути введения. Местное введение может быть особенно выгодным для лечения рака кожи с целью предотвращения вызванной химиотерапией алопеции или другого кожного гиперпролиферативного расстройства. В альтернативном варианте введение может осуществляться путем ортотопической, внутрикожной, подкожной, внутримышечной, внутрибрюшинной или внутривенной инъекции. Такие композиции обычно вводят в виде фармацевтически приемлемых композиций, которые включают физиологически приемлемые носители, буферы или другие наполнители. Для лечения патологических состояний легких можно использовать аэрозоль. Объем аэрозоля составляет от около 0,01 до 0,5 мл.

Эффективное количество терапевтической композиции определяется исходя из поставленной цели. Термин "стандартная доза" или "дозировка" относится к физически дискретным единицам, подходящим для применения на субъекте, причем каждая единица содержит предопределенное количество терапевтической композиции, рассчитанное для получения желаемых ответов, рассмотренных выше, в связи с ее введением, то есть соответствующим путем введения и режимом лечения. Количество, которое должно вводиться, как по количеству процедур лечения, так и по стандартной дозе, зависит от желаемой защиты или эффекта.

Точные количества терапевтической композиции также зависят от суждения практикующего врача

и являются специфическими для каждого человека. Факторы, влияющие на дозу, включают в себя физическое и клиническое состояние пациента, путь введения, поставленную цель лечения (например, облегчение симптомов вместо лечения) и эффективность, стабильность и токсичность конкретного терапевтического вещества.

#### VIII. Комбинированные лечения.

В определенных вариантах реализации изобретения композиции и способы по данному изобретению включают ингибирующий олигонуклеотид или олигонуклеотид, способный экспрессировать ингибитор экспрессии генов в сочетании со второй или дополнительной терапией. Способы и композиции, включая комбинированную терапию, усиливают терапевтический или защитный эффект и/или повышают терапевтический эффект другой противоопухолевой или антигиперпролиферативной терапии.

Терапевтические и профилактические методики и композиции могут быть представлены в объединенном количестве, эффективном для достижения желаемого эффекта, такого как уничтожение раковой клетки и/или ингибирование клеточной гиперпролиферации. Этот процесс может включать контактирование клеток как с ингибитором экспрессии генов, так и с второй терапией. Ткань, опухоль или клетка могут контактировать с одной или более композициями или фармакологической лекарственной формой(ми), включающими один или более агентов (то есть ингибитор экспрессии генов или противоопухолевое средство) или ткань, опухоль и/или клетка контактируют с двумя или более отдельными композициями или составами, при этом одна композиция обеспечивает 1) ингибирующий олигонуклеотид; 2) противоопухолевое средство или 3) как ингибирующий олигонуклеотид, так и противоопухолевое средство. Кроме того, предполагается, что такая комбинированная терапия может применяться в сочетании с химиотерапией, лучевой терапией, хирургической терапией или иммунотерапией.

Ингибирующий олигонуклеотид может быть введен до, во время, после или в различных сочетаниях в зависимости от противоопухолевой терапии. Введения могут осуществляться в интервалах, начиная от одновременного и до минут, дней, недель. В вариантах реализации изобретения, где ингибирующий олигонуклеотид предоставляется пациенту отдельно от противоопухолевого вещества, обычно гарантируется, что между временем каждой доставки не проходит значительного времени, так что эти два соединения все еще могли бы проявлять преимущественно комбинированное воздействие на пациента. В таких случаях предполагается, что пациенту может предоставляться терапия ингибирующим олигонуклеотидом и противоопухолевой терапией в течение от около 12 до 24 или 72 ч между терапиями, и более предпочтительно в течение около 6-12 ч между терапиями. В некоторых ситуациях может быть желательно значительно продлить период времени для лечения, когда между соответствующими введениями происходит от нескольких дней (2, 3, 4, 5, 6 или 7) до нескольких недель (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

В некоторых вариантах реализации изобретения курс лечения будет длиться 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90 дней или более. Предполагается, что одно вещество может быть назначено на день 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 и/или 90 или любую их комбинацию, и другое вещество назначается на день 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 и/или 90 или любую их комбинацию. В течение одного дня (24-часовой период) пациенту может быть назначено одно или более введений вещества (веществ). Кроме того, после курса лечения предполагается, что существует период времени, при котором противоопухолевая терапия не проводится. Этот период может длиться 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 дней, и/или 1, 2, 3, 4, 5 недель, и/или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 месяцев или более, в зависимости от состояния пациента, такого как его прогнозирование болезни, сила, здоровье и тому подобное.

Могут использоваться различные комбинации. Для примера, ниже терапия ингибирующим олигонуклеотидом обозначается буквой "А", а противоопухолевая терапия - буквой "В":

A/V/A V/A/V V/V/A A/A/V A/V/V V/A/A A/V/V/V

V/A/V/V V/V/V/A V/V/A/V A/A/V/V A/V/A/V A/V/V/A

V/V/A/A V/A/V/A V/A/A/V A/A/A/V V/A/A/A A/V/A/A

A/A/V/A

Введение пациенту любого соединения или терапии по данному изобретению будет происходить в соответствии с общими протоколами введения таких соединений с учетом токсичности веществ, если таковая имеется. Поэтому в некоторых вариантах реализации изобретения существует этап контроля токсичности, который можно отнести к комбинированной терапии. Как ожидается, циклы лечения будут повторяться по мере необходимости. Также предполагается, что в сочетании с описанной терапией могут

применяться различные стандартные терапии, а также хирургическое вмешательство.

В конкретных аспектах предполагается, что стандартная терапия будет включать химиотерапию, лучевую терапию, иммунотерапию, хирургическую терапию или генную терапию и может применяться в комбинации с терапией ингибитором генной экспрессии, противоопухолевой терапией или как терапией ингибитором генной экспрессии, так и противоопухолевой терапией, как описано в данном документе.

#### А. Химиотерапия.

В соответствии с данными вариантами реализации изобретения можно применять широкий спектр химиотерапевтических агентов. Термин "химиотерапия" относится к применению лекарств для лечения рака. "Химиотерапевтический агент" используется для обозначения соединения или композиции, которая вводится при лечении рака. Эти агенты или лекарственные средства классифицируются по их способу активности внутри клетки, например, влияют ли они на какой-либо этап клеточного цикла или на клеточный цикл в целом. В альтернативном варианте средство может быть охарактеризовано на основе его способности напрямую шивать ДНК, интеркалировать в ДНК или индуцировать хромосомные и митотические аберрации, влияя на синтез нуклеиновых кислот.

Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтре-тамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилендиофосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топо-текан); бриостатин; каллистатин; СС-1065 (включая синтетические аналоги адозелезина, карзелезина и бизелезина); криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги, KW-2189 и СВ1-ГМ1); элейтеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид мехлорэтамин оксида, мелфалан, новэмбихин, фенстерин, преднимустин, трифосфамид и урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как эндииновые антибиотики (например, калихемицин, особенно калихемицин гамма II и калихемицин омега II); динемидин, включая динемидин А; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; а также хромофор неокарциностантин и связанные с ним эндииновые хромопротеины антибиотики хромофоры, аклациномизины, актиномицин, аутранницин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофенольная кислота, ногаларцицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пу-ромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, циностатин и зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолиевой кислоты, таких как деноптерин, птероптерин и триметрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн и тиогуанин; пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин и флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, пропионат дромонастола, эпитиостанол, мепитиостан и тестолактон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как митотан и трилостан; заменитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамидгликозид; аминоклевулиновая кислота; эни-лурацил; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдатрексат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элформи-тин; эллиптиний ацетат; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидаинин; майтансиноиды, такие как майтансин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитра-эрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; про-карбазин; полисахаридный комплекс PSK; разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно токсин Т-2, верракурин А, ро-ридин А и ангуидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипобро-ман; гацитозин; арабинозид ("Ара-С"); циклофосфамид; таксоиды, например, паклитаксел и доцетаксел гемцитабина; б-тиогуанин; меркаптопурин; координационные комплексы платины, такие как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин; винбластин; платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; вин-крестин; винорелбин; новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоклевулиновая кислота; ибандро-нат; иринотекан (например, СРТ-11); ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметалгилорнитин (ДФМО); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин; карбоплатин, прокарбазин, пликоми-цин, гемцитабиен, навельбин, ингибиторы фарнезил-протеин тансферазы, трансплатину и фармацевтиче-ски приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеуказанных.

#### В. Лучевая терапия.

Другие факторы, которые вызывают повреждение ДНК и широко применяются, включают то, что широко известно, как  $\gamma$ -лучи, рентгеновские лучи и/или направленная доставка радиоизотопов в опухо-левые клетки. Также рассматриваются другие формы факторов повреждения ДНК, такие как микровол-ны, протонное облучение (патенты США № 5760395 и 4870287) и УФ-облучение. Скорее всего, все эти

факторы оказывают воздействие на широкий диапазон повреждений ДНК, на предшественников ДНК, на репликацию и восстановление ДНК, а также на сборку и сохранность хромосом. Диапазоны дозировки для рентгеновских лучей варьируются от суточных доз от 50 до 200 рентген в течение длительных периодов времени (от 3 до 4 недель) до единичных доз от 2000 до 6000 рентген. Диапазоны дозировки для радиоизотопов сильно различаются и зависят от периода полураспада изотопа, силы и типа излучения, а также поглощения опухолевыми клетками.

Термины "контактируют" и "подвергаются" по отношению к клетке, применяются в данном документе для описания процесса, посредством которого терапевтическая конструкция и химиотерапевтический агент или радиотерапевтическое средство доставляются в целевую клетку или помещаются в контактное положение с целевой клеткой. Для достижения уничтожения клетки, например, оба средства доставляются в клетку в суммарном количестве, достаточном для уничтожения клетки или предотвращения ее деления.

#### С. Иммуноterapia.

В контексте лечения рака иммуноterapia, как правило, полагается на применение иммунных эффекторных клеток и молекул для нацеливания на и уничтожения раковых клеток.

Трастузумаб (Герцептин™) является таким примером. Иммунным эффектором может быть, например, антитело, специфичное к определенному маркеру на поверхности опухолевой клетки. Антитело может служить эффектором терапии или может вовлекать другие клетки, чтобы фактически повлиять на уничтожение клеток. Антитело также может быть конъюгировано с лекарственным средством или токсином (химиотерапевтический препарат, радионуклид, цепь рицина А, холерный токсин, коклюшный токсин и тому подобное) и служить просто в качестве нацеливающего агента. В альтернативном варианте эффектор может представлять собой лимфоцит, несущий молекулу поверхности, которая прямо или опосредованно взаимодействует с целью опухолевой клетки. Различные эффекторные клетки включают цитотоксические Т-клетки и НК-клетки. Комбинация терапевтических методов, то есть прямая цитотоксическая активность и ингибирование или понижение ErbB2, обеспечит терапевтическое преимущество при лечении раков, сверхэкспрессирующих ErbB2.

Другая иммуноterapia также может быть применена в рамках комбинированной терапии с использованием сайленсинга генов, описанного выше. В одном аспекте иммунотерапии опухолевая клетка должна иметь некоторый маркер, который поддается нацеливанию, то есть не присутствует в большинстве других клеток. Существует множество маркеров опухолей, и любой из них может быть подходящим для нацеливания в контексте данного изобретения. Распространенные опухолевые маркеры включают карциноэмбриональный антиген, специфический антиген предстательной железы, мочевого опухолеассоциированный антиген, эмбриональный антиген, тирозиназу (p97), gp68, TAG-72, HMFG, антиген сиалил-Lewis, MucA, MucB, PLAP, рецептор эстрогена, рецептор ламинина, erb B и p155. Альтернативным аспектом иммунотерапии является сочетание противораковых воздействий с иммуностимулирующими воздействиями. Иммуностимулирующие молекулы также существуют, в том числе цитокины, такие как ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-12, ГМ-КСФ (гранулоцито-макрофаго-колониестимулирующий фактор), гамма-ИФН, хемокины, такие как MIP-1 (макрофагальный белок воспаления 1), MCP-1 (моноцитарный хемотаксический протеин 1), ИЛ-8 и факторы роста, такие как лиганд FLT3 (fms-подобная тирозинкиназа 3). Было показано, что сочетание иммуностимулирующих молекул либо в виде белков, либо с использованием доставки генов в комбинации с онкосупрессором усиливает противоопухолевые эффекты. Более того, антитела к любому из этих соединений могут быть использованы для нацеливания противоопухолевых средств, описанных в данном документе.

Примерами иммунотерапии, которые в данное время исследуются или применяются, являются иммуностимуляторы, например *Mycobacterium bovis*, *Plasmodium falciparum*, динитрохлорбензол и ароматические соединения (патенты США № 5801005 и 5739169; Hui and Hashimoto, 1998 год; Christodoulides и соавт., 1998 год), цитокиновая терапия, например интерфероны  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ ; ИЛ-1, ГМ-КСФ и ФНО (фактор некроза опухоли) (Bukowski и соавт., 1998 год; Davidson и соавт., 1998 год; Hellstrand и соавт., 1998 год) генная терапия, например, ФНО, ИЛ-1, ИЛ-2, p53 (Qin и соавт., 1998 год; Austin-Ward и Villaseca, 1998 год; патенты США № 5830880 и 5846945) и моноклональные антитела, например, к ганглиозиду GM2, к HER-2, к p185 (Pietras и соавт., 1998 год; Hanibuchi и соавт., 1998 год; патент США № 5824311). Предполагается, что одна или более противоопухолевых терапий могут быть использованы с терапиями, которые используют генный сайленсинг, описанными в данном документе.

При активной иммунотерапии вводят антигенный пептид, полипептид или белок, или аутологичную или аллогенную композицию опухолевых клеток, или "вакцину", как правило, с отдельным бактериальным адьювантом (Ravindranath и Morton, 1991 год; Morton и соавт., 1992 год; Mitchell и соавт., 1990 год; Mitchell и соавт., 1993 год).

При адоптивной иммунотерапии циркулирующие лимфоциты пациента или лимфоциты, проникающие в опухолевые ткани, выделяются *in vitro*, активируются лимфокинами, такими как ИЛ-2, или трансдуцируются генами для некроза опухолей и вводятся обратно (Rosenberg и соавт., 1988 год; 1989 год).

#### D. Хирургия.

Примерно 60% людей, страдающих раковым заболеванием, будут подвергаться хирургическому вмешательству определенного типа, которое включает профилактическую, диагностическую или определяющую стадию, лечебную и паллиативную хирургию. Лечебная хирургия - это лечение рака, которое может применяться в сочетании с другими видами терапии, такими как лечение по данному изобретению, химиотерапия, лучевая терапия, гормональная терапия, генная терапия, иммунотерапия и/или альтернативная терапия.

Лечебная операция включает резекцию, при которой вся или часть раковой ткани физически удаляются, вырезаются и/или разрушаются. Резекция опухоли относится к физическому удалению по меньшей мере части опухоли. В дополнение к резекции опухоли лечение хирургическим путем включает в себя лазерную хирургию, криохиргию, электрохиргию и микроскопически контролируемую хирургию (операцию Моса). Дополнительно предполагается, что данное изобретение может быть применено в сочетании с удалением поверхностно расположенных раков, предраков или случайных количеств нормальной ткани.

При удалении части или всех раковых клеток, ткани или опухоли в организме может быть образована полость. Лечение может быть выполнено путем перфузии, прямой инъекции или местного применения к такой области дополнительной противоопухолевой терапии. Такое лечение может повторяться, например, каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней, или каждые 1, 2, 3, 4 и 5 недель, или каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев. Эти лечения могут также иметь различные дозировки.

#### E. Другие средства.

Предполагается, что другие средства могут быть применены в сочетании с определенными аспектами данных вариантов реализации изобретения для улучшения терапевтической эффективности лечения. Эти дополнительные средства включают в себя средства, которые влияют на активацию рецепторов клеточной поверхности и щелевых контактов, цитостатические и дифференцирующие агенты, ингибиторы клеточной адгезии, средства, которые повышают чувствительность гиперпролиферативных клеток к апоптотическим индукторам, или другие биологические средства. Увеличение межклеточного сигналинга за счет увеличения количества щелевых контактов увеличит антигиперпролиферативный эффект на соседнюю популяцию гиперпролиферативных клеток. В других вариантах реализации изобретения цитостатические или дифференцирующие агенты могут применяться в сочетании с определенными аспектами данных вариантов реализации изобретения для улучшения антигиперпролиферативной эффективности лечения. Предполагается, что ингибиторы клеточной адгезии улучшают эффективность данных вариантов реализации изобретения. Примерами ингибиторов клеточной адгезии являются ингибиторы киназы фокальной адгезии (КФА) и ловастатин. Дополнительно предполагается, что другие средства, повышающие чувствительность гиперпролиферативной клетки к апоптозу, такие как антитело с225, могут применяться в сочетании с определенными аспектами данных вариантов реализации изобретения для улучшения эффективности лечения.

#### IX. Наборы и диагностика.

В различных аспектах изобретения предлагается набор, содержащий терапевтические средства и/или другие терапевтические средства и средства доставки. В некоторых вариантах реализации данное изобретение предполагает набор для приготовления и/или введения терапии по изобретению. Набор может содержать реагенты, пригодные для использования при введении активного или эффективного средства (средств) по изобретению. Реагенты набора могут включать по меньшей мере один ингибитор экспрессии гена, один или более липидный компонент, один или более противоопухолевый компонент комбинированной терапии, а также реагенты для подготовки, приготовления и/или введения компонентов по изобретению или выполнения одного, или более этапов предлагаемых способов.

В некоторых вариантах реализации изобретения набор может также содержать подходящие приспособления, которые представляют собой контейнер, который не будет взаимодействовать с компонентами набора, такими как пробирки Эппендорфа, аналитический планшет, шприц, бутылка или трубка. Контейнер может быть изготовлен из стерилизованных материалов, таких как пластик или стекло.

Набор может дополнительно включать в себя инструкцию по применению, которая описывает процедурные этапы способов и будет следовать по существу тем же процедурам, которые описаны в данном документе или известны специалистам в данной области техники.

#### X. Примеры.

Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления данного изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что методы, описанные в следующих далее примерах, представляют собой методы, открытые авторами данного изобретения с целью надлежащего функционирования при реализации данного изобретения и, таким образом, могут считаться предпочтительными способами для его реализации. Однако специалистам в данной области техники в свете данного описания следует понять, что в конкретных описанных вариантах реализации изобретения могут быть осуществлены многие изменения без отхода от сущности и объема изобретения с получением аналогичных или сходных результатов.

Пример 1. Способ производства липосомального р-этоксис антисмыслового лекарственного препарата.

Липосомальный р-этоксис антисмысловый лекарственный препарат состоит из двух продуктов cGMP, оба из которых имеют требуемый FDA сертификат качества с одобренными FDA критериями выпуска. В данном документе описаны исходные материалы, растворители и конечный лекарственный препарат. После изготовления лекарственный препарат представляет собой лиофилизированный кристалл или порошок янтарного или белого цвета, который содержит следующие материалы: олигонуклеотид (например, р-этоксис антисмысловое лекарственное вещество), нейтральные липиды (например, DOPC) и поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20). При подготовке к введению пациенту к флакону добавляют нормальный физиологический раствор, и в это время образуются липосомы с р-этоксис антисмысловой молекулой, инкорпорированной во внутреннюю часть.

р-Этоксис антисмысловое лекарственное вещество.

Конкретные физические свойства (например, растворимость и гидрофобность, которые затем влияют на растворимость лекарственного препарата в физиологическом растворе, инкорпорирование олигонуклеотида в липосомы и размер частиц липосом) готового продукта могут быть установлены с использованием предварительно определенной смеси исходного материала р-этоксис и фосфодиэфирного амидита во время производства р-этоксис антисмыслового лекарственного вещества. В то время как потеря р-этоксис группы остова, происходящая случайным образом во время производства олигонуклеотидов, приводит к фосфодиэфирным связям на месте этих связей, эта потеря может не создать предпочтительного соотношения р-этоксис:фосфодиэфирной связи остова в олигонуклеотиде. В этом случае смесь исходного материала р-этоксис и фосфодиэфирного амидита восполняет ожидаемое значение удалений р-этоксис остова, таким образом генерируя олигонуклеотид с требуемым соотношением. Увеличение количества молекул р-этоксис в остове олигонуклеотида приводит к тому, что молекула становится более гидрофобной (что приводит к более крупным липосомным частицам; табл. 1), менее полярной и менее растворимой (табл. 2). Способы тестирования нейтрально заряженного, гидрофобного р-этоксис лекарственного вещества включают масс-спектрометрию для определения распределения длин олигонуклеотидов и анализы для определения растворимости лекарственного вещества, что с практической точки зрения для растворимости представляет собой визуальный осмотр лекарственного препарата, восстановленного в физиологическом растворе. Так как олигонуклеотид становится менее растворимым из-за большего количества р-этоксис связей остова, восстановленный раствор становится белее до тех пор, пока частицы формируются поскольку гидрофобность становится слишком высокой.

Таблица 1. Вариабельность размеров липосомных частиц с композицией антисмыслового остова

Эксперимент	Сконструированный антисмысловый остов	Делеция этиловых компонентов остова после производства		Характеристики размера частиц: Кумулятивная функция распределения		
		Основной пик	Делеция соединения	90% Значение (нм) **	50% Значение (нм)	300 нм Значение (%)
1	3 замена амидита	-6	-5,67	2130	911	15,30
2	3 замена амидита	-6	-5,67	2420	1004	15,50
3	3 замена амидита	-6	-6,12	3682	943	15,50
4	3 замена амидита	-7	-6,66	3805	978	14,60
5	100% р-этокси	-5	-5,66	3924	976	16,00
6	2 замена амидита	-5	-5,32	4387	1888	11,60
7 <sup>a</sup>	100% р-этокси	-4	-4,22	5057	1131	17,70
8	100% р-этокси	-4	-4,52	5659	1359	10,00
9 <sup>b</sup>	100% р-этокси	-4	-4,38	7571	1909	2,60
10 <sup>c</sup>	100% р-этокси	-4	-4,38	7994	1653	14,40

\*\* Критерии выпуска лекарственного препарата заключаются в том, что 90% липосомных частиц должны быть меньше или равны 5000 нм

- a. Эта партия была забракована из-за плохой растворимости; в частности, антисмысловых частиц в восстановленном растворе
- b. Этот партия имела более низкий объем ДМСО и tBA с 2 мг антисмысловых частиц в флаконе емкостью 20 мл, что добавило дополнительный компонент к увеличению липосом
- c. Эта партия не была выпущена, потому что она не соответствовала спецификации выпуска частиц

Таблица 2. Растворимость липосомных частиц с композицией антисмыслового остова

Эксперимент	Сконструированный антисмысловый остов	Делеция этиловых компонентов остова после производства		Растворимость лекарственного средства	
		Основной пик	Делеция соединения	Визуальное наблюдение **	Оценка растворимости
1	3 замена амидита	-6	-5,67	раствор обезжиренного молока	хорошая
2	3 замена амидита	-6	-5,67	раствор обезжиренного молока	хорошая
3	3 замена амидита	-6	-6,12	раствор обезжиренного молока	хорошая
4	3 замена амидита	-7	-6,66	раствор обезжиренного молока	хорошая
5	100% р-этокси	-5	-5,66	раствор обезжиренного молока	хорошая
6	2 замена амидита	-5	-5,32	раствор обезжиренного молока	хорошая
7	100% р-этокси	-4	-4,52	белый раствор	проходит
8 <sup>b</sup>	100% р-этокси	-4	-4,38	белый раствор	проходит
9 <sup>c</sup>	100% р-этокси	-4	-4,38	белый раствор	проходит
10 <sup>a</sup>	100% р-этокси	-4	-4,22	частицы	не
				белого раствора	проходит

\*\* Если образец лекарственного препарата имеет частицы, партия будет отклонена

a. Эта партия была забракована из-за плохой растворимости; в частности, антисмысловых частиц в восстановленном растворе

b. Этот партия имела более низкий объем ДМСО и tBA с 2 мг антисмысловых частиц в флаконе емкостью 20 мл, что добавило дополнительный компонент к увеличению липосом

c. Эта партия не была выпущена, потому что она не соответствовала спецификации выпуска частиц

Приготовление, фильтрация и лиофилизация липосомального р-этокси антисмыслового лекарственного препарата.

Один грамм (1 г) олигонуклеотидов пЭ растворяют в ДМСО в соотношении 10 мг олигонуклеотида на 1 мл ДМСО. Затем добавляют ДОФХ в трет-бутиловый спирт в соотношении 1 г ДОФХ на 1719 мл трет-бутилового спирта. Олигонуклеотиды и ДОФХ объединяют и смешивают в соотношении 1 г олигонуклеотида на 2,67 г ДОФХ. Затем к смеси добавляют 20 мл 0,835% (об./об.) раствора полисорбата 20, получая конечную концентрацию 0,039 мг/мл. Раствор пропускают через стерильный фильтр перед разливом в стеклянные флаконы для лиофилизации.

Влияние поверхностно-активного вещества на размер частиц липосом определяли путем титрования количества поверхностно-активного вещества (табл. 3). В отсутствие полисорбата 20 только 2,8% частиц имели диаметр 300 нм или менее. В присутствии 1х полисорбата 20 (около 5% от общего липосомального р-этокси антисмыслового лекарственного препарата) 12,5% частиц имели диаметр 300 нм или менее. С добавлением 3х-10х полисорбата 20 около 20% частиц имели диаметр 300 нм или менее. Таким образом, увеличение количества поверхностно-активного вещества в от 1х до 3х раз приводит к уменьшению размера частиц.

Таблица 3. Вариабельность размеров липосомных частиц в зависимости от поверхностно-активного вещества

Эксперимент	Количество поверхностно-активного вещества	Характеристики размера частиц: Кумулятивная функция распределения		
		50% Значение	90% Значение **	300 нм Значение
1	0х	5301 нм	10719 нм	2,8%
2	1х	1053 нм	4054 нм	12,5%
3	3х	785 нм	2926 нм	19,1%
4	5х	721 нм	2691 нм	21,9%
5	10х	734 нм	2937 нм	21,4%

\*\* Критерии выпуска лекарственного препарата заключаются в том, что 90% липосомных частиц должны быть меньше или равно 5000 нм

Получение липосомального р-этокси антисмыслового лекарственного препарата для введения.

Лиофилизированный препарат гидратировали с нормальным физиологическим раствором (0,9%/10 mM NaCl) до конечной концентрации олигонуклеотидов 10-5000 мкМ. Липосомальные р-этокси олигонуклеотиды смешивали путем встряхивания вручную.

Пример 2. Способы тестирования липосомального р-этокси антисмыслового лекарственного препарата.

Визуальный осмотр произведенного лекарственного препарата/

После производства выбирают и визуально осматривают флакон с образцом, содержащий лекарственный препарат. Отсутствие жидкости является обязательным, кристаллы янтарного цвета в нижней части флакона являются приемлемыми, а появление или увеличение количества белого, выпавшего в осадок порошка является лучшим результатом. Появление белого цвета указывает на лучший процесс сушки с высоким соотношением площади поверхности к массе, что очень способствует растворению для применения.

Визуальный осмотр восстановленного лекарственного препарата, готового для пациента IV.

Нормальный физиологический раствор добавляют во флакон, содержащий произведенный липосомальный р-этокси антисмысловый лекарственный препарат и встряхивают для восстановления раствора, в котором кристаллическое или порошковое лекарственное средство полностью растворено. Делаются три основных наблюдения: 1) что кристалл или порошок полностью растворены, 2) нет белых скоплений нерастворенного материала и 3) внешний вид молочно-белый или на вид как обезжиренное молоко. Чем ближе к синему цвету выглядит восстановленная жидкость, тем лучше, поскольку это сигнализирует о меньшем размере частиц липосом, которые отражают свет в синем спектре.

Масс-спектрометрия.

Масс-спектрометрия (масс-спек) используется для отображения профиля различных масс в образце. Когда производится р-этокси антисмысловый материал, этот образец анализируют с помощью масс-спектрометрии. В результате показаны пики материала, присутствующего на сетке, который имеет увеличивающуюся массу на оси "х" вправо и возрастающую относительную распространенность по массам на оси "у" вверх. Анализируется профиль из образца для определения относительного количества р-этокси остовов в р-этокси образце, распознается, что профиль пиков представляет собой (начиная с самого дальнего справа) полноразмерный материал со всеми остовами, состоящими из р-этокси связей, следующий пик слева представляет собой полноразмерный материал с одним остовом с делецией р-этокси (и, следовательно, этил удаляется, а в результате получается нормальная фосфодиэфирная связь остова), и так продолжая. Смещенная вправо сигнатура масс-спектрометрии представляет собой образец р-этокси, имеющий больше р-этокси остовов и, следовательно, обладающий более гидрофобными и менее растворимыми свойствами; и аналогичным образом смещенная влево имеет противоположные эффекты. Проверка графика масс-спектрометрии образца также может быть использована для определения того, оказывает ли фильтрация во время производства какое-либо неблагоприятное воздействие на ком-

позицию олигонуклеотидов, присутствующую в отфильтрованном лекарственном препарате.

УФ-тестирование.

Испытание ультрафиолетом применяется для определения массы олигонуклеотида, присутствующего в образце. Олигонуклеотиды поглощают свет в диапазоне 260 нм. В результате УФ-тестирование готового восстановленного лекарственного препарата стало использоваться в качестве метода определения количества олигонуклеотидного лекарственного вещества во флаконе лекарственного препарата. С точки зрения развития производства и инноваций УФ-тестирование используется для определения того, были ли проблемы, возникающие во время фильтрации при изготовлении или плохой растворимости р-этокси антисмыслового лекарственного вещества, что приводит к меньшему количеству олигонуклеотидов в растворе и, следовательно, к более низкому УФ-показателю. Этот способ будет утвержден и, вероятно, станет частью окончательного тестирования конечного продукта.

Размер липосомных частиц.

Флакон готового лекарственного препарата восстанавливают и тестируют на размер липосомных частиц. Результатом часто является примерно нормальное распределение, имеющее центральную точку, хвосты и средние значения или примерно нормальное распределение большинства частиц и меньшие вторичные пики меньших липосомных частиц, возникающие в результате эффектов образования частиц второго порядка. Важно, чтобы липосомные частицы не были слишком большими, так как они могут приводить к неблагоприятным воздействиям у пациентов (например, создавать проблемы кровотока в небольших кровеносных сосудах в легких). В результате критерии выпуска лекарственного препарата включают в себя то, что после измерения размера частиц 90% липосом имеют размер около 5 мкм или менее. Кроме того, предпочтительными являются липосомы меньшего размера, поскольку они будут лучше поглощаться клетками, а также липосомы меньшего размера могут проникать в поры сосудов, что позволяет проникать внутрь опухолей, повышая эффективность лечения липосомального р-этокси антисмыслового лекарственного препарата.

Все способы, описанные и заявленные в данном документе, могут быть сделаны и выполнены без необоснованных экспериментов в свете данного изобретения. Хотя композиции и способы по данному изобретению были описаны с точки зрения предпочтительных вариантов реализации изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что различные варианты могут применяться к способам и этапам или в последовательности этапов описанного в данном документе способа без отхода от истинной сути и объема данного изобретения. Более конкретно, будет очевидно, что некоторые средства, которые являются как химически, так и физиологически родственными, могут быть заменены средствами, описанными в данном документе, и в то же время будут достигнуты одинаковые или подобные результаты. Все подобные аналогичные замены и модификации, очевидные для специалистов в данной области техники, считаются находящимися в пределах сущности, объема и концепции изобретения, как определено прилагаемой формулой изобретения.

Литературные источники.

Следующие ссылки, в том объеме, в котором они обеспечивают иллюстративные, процедурные или другие детали в дополнение к тем, которые изложены в данном документе, специально включены в данный документ посредством ссылки.

патент США № 4,659,774  
патент США № 4,816,571  
патент США № 4,870,287  
патент США № 4,959,463  
патент США № 5,141,813  
патент США № 5,214,136  
патент США № 5,223,618  
патент США № 5,264,566  
патент США № 5,378,825  
патент США № 5,428,148  
патент США № 5,446,137  
патент США № 5,466,786  
патент США № 5,470,967  
патент США № 5,539,082  
патент США № 5,554,744  
патент США № 5,574,146  
патент США № 5,602,240  
патент США № 5,602,244  
патент США № 5,610,289  
патент США № 5,614,617  
патент США № 5,623,070  
патент США № 5,652,099  
патент США № 5,670,663  
патент США № 5,672,697  
патент США № 5,681,947  
патент США № 5,700,922  
патент США № 5,705,629  
патент США № 5,708,154  
патент США № 5,714,331  
патент США № 5,714,606  
патент США № 5,719,262

патент США № 5,736,336  
патент США № 5,739,169  
патент США № 5,760,395  
патент США № 5,763,167  
патент США № 5,766,855  
патент США № 5,773,571  
патент США № 5,777,092  
патент США № 5,786,461  
патент США № 5,792,847  
патент США № 5,801,005  
патент США № 5,824,311  
патент США № 5,830,880  
патент США № 5,846,945  
патент США № 5,855,911  
патент США № 5,858,988  
патент США № 5,859,221  
патент США № 5,872,232  
патент США № 5,886,165  
патент США № 5,891,625  
патент США № 5,908,845

Austin-Ward и Villaseca, *Revista Medica de Chile*, 126(7):838-845, 1998 год.

Bailey и Sullivan, *Biochimica. Biophys. Acts.*, 239-252, 2000.

Bangham и соавт., *J. Mol. Biol.*, 13(1):253-259, 1965 год.

Bukowski и соавт., *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347, 1998 год.

Christodoulides и соавт., *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037, 1998 год.

Davidson и соавт., *J. Immunother.*, 21(5):389-398, 1998 год.

Deamer и Uster, In:*Liposome Preparation:Methods и Mechanisms*, Ostro (ред.),*Liposomes*, 1983 год.

Dokka и соавт., *Pharm Res*, 17:521-25, 2000 год.

duBois и соавт., *J Clin Oncol*, 17:46-51, 1999 год.

Dubey и соавт., *J. Drug Target*, 12:257-264, 2004 год.

Duxbury и соавт., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 311:786-

792, 2003 год.

Duxbury и соавт., *Oncogene*, 23:1448-1456, 2004 год.

Egholm и соавт., *Nature*, 365(6446):566-568, 1993 год.

Elbashir и соавт., *Nature*, 411 (6836):494-498, 2001 год.

European Appln. 01219

European Appln. 266,032

Farhood и соавт., *Biochim. Biophys. Act*, 289-295, 1995 год.

Fire и соавт., *Nature*, 391(6669):806-811, 1998 год.

Flenniken и соавт., *Dev. Biol.*, 179:382-401, 1996 год.

Froehler и соавт., *Nucleic Acids Res.*, 14(13):5399-5407,  
1986 год.

Gabizon, *Cancer Invest.*, 19:424-436, 2001 год.

Ghosh и Bachhawat, In:*Liver Diseases, Targeted Diagnosis  
and Therapy Using Specific Receptors and Ligands*, Wu и соавт.  
(ред.), Marcel Dekker, NY, 87-104, 1991 год.

Gregoriadis, In:*Drug Carriers in Biology and Medicine*,  
Gregoriadis (ред.), 287-341, 1979 год.

Gutierrez-Puente и соавт., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*,  
291:865-869, 1999 год.

Halder и соавт., *Clinical Cancer Research*, 11:8829-36, 2005  
год.

Han и соавт., *Ann Surg Oncol*, 4:264-268, 1997 год.

Hanibuchi и соавт., *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998  
год.

Hannon и Rossi, *Nature*, 431:371-378, 2004 год.

Hassani и соавт., *J. Gene Med.*, 7(2):198-207, 2005 год.

Hecker и соавт., *Cancer Research*, 62:2699-2707, 2002 год.

Hellstrand и соавт., *Acta Oncologica*, 37(4):347-353, 1998  
год.

Hortobagyi и соавт., *J. Clin. Oncol.*, 19:3422-3433, 2001  
год.

Hsia и соавт., *J Cell Biol*, 160:753-67, 2003 год.

Hui и Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336, 1998  
год.

Jackson и соавт., *Nat. Biotechnol.*, 21:635-637, 2003 год.

Jemal et al, *CA Cancer J. Clin.*, 55(1):10-30, 2005 год.

- Judson и соавт., *Cancer*, 86:1551-56, 1999 год.
- Kaneda и соавт., *Science*, 243:375-378, 1989 год.
- Kato и соавт., *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991 год.
- Kim и соавт., *Nat. Biotechnol.*, 22:321-325, 2004 год.
- Kinch и соавт., *Clin. Exp. Metastasis*, 20:59-68, 2003 год.
- Klein и соавт., *Gastroenterology*, 125:9-18, 2003 год.
- Kohnno и соавт., *Int J Cancer*, 97:336-43, 2002 год.
- Kornberg и Baker, *DNA Replication*, 2е Изд, Freeman, San Francisco, 1992 год.
- Kornberg и соавт., *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45:4463-69, 2004 год.
- Kornberg, *Head Neck*, 20:634-639, 1998 год.
- Kostarelos и соавт., *Int J Cancer*, 112:713-21, 2004 год.
- Krasnici и соавт., *Int. J. Cancer*, 105(4):561-567, 2003 год.
- Landen, *Cancer Res*, 65:6910-18, 2005 год.
- Langley и соавт., *Cancer Research*, 63:2971-76, 2003 год.
- Lewis и соавт., *Cell*, 115:787-798, 2003 год.
- Lewis и соавт., *Nat. Genet.*, 32:107-108, 2002 год.
- Lori и соавт., *Am. J. Pharmacogenomics*, 2:245-252, 2002 год.
- Matsuda и соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:16-22, 2004 год.
- McCaffrey и соавт., *Nature*, 418:38-39, 2002 год.
- McGuire и соавт., *New England Journal of Medicine*, 334:1-6, 1996 год.
- McLean и соавт., *Expert Opin Pharmacother*, 4:227-34, 2003 год.
- Miller и соавт., *Biochemistry*, 37(37):12875-83, 1998 год.
- Mitchell и соавт., *Ann. NY Acad. Sci.*, 690:153-166, 1993 год.
- Mitchell и соавт., *J. Clin. Oncol.*, 8(5):856-869, 1990 год.
- Mitra и соавт., *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6:56-68, 2005 год.
- Mitra и соавт., *Proc Am Assoc Cancer Res*, 2005 год.
- Morton и соавт., *Arch. Surg.*, 127:392-399, 1992 год.

- Nemoto и соавт., *Pathobiology*, 65:195-203, 1997 год.
- Nicolau и соавт., *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987 год.
- Noblitt и соавт., *Cancer Gene Ther.*, 11:757-766, 2004 год.
- Ogawa и соавт., *Oncogene*, 19:6043-6052, 2000 год.
- Owens и соавт., *Cancer Res*, 55:2752-2755, 1995 год.
- Park и соавт., *Cancer Lett.*, 118:153-160, 1997 год.
- PCT Appln. WO 92/20702
- PCT Appln. WO02/100435A1
- PCT Appln. WO03/015757A1
- PCT Appln. WO04/002453A1
- PCT Appln. WO04029213A2
- Pietras и соавт., *Oncogene*, 17(17):2235-2249, 1998 год.
- Qin и соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416, 1998 год.
- Ravindranath и Morton, *Intern. Rev. Immunol.*, 7:303-329, 1991 год.
- Reich и соавт., *Mol. Vis.*, 9:210-216, 2003 год.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 18е Изд. Mack Printing Company, 1289-1329, 1990 год.
- Rosenberg и соавт., *Ann. Surg.* 210(4):474-548, 1989 год.
- Rosenberg и соавт., *N. Engl. J. Med.*, 319:1676, 1988 год.
- Ryther и соавт., *Gene Ther.*, 12(1):5-11, 2004 год.
- Sambrook и соавт., *In:Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 2001 год.
- Schaller и Parsons, *Trends in Cell Biology*, 3:258-62, 1993 год.
- Schaller и соавт., *Mol Biol Cell*, 10:3489-3505, 1999 год.
- Schaller, *Biochim Biophys Acta*, 1540:1-21, 2001 год.
- Schaller, *J Endocrinol*, 150:1-7, 1996 год.
- Schaller, *Trends Cell Biol*, 3:258-262, 1993 год.
- Scheit, *In:Synthesis and Biological Function*, Wiley-Interscience, NY, 171-172, 1980 год.
- Schlaepfer и Hunter, *Trends in Cell Biology*, 8:151-57, 1998 год.
- Schlaepfer и соавт., *Prog Biophys Mol Biol*, 71:435-78, 1999 год.

- Sein и соавт., *Oncogene*, 19:5539-42, 2000 год.
- Sheta и соавт., *J Natl Cancer inst*, 92:1065-73, 2000 год.
- Shibata и соавт., *Cancer Res*, 58:900-903, 1998 год.
- Sieg и соавт., *Nat Cell Biol*, 2:249-56, 2000 год.
- Sioud и Sorensen, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 312:1220-1225, 2003 год.
- Siwak и соавт., *Clin Cancer Res*, 8:955-56, 2002 год.
- Sledz и соавт., *Nat. Cell Biol.*, 5:834-839, 2003 год.
- Song и соавт., *Nature Med.* 9:347-351, 2003 год.
- Sonoda и соавт., *Journal of Biological Chemistry*, 275:16309-15, 2000 год.
- Sood и соавт., *Am J Pathol*, 165:1087-1095, 2004 год.
- Sood и соавт., *Cancer Biology & Therapy*, 1:511-17, 2002 год.
- Sorensen и соавт., *J. Mol. Biol.*, 327:761-66, 2003 год.
- Soutschek и соавт., *Nature*, 432:173-178, 2004 год.
- Spagnou и соавт., *Biochemistry*, 43:13348-13356, 2004 год.
- Sulman и соавт., *Genomics*, 40:371-374, 1997 год.
- Szoka и Papahadjopoulos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:4194-4198, 1978 год.
- Thaker и соавт., 36th Annual Meeting of the Society of Gynecologic Oncologists, Miami, Fla., 2005 год.
- Thaker и соавт., *Clin. Cancer Res.*, 10:5145-5150, 2004 год.
- Thurston и соавт., *J. Clin. Invest.*, 101(7):1401-1413, 1998 год.
- Uchida и соавт., *Mol. Ther.*, 10:162-171, 2004 год.
- Voskoglou-Nomikos и соавт., *Clin. Cancer Res.*, 9:4227-4239, 2003 год.
- Walker-Daniels и соавт., *Prostate*, 41:275-80, 1999 год.
- Wianny и соавт., *Nat. Cell Biol.*, 2:70-75, 2000 год.
- Wong и соавт., *Gene*, 10:87-94, 1980 год.
- Xia и соавт., *Nat. Biotechnol*, 20:1006-10, 2002 год.
- Yang и соавт., *Oncogene*, 22:5694-701, 2003 год.
- Zelinski и соавт., *Cancer Res.*, 61:2301, 2001 год.
- Zhang и соавт., *J. Biol. Chem.*, 279:10677-684, 2004 год.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для доставки терапевтически эффективного количества олигонуклеотида в клетку, содержащая популяцию олигонуклеотидов, в которой олигонуклеотиды популяции состоят из нуклеозидных молекул, соединенных между собой посредством фосфатных связей остова, при этом по меньшей мере одна из фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде представляет собой р-этоксидную связь остова, причем от 50 до 80% фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде являются р-этоксидными связями остова, где от 20 до 50% фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде представляют собой фосфодиэфирные связи остова и где олигонуклеотиды популяции имеют размер в диапазоне от 7 до 30 нуклеотидов.

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что от 60 до 70% фосфатных связей остова представляют собой р-этоксидные связи остова.

3. Композиция по п.2, отличающаяся тем, что от 30 до 40% фосфатных связей остова представляют собой фосфодиэфирные связи остова.
4. Композиция по п.1, где фосфодиэфирные связи остова в каждом из олигонуклеотидов популяции случайно распределены по всему олигонуклеотиду.
5. Композиция по п.4, отличающаяся тем, что олигонуклеотиды популяции имеют средний размер 7 нуклеотидов, при этом не более 5 фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде представляют собой р-этокси связь остова.
6. Композиция по п.4, отличающаяся тем, что олигонуклеотиды популяции имеют средний размер 10 нуклеотидов, при этом не более 8 фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде представляют собой р-этокси связь остова.
7. Композиция по п.4, отличающаяся тем, что олигонуклеотиды популяции имеют средний размер 30 нуклеотидов, при этом не более 24 фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде представляют собой р-этокси связь остова.
8. Композиция по п.4, отличающаяся тем, что олигонуклеотиды популяции имеют размер в диапазоне от 12 до 25 нуклеотидов.
9. Композиция по п.8, отличающаяся тем, что олигонуклеотиды популяции имеют средний размер 15 нуклеотидов, при этом не более 12 фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде представляют собой р-этокси связь остова.
10. Композиция по п.8, отличающаяся тем, что олигонуклеотиды популяции имеют средний размер 8 нуклеотидов, при этом не более 4 фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде представляют собой р-этокси связь остова.
11. Композиция по п.8, отличающаяся тем, что олигонуклеотиды популяции имеют средний размер 20 нуклеотидов, при этом не более 16 фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде представляют собой р-этокси связь остова.
12. Композиция по п.8, отличающаяся тем, что олигонуклеотиды популяции имеют средний размер 25 нуклеотидов, при этом не более 20 фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде представляют собой р-этокси связь остова.
13. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что популяция олигонуклеотидов содержит один вид олигонуклеотидов.
14. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что популяция олигонуклеотидов содержит по меньшей мере два вида олигонуклеотидов.
15. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что популяция олигонуклеотидов содержит антисмысловые олигонуклеотиды, короткие интерферирующие РНК, микроРНК или piwiРНК.
16. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что олигонуклеотиды популяции ингибируют экспрессию по меньшей мере одного онкогенного белка, белка инфекционного агента или собственного антигена.
17. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что олигонуклеотиды популяции гибридизуются по меньшей мере с одним онкогенным олигонуклеотидом, олигонуклеотидом инфекционного агента или олигонуклеотидом собственного антигена.
18. Композиция по п.1, дополнительно содержащая фосфолипиды, и при этом олигонуклеотиды и фосфолипиды образуют олигонуклеотид-липидный комплекс.
19. Композиция по п.18, отличающаяся тем, что фосфолипиды являются незаряженными или имеют нейтральный заряд при физиологическом рН.
20. Композиция по п.19, отличающаяся тем, что фосфолипиды представляют собой нейтральные фосфолипиды.
21. Композиция по п.20, отличающаяся тем, что нейтральные фосфолипиды представляют собой фосфатидилхолины.
22. Композиция по п.20, отличающаяся тем, что нейтральные фосфолипиды представляют собой диолеилфосфатидилхолин.
23. Композиция по п.18, отличающаяся тем, что фосфолипиды практически не содержат холестерина.
24. Композиция по п.18, отличающаяся тем, что фосфолипиды и олигонуклеотиды присутствуют при молярном соотношении от около 5:1 до около 100:1.
25. Композиция по п.18, отличающаяся тем, что олигонуклеотид-липидный комплекс дополнительно определяется как популяция липосом.
26. Композиция по п.25, отличающаяся тем, что по меньшей мере 90% липосом имеют диаметр менее 5 мкм.
27. Композиция по п.25, отличающаяся тем, что популяция олигонуклеотидов инкорпорирована в популяцию липосом.
28. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что композиция лиофилизирована.
29. Фармацевтическая композиция для доставки терапевтически эффективного количества олигонуклеотида в клетку, где фармацевтическая композиция содержит композицию по п.18 и фармацевтически приемлемый носитель.
30. Фармацевтическая композиция по п.29, дополнительно содержащая химиотерапевтический

агент, выбранный из алкилирующих агентов, таких как тиотепа и циклофосфамид; алкилсульфонатов, таких как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридинов, таких как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилоломеламин; ацетогенинов (особенно буллатадин и буллатаинон); камптотецина (включая синтетический аналог топотекан); бриостатина; каллистатина; СС-1065 (включая синтетические аналоги адозелезина, карзелезина и бизелезина); криптофицинов (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатина; дуокармицина (включая синтетические аналоги, KW-2189 и СВ1-ТМ1); элейтеробина; панкратистатина; саркодиктина; спонгистатина; азотистых ипритов, таких как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид мехлорэтамин оксида, мелфалан, новэмбихин, фенстерин, преднимустин, трофосфамид и урациловый иприт; нитрозомочевин, таких как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотиков, таких как эндииновые антибиотики (например, калихемицин, особенно калихемицин гамма II и калихемицин омега II); динемидина, включая динемидин А; бисфосфонатов, таких как клодронат; эсперамицин; а также хромофор неокарцинон и связанные с ним эндиинового хромопротеины антибиотики хромофоры, аклаиномицины, актиномицин, аутранницин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицинов, таких как митомицин С, микофенольная кислота, ногаларцицин, оливомицины, пепломицин, потфиروмицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, циностаин и зорубицин; антиметаболитов, таких как метотрексат и 5-фторурацил (5-ФУ); аналогов фолиевой кислоты, таких как деноптерин, птероптерин и триметрексат; пуриновых аналогов, таких как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн и тиогуанин; пиримидиновых аналогов, таких как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин и флоксуридин; андрогенов, таких как калустерон, пропионат дромонастанола, эпитиостанол, мепитиостан и тестолактон; средств, угнетающих функции надпочечников, таких как митоган и трилостан; заменителя фолиевой кислоты, такого как фролиновая кислота; ацеглатона; альдофосфамидгликозида; аминоклевулиновой кислоты; энилурацила; амсакрина; бестрабуцила; бизантрена; эдатраксата; дефофамина; демеколцина; диазиковона; элформитина; эллиптиний ацетата; эпотилона; этоглуцида; нитрата галлия; гидроксимочевины; лентинана; лонидаинина; майтансиноидов, таких как майтансин и ансамитоцины; митогуазона; митоксантрона; мопиданмола; нитраэрина; пентостатина; фенамета; пирарубицина; лозоксантрона; подофиллиновой кислоты; 2-этилгидразида; прокарбазина; полисахаридного комплекса PSK; разоксана; ризоксина; сизофирана; спирогермания; тенуазоновой кислоты; триазиковона; 2,2',2"-трихлортриэтиламина; трихотеценов (особенно токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретана; виндизина; дакарбазина; манномустина; митобронитола; митолактола; пипобромана; гацитозина; арабинозида ("Ара-С"); циклофосфамида; таксоидов, например, паклитаксел и доцетаксел гемцитабина; 6-тиогуанина; меркаптопурина; координационных комплексов платины, таких как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин; винбластина; платины; этопозиды (VP-16); ифосфамида; митоксантрона; винкристина; винорелбина; новантрона; тенипозиды; эдатрексата; дауномицина; аминокптерина; кселоды; ибандроната; иринотекана (например, СРТ-11); ингибитора топоизомеразы RFS 2000; диформметалгилорнитина (ДФМО); ретиноидов, таких как ретиноевая кислота; капецитабина; карбоплатина, прокарбазина, пликомицина, гемцитабина, навельбина; ингибиторов фарнезил-протеин трансферазы, трансплатина и фармацевтически приемлемых солей, кислот или производных любого из вышеуказанных.

31. Способ доставки терапевтически эффективного количества олигонуклеотида в клетку, включающий контактирование клетки с фармацевтической композицией по п.29.

32. Способ по п.31, согласно которому доставка происходит для лечения гиперплазии, рака, аутоиммунного заболевания или инфекционного заболевания.

33. Способ доставки терапевтически эффективного количества олигонуклеотида в клетку для лечения ракового заболевания, аутоиммунного заболевания или инфекционного заболевания, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п.29.

34. Способ по п.33, согласно которому субъект является человеком.

35. Способ по п.33, согласно которому рак является раком мочевого пузыря, крови, поджелудочной железы, кости, костного мозга, мозга, молочной железы, толстой кишки, пищевода, желудка, головы и шеи, почки, печени, легкого, простаты, кожи, яичка, языка, яичника или матки.

36. Способ по п.33, согласно которому аутоиммунное заболевание представляет собой системную красную волчанку, синдром Шегрена, болезнь Крона, сахарный диабет, рассеянный склероз или ревматоидный артрит.

37. Способ по п.33, согласно которому инфекционное заболевание представляет собой бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию, вирусную инфекцию или паразитарную инфекцию.

38. Способ по п.33, согласно которому композицию вводят подкожно, внутривенно или интратрибушинно.

39. Способ по п.33, дополнительно включающий применение, по меньшей мере, второй противоопухолевой терапии к субъекту, где вторая противоопухолевая терапия представляет собой хирургическую терапию, химиотерапию, лучевую терапию, криотерапию, гормональную терапию, иммунотерапию, противовирусную терапию, терапию, подавляющую иммунитет, антибактериальную терапию, антипаразитарную терапию, противогрибковую терапию или цитокиновую терапию.

